



ELITechGroup S.p.A.
C.so Svizzera, 185
10149 Torino ITALIA

Offices: Tel. +39-011 976 191 Fax +39-011 936 76 11
E-mail: emd.support@elitechgroup.com
Website: www.elitechgroup.com

NOTICE of CHANGE dated 13/10/2020

IMPORTANT COMMUNICATION FOR THE USERS OF PRODUCT:

« MRSA/SA ELITe MGB Kit » Ref. M800351

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

- *Introduction of the new product reference "ELITe InGenius Sonication tubes" (ref. INT032SON) to be used in combination with the product for sample sonication.*

Composition, use and performance of the product remain unchanged.

PLEASE NOTE



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



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



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



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



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



DIESE FASSUNG DER GEBRAUCHSANLEITUNG IST KOMPATIBEL MIT DER VORHERIGEN VERSION DES TESTKITS



MRSA / SA ELITE MGB® Kit
Réactif pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF M800351

EXPLICATION DU TEST

Le *Staphylococcus aureus* est un pathogène opportuniste et commensal. Il colonise la peau et les narines d'environ 30% de la population normale et il peut être à l'origine d'un large éventail de maladies. Le SA, et notamment le MRSA, sont l'une des principales causes des infections nosocomiales. Ces infections sont la source de taux élevés de morbidité et de mortalité, ainsi que de coûts importants. L'émergence d'infections à MRSA de nature collective exige une surveillance active des patients hospitalisés ou admis dans d'autres établissements médicalisés. Ceci afin de mettre en évidence la présence de SA et de MRSA et identifier les personnes pouvant servir de réservoir d'infections pour d'autres patients.

Le «MRSA/SA ELITE MGB® Kit» est un test triplex basé sur l'amplification en temps réel. Il cible les régions conservées d'un **gène spécifique à *Staphylococcus aureus***, responsable de l'identification des SA à coagulase positive. Le test cible aussi le **gène *mecA***, y compris la variante ***mecA_{LGA251}***, récemment identifiée également comme **gène *mecC*** (Ito T et al.), responsable de la résistance à la méthicilline et d'autres antibiotiques bêta-lactame, ainsi qu'un contrôle interne exogène, pour vérifier l'inhibition de la réaction et l'intégrité des réactifs.

Le gène spécifique au *Staphylococcus aureus* identifiera sans ambiguïté les SA à coagulase positive, tandis que le gène *mecA* identifiera sans ambiguïté le gène lié à la résistance à la méthicilline. La présence des deux marqueurs avec la même quantité relative mesurée à travers une différence dans la valeur de seuil du cycle, est un indice de MRSA; des quantités relatives différentes ou la présence du seul gène spécifique au *Staphylococcus aureus* sont un indice du SA.

Les tests pour la détection des MRSA et des SA par amplification en temps réel réduisent considérablement les temps de laboratoire par rapport à la culture, d'où une meilleure productivité de la procédure. Les tests actuels pour la détection des MRSA par PCR en temps réel ciblent le site d'insertion du *SCCmec* (élément génétique mobile portant le *mecA*, appelé *Staphylococcal Cassette Chromosome - Cassette Chromosomique Staphylococcique*) et/ou le gène *mecA* et/ou le gène *spa*. Le «MRSA/SA ELITE MGB® Kit» cible des régions conservées dans les marqueurs génétiques des MRSA et des SA, minimisant ainsi les faux négatifs dus à la variabilité naturelle du site d'insertion *SCCmec* et les faux négatifs dus au problème de la «cassette vide».

PRINCIPE DU TEST

Le test est basé sur une réaction d'amplification en temps réel triplex, effectuée à l'aide d'un thermostat programmable muni d'un système optique de détection de la fluorescence.

La sonde spécifique au gène SA est basée sur la technologie ELITE MGB®; elle est marquée avec le fluorophore AP554 (un analogue à TAMRA). Elle est activée lorsqu'elle s'hybride avec le produit spécifique de la réaction d'amplification pour le *Staphylococcus aureus*.

Les sondes spécifiques aux gènes *mecA* et *mecA_{LGA251}* sont basées sur la technologie ELITE MGB® et sont marquées avec le fluorophore FAM. Elles sont activées lorsqu'elle s'hybrident avec le produit spécifique de la réaction d'amplification pour le gène de la résistance aux antibiotiques.

La sonde spécifique au Contrôle Interne est basée sur la technologie ELITE MGB® et est marquée avec le fluorophore AP642 (un analogue à Cy5). Elle est activée lorsqu'elle s'hybride avec le produit spécifique de l'amplification pour le Contrôle Interne.

L'émission de la fluorescence augmente au fur et à mesure qu'augmente la quantité de produits spécifiques de la réaction d'amplification, et elle est mesurée et enregistrée par l'instrument. Le traitement des données permet de détecter la présence d'ADN de MRSA ou de SA dans l'échantillon initial.

L'essai a été validé avec les systèmes décrits dans le manuel.

MRSA / SA ELITE MGB® Kit

Réactif pour l'amplification en temps réel de l'ADN

REF M800351



TABLE DES MATIÈRES

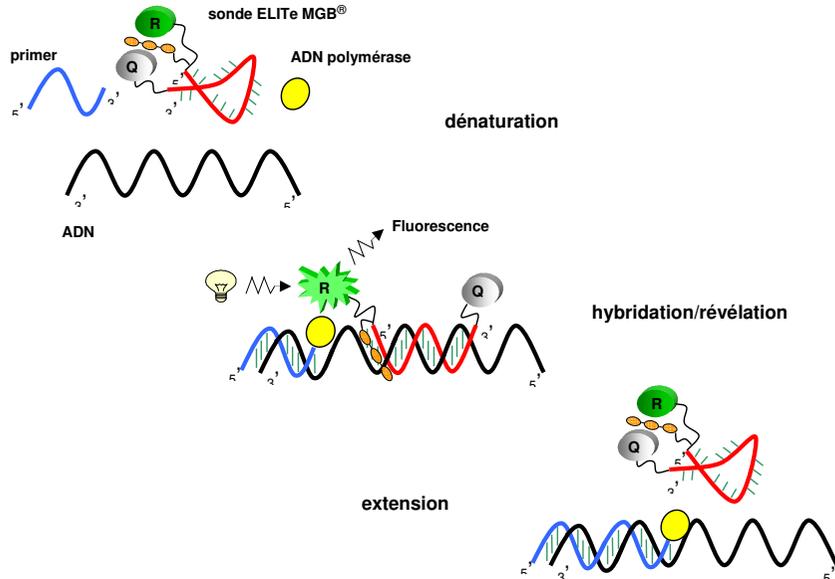
APPLICATION	Page 1
EXPLICATION DU TEST	Page 2
PRINCIPE DU TEST	Page 2
DESCRIPTION DU PRODUIT	Page 4
MATÉRIEL FOURNI	Page 4
MATÉRIEL REQUIS, MAIS NON FOURNI	Page 4
AUTRES PRODUITS REQUIS	Page 5
AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS	Page 6
ELITE INGENIUS®	Page 7
ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES	Page 7
PROCÉDURE	Page 8
PERFORMANCES	Page 14
AUTRES SYSTÈMES	Page 17
ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES	Page 17
PROCÉDURE	Page 19
PERFORMANCES	Page 24
BIBLIOGRAPHIE	Page 28
LIMITES DE LA PROCÉDURE	Page 29
PROBLÈMES ET SOLUTIONS	Page 30
LÉGENDE DES SYMBOLES	Page 31
NOTE POUR L'ACQUÉREUR: LICENCE LIMITÉE	Page 32

APPLICATION

Le produit «MRSA / SA ELITE MGB® Kit» est un test qualitatif d'amplification des acides nucléiques pour la détection du *Staphylococcus aureus* (SA) et du *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (MRSA, y compris la souche LGA251, récemment identifiée) à partir d'échantillons d'ADN extraits d'écouvillons nasaux et de cultures de sang.

Le produit est destiné à favoriser la prévention et le contrôle des infections à MRSA en milieu hospitalier. Il est conçu pour le diagnostic des infections à MRSA, et non pas pour l'orientation ou le suivi de leur traitement. Un résultat négatif n'exclut pas une colonisation nasale par un MRSA ou un SA. En parallèle, il est nécessaire de cultiver les souches afin de déterminer leur type épidémiologique ou d'effectuer des tests supplémentaires de susceptibilité.

La figure ci-dessous illustre le mécanisme d'activation et d'émission de la fluorescence par la sonde basée sur la technologie ELITE MGB®. La sonde n'est pas hydrolysée pendant le cycle d'amplification.



DESCRIPTION DU PRODUIT

Le produit «MRSA/SA ELITE MGB® Kit» contient:

MRSA/SA PCR Mix

Le MRSA/SA PCR Mix est un réactif complet stabilisé dans une solution stabilisante pour l'amplification en temps réel. Le mélange est réparti dans **quatre tubes, prêts à l'emploi**. Chaque tube contient **540 µL** de solution, quantité suffisante pour **24 tests** en association avec le système «**ELITE InGenius®**» et **25 tests** en association avec d'autres systèmes.

Les amorces et la sonde du gène spécifique à *Staphylococcus aureus* (stabilisée par le groupe MGB®, marquée avec le fluorophore AP554 (AquaPhlour® 554, un analogue à TAMRA) et inactivée par un quencher non fluorescent) sont spécifiques à une région conservée des *Staphylococcus aureus* à coagulase positive.

Les amorces et les sondes (stabilisées par le groupe MGB®, marquées avec le fluorophore FAM, et inactivées par un quencher non fluorescent) du gène *mecA* et *mecA_{LAGA251}* sont spécifiques d'une région conservée des *gènes mecA* et *mecA_{LAGA251}*, responsables de la résistance à la méthicilline et à d'autres antibiotiques bêta-lactame.

Les amorces et la sonde (stabilisée par le groupe MGB®, marquée avec le fluorophore AP642 (un analogue à Cy5) et inactivée par un quencher non fluorescent) du Contrôle Interne sont spécifiques à un ADN plasmidique non-infectieux contenant des séquences artificielles pour le **Contrôle Interne**.

Le mélange de réaction fournit aussi le tampon, le chlorure de magnésium, les nucléotides triphosphates, le fluorophore AP593 (un analogue à ROX), utilisé comme référence passive pour normaliser la fluorescence, l'enzyme Uracil N-glycosidase (UNG) pour inactiver les contaminations dérivant de produits d'amplification, et l'enzyme ADN polymérase à activation thermique (*hot start*).

Le produit permet d'effectuer **96 tests avec le système ELITE InGenius**, y compris les contrôles.

Le produit permet d'effectuer **100 tests avec d'autres systèmes**, y compris les contrôles.

MATÉRIEL FOURNI

Composant	Description	Quantité	Classification de danger
MRSA/SA PCR Mix	Mélange de réaction complet	4 x 540 µL	-

MATÉRIEL REQUIS, MAIS NON FOURNI

- Hotte à flux laminaire.
- Gants jetables sans poudre, en nitrile ou équivalent.
- Vortex.
- Microcentrifugeuse de paillasse (12.000 - 14.000 Tr/min).
- Micro-pipettes et embouts stériles avec filtre pour aérosol ou à distribution positive (2 - 20 µL, 5 - 50 µL, 50 - 200 µL, 200 - 1000 µL).
- Eau pour biologie moléculaire.
- Bouillon trypticase soja.
- Thermostats programmables avec système optique de détection de la fluorescence 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument (Applied Biosystems®) et 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems®), calibrés comme prévu par le fabricant.

AUTRES PRODUITS REQUIS

Les produits pour la collecte des échantillons et l'extraction de leur ADN, le contrôle d'extraction interne, le contrôle positif pour l'amplification et les consommables **ne sont pas compris** dans ce produit.

Les produits génériques suivants doivent être utilisés pour collecter les échantillons des patients à employer avec l'instrument «**ELITE InGenius**»:

«eSwab Collection Kit» (Copan, code 480CE) et «eNAT™ kit» (Copan, code 608CS01R),

Le produit générique «BBL CultureSwab Plus Amies Gel without Charcoal swabs» (Becton-Dickinson, code 220116) est recommandé pour collecter les échantillons des patients, à utiliser avec l'instrument d'extraction «NucliSENS® easyMAG®» jumelé à l'instrument 7500 Fast Dx Real-Time PCR thermal cycler.

Pour l'exécution automatique de l'extraction de l'ADN, de l'amplification en temps réel et de l'interprétation des résultats des échantillons à analyser, il est nécessaire d'utiliser l'instrument «ELiTe InGenius» (ELITechGroup S.p.A., réf. INT030) et les Assay protocols spécifiques suivants:

- paramètres pour le contrôle positif d'amplification «MRSA-SA ELiTe_PC» (ELITechGroup S.p.A.),
- paramètres pour le contrôle négatif d'amplification «MRSA-SA ELiTe_NC» (ELITechGroup S.p.A.)
- paramètres pour l'échantillon analysé «MRSA-SA ELiTe_NS_200_100» e «MRSA-SA ELiTe_BC_200_100» (ELITechGroup S.p.A.).

Pour l'exécution automatique des tests avec l'instrument «ELiTe InGenius» (ELITechGroup S.p.A., réf. INT030), les produits génériques suivants doivent être utilisés:

- «ELiTe InGenius® SP 200» (ELITechGroup S.p.A., réf. INT032SP200), consommables pour l'extraction et amplification des acides nucléiques d'échantillons biologiques
- «ELiTe InGenius® SP 200 Consumable Set» (ELITechGroup S.p.A., réf. SCH INT032CS),
- consommables pour la sonication «ELiTe InGenius® Sonication tubes» (ELITechGroup S.p.A., réf. INT032SON),
- collecteur «ELiTe InGenius® Waste Box» (ELITechGroup S.p.A., réf. F2102-000),
- cartouches d'amplification «ELiTe InGenius® PCR Cassette» (ELITechGroup S.p.A., réf. INT035PCR)
- embouts «300 µL Universal Filter Tips» (Axygen BioScience Inc., CA, USA, réf. 732-0937).

Pour procéder à l'extraction automatique de l'ADN des échantillons à tester, il est recommandé d'utiliser les produits génériques suivants: «NucliSENS® easyMAG® Strip for Premix» (bioMérieux SA, code 278303), «bioHit Electronic Multichannel Pipettor» (bioMérieux SA, code 280141), «Filter tips for bioHit» (bioMérieux SA, code 280146) et «NucliSENS® easyMAG® Reagents» (bioMérieux SA, codes 280130, 280131, 280132, 280133, 280134, 280135). Ces produits sont à utiliser avec l'extracteur «NucliSENS® easyMAG®» (bioMérieux SA, code 200111).

Comme contrôle interne d'extraction et d'inhibition, il est nécessaire d'utiliser le produit générique «CPE - Internal Control» (ELITechGroup S.p.A., code CTRCPE), une solution stabilisée contenant deux ADN plasmidiques et de l'ARN génomique de phage MS2.

Pour procéder à l'amplification en temps réel avec le 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument, il est recommandé d'utiliser des produits génériques «Q - PCR Microplates Fast» (ELITechGroup S.p.A., code RTSACC02), contenant des microplaques avec puits de 0,1 mL et des films adhésifs optiques.

Pour procéder à l'amplification en temps réel avec le 7500 Real-Time PCR System, il est conseillé d'utiliser les produits «Q - PCR Microplates» (ELITechGroup S.p.A., code RTSACC01), contenant des microplaques avec puits de 0,2 mL et des films adhésifs optiques.

Le «MRSA / SA - Positive Control» (ELITechGroup S.p.A., code M800356) doit être employé en tant que contrôle positif d'amplification de l'ADN plasmidique.

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

Ce produit est destiné uniquement à l'usage *in vitro*.

Avertissements et précautions

Manipuler et éliminer tous les échantillons biologiques comme s'ils pouvaient transmettre des agents infectieux. Éviter le contact direct avec les échantillons biologiques. Éviter les éclaboussures ou les aérosols. Le matériel qui entre en contact avec les échantillons biologiques doit être décontaminé à l'hypochlorite de sodium à 3% pendant au moins 30 minutes ou autoclavé à 121°C pendant une heure avant d'être éliminé.

Manipuler et éliminer tous les réactifs et les matériaux utilisés pour le test comme s'ils pouvaient transmettre des agents infectieux. Éviter le contact direct avec les réactifs. Éviter les éclaboussures ou les aérosols. Les déchets doivent être traités et éliminés conformément aux normes de sécurité. Le matériel jetable combustible doit être incinéré. Les déchets liquides contenant des acides ou des bases doivent être neutralisés avant leur élimination.

Porter des vêtements de protection et des gants ; protéger les yeux et le visage.

Ne jamais pipeter les solutions à la bouche.

Ne pas manger, boire, fumer ou se maquiller dans l'environnement de travail.

Se laver parfaitement les mains après avoir manipulé les échantillons et les réactifs.

Éliminer les réactifs en surplus et les déchets en respectant les réglementations en vigueur.

Lire attentivement toutes les instructions fournies avec le produit avant de procéder au test.

Respecter scrupuleusement les consignes fournies avec le produit pendant l'exécution du test.

Respecter la date de péremption du produit.

N'utiliser que les réactifs présents dans le produit et ceux conseillés par le fabricant.

Ne pas utiliser de réactifs provenant de lots différents.

Ne pas utiliser de réactifs provenant d'autres fabricants.

Avertissements et précautions à adopter en biologie moléculaire

Les procédures de biologie moléculaire, comme l'extraction, l'amplification et la détection d'acides nucléiques, doivent être exécutées par du personnel compétent et ayant reçu une formation appropriée. Ceci afin d'éviter tout risque de résultats erronés, dus en particulier à la dénaturation des acides nucléiques contenus dans les échantillons ou à leur contamination par des produits d'amplification.

Si la session d'amplification est préparée manuellement, il est nécessaire de disposer de locaux distincts pour l'extraction/préparation des réactions d'amplification et pour l'amplification/détection des produits d'amplification. Ne jamais introduire un produit d'amplification dans la zone d'extraction/préparation des réactions d'amplification.

Si la session d'amplification est préparée manuellement, il est nécessaire de disposer de blouses, gants et instruments dédiés pour l'extraction/préparation des réactions d'amplification et pour l'amplification/détection des produits d'amplification. Ne jamais transférer les blouses, gants et instruments de la zone dédiée à l'amplification/révélation des produits d'amplification vers la zone dédiée à l'extraction/préparation des réactions d'amplification.

Les échantillons ne doivent être utilisés que pour ce type d'analyse. Les échantillons doivent être manipulés sous une hotte à flux laminaire. Les tubes contenant des échantillons différents ne doivent jamais être ouverts simultanément. Les pipettes utilisées pour manipuler les échantillons ne doivent servir qu'à cet usage exclusif. Les pipettes doivent être de type à distribution positive ou utiliser des embouts à filtre pour aérosol. Les embouts utilisés doivent être stériles, dépourvus de DNase, RNase, d'ADN et d'ARN.

Les pipettes utilisées pour manipuler les réactifs ne doivent servir qu'à cet usage exclusif. Les pipettes doivent être de type à distribution positive ou utiliser des embouts à filtre pour aérosol. Les embouts utilisés doivent être stériles, dépourvus de DNase, RNase, d'ADN et d'ARN.

Les produits d'amplification doivent être manipulés de façon à en limiter le plus possible la dispersion dans l'environnement afin d'éviter tout risque de contamination. Les pipettes utilisées pour manipuler les produits d'amplification ne doivent servir qu'à cet usage.

Avertissements et précautions concernant les composants

Le MRSA/SA PCR Mix doit être conservé à -20 °C et à l'abri de la lumière.

Le MRSA/SA PCR Mix peut supporter jusqu'à cinq cycles de congélation/décongélation. Tout cycle supplémentaire risque d'entraîner une perte des performances du produit.

ELiTe InGenius®

ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES

Échantillons

Ce produit est validé pour une utilisation avec les échantillons cliniques suivants:

Les échantillons destinés à l'extraction de l'ADN doivent être prélevés en utilisant ces deux systèmes:

Le «**eNAT™ kit**» (COPAN Italia S.p.A., code 608CS01R) pour l'extraction de l'ADN et l'identification selon les indications du laboratoire. Les écouvillons nasaux doivent être transportés et stockés à +2/+8 C pendant un maximum de 4 semaines. Les échantillons doivent être congelés et stockés à -20 C pendant un maximum de six mois ou à -70 C pour une période de temps plus longue. Avant de passer à l'analyse avec ce produit, déposer 0,2 mL d'échantillon en milieu de transport eNAT™ dans le tube de sonication, fourni avec «**ELiTe InGenius Sonication tubes**».

Le «**eSwab Collection Kit**» (COPAN Italia S.p.A., réf. 480CE) pour l'extraction de l'ADN et l'identification selon les indications du laboratoire. Les écouvillons nasaux doivent être transportés et stockés à +2/+8 C pendant un maximum de trois jours, et stockés à -20 C pendant un maximum de six mois ou à -70 C pour une période de temps plus longue. Avant de passer à l'analyse avec ce produit, déposer 0,2 mL d'échantillon en milieu de transport eNAT™ dans le tube de sonication, fourni avec «**ELiTe InGenius Sonication tubes**».

Remarque: lors de l'extraction de l'ADN d'échantillons de tampon rectal avec **ELiTe InGenius** et avec **ELiTe InGenius Software** version 1.2 (ou versions ultérieures équivalentes), utiliser l'Assay protocol **MRSA-SA ELiTe_NS_200_50**. Ce protocole traite 200 µL d'échantillon, en ajoutant 10 µL de contrôle interne **CPE** et élué les acides nucléiques dans 50 µL.

Hémocultures

Il est recommandé de prélever et de traiter des échantillons de hémocultures pour l'extraction d'ADN selon les directives du laboratoire. Les échantillons doivent être identifiés conformément aux instructions du laboratoire, transportés et conservés à température ambiante pendant 24 heures maximum.

Avant l'analyse de ce produit pour diluer l'échantillon au 1:1000 dans de l'eau ultrapure pour la biologie moléculaire (au moins 10 µL d'échantillon dans 10 mL d'eau ultrapure) vortex et transférer l'échantillon 0,2 ml dilué dans le tube de sonication fournie par «**ELiTe InGenius Sonication tubes**».

Il est conseillé de diviser les échantillons à conserver congelés en plusieurs aliquotes afin de ne pas les soumettre à des cycles répétés de congélation / décongélation. Lors de l'utilisation d'échantillons congelés, décongeler les échantillons immédiatement avant l'extraction pour éviter la dégradation possible des acides nucléiques.

Remarque: Lors de l'extraction d'ADN à partir d'échantillons de hémocultures avec **Elite InGenius** et avec **ELiTe InGenius Software** version 1.2 (ou versions ultérieures équivalentes), utiliser le protocole d'extraction **MRSA-SA ELiTe_BC_200_100**. Ce protocole traite 200 µL d'échantillon, ajoute CPE avec 10 µL / extraction et élué les acides nucléiques dans 100 µL.

Substances interférentes

Aucune donnée n'est disponible concernant d'éventuelles inhibitions par d'autres médicaments antiviraux, antibiotiques, chimiothérapeutiques ou immunosuppresseurs.

La présence d'une importante quantité d'ADN génomique humain dans l'ADN obtenu à partir des échantillons, pourrait inhiber la réaction d'amplification.

Contrôles d'amplification

Avant d'analyser un échantillon avec le produit, il est impératif de générer et valider les contrôles d'amplification concernant le lot de réactif d'amplification que l'on souhaite utiliser :

- comme contrôle positif d'amplification, utiliser le **MRSA-SA - ELiTe Positive Control** (non fourni), avec l'Assay protocol «**MRSA-SA ELiTe_PC**»,
- comme contrôle négatif d'amplification, utiliser de l'eau ultra-pure pour biologie moléculaire (non incluse dans le kit), avec l'Assay protocol «**MRSA-SA ELiTe_NC**».

Remarque: le système **ELiTe InGenius** exige la présence de résultats approuvés et valables des contrôles d'amplification pour chaque lot de réactif d'amplification mémorisé dans sa base de données. Les résultats des contrôles de l'amplification, approuvés et mémorisés dans la base de données, expireront après 15 jours. À la date de péremption, il faudra refaire l'analyse des contrôles positifs et négatifs avec le lot de réactif d'amplification.

De plus, les contrôles d'amplification doivent être refaits dans les cas suivants:

- utilisation d'un nouveau lot de réactifs d'amplification,
- les résultats des analyses des contrôles de la qualité (voir paragraphe suivant) ne sont pas conformes aux spécifications,
- une intervention de maintenance a été exécutée sur l'instrument **ELiTe InGenius**.

Contrôles de la qualité

- Pour chaque session d'extraction et d'amplification, il est recommandé de valider toute la procédure d'analyse en utilisant un échantillon négatif et un échantillon positif déjà testés ou du matériel de référence calibré.

Des contrôles externes doivent être utilisés conformément aux lois locales, nationales, fédérales d'organisation créditées, selon le cas.

PROCÉDURE

La procédure d'utilisation du produit «**MRSA/SA - ELiTe MGB® Kit**» avec le système **ELiTe InGenius** est formée de trois étapes:

- vérification que le système est prêt,
- préparation de la session,
- examen et approbation des résultats.

Vérification que le système est prêt

- Avant de commencer la session, en se reportant à la documentation de l'instrument, il faut :
 - allumer **ELiTe InGenius** et accéder au système avec le mode «**FERMÉ**»;
 - vérifier que les résultats des contrôles d'amplification (**MRSA/SA - Positive Control**, **MRSA/SA - Negative Control**) soient présents, approuvés et non périmés (*Status*) pour le lot de réactif d'amplification que l'on souhaite utiliser. En cas d'absence de résultats des contrôles d'amplification approuvés et valables, procéder comme suit pour les générer;
 - choisir le type de passage en suivant les instructions de l'interface graphique (IG) pour paramétrer la session, en utilisant les *Assay protocol* fournis par ELiTechGroup S.p.A. Ces protocoles IVD ont été validés spécifiquement avec les produits **ELiTe MGB Kit**, l'instrument **ELiTe InGenius** et la matrice indiquée. L'*Assay protocol* pour l'analyse des échantillons cliniques, disponible pour le produit «**MRSA/SA ELiTe MGB® Kit**», est décrit dans le tableau suivant.

Protocole du test pour MRSA/SA ELiTe MGB® Kit			
Nom	Matrice	Résultat	Caractéristiques
MRSA-SA ELiTe_NS_200_50	Écouvillons nasaux	Positif / négatif	Volume initial d'extraction: 200 µL Volume d'élution de l'extraction: 50 µL Contrôle interne: 10 µL Sonication: 1 cycle, 5 secondes ON Volume PCR Mix: 20 µL Volume de l'échantillon dans PCR: 10 µL
MRSA-SA ELiTe_BC_200_100	Hémocultures	Positif / négatif	Volume initial d'extraction: 200 µL Volume d'élution de l'extraction: 100 µL Contrôle interne: 10 µL Sonication: NO Volume PCR Mix: 20 µL Volume de l'échantillon dans PCR: 10 µL

Si l'*Assay protocol* concerné ne se trouve pas dans le système, contacter le service Clients local d'ELiTechGroup.

Préparation de la session

Le produit MRSA/SA ELITE MGB® Kit associé au système ELITE InGenius peut être utilisé pour exécuter :

- Passage intégré (Extraction + PCR),
- Passage d'amplification (PCR seulement),
- Passage d'amplification pour le contrôle positif et le contrôle négatif (PCR seulement).

Tous les paramètres nécessaires pour exécuter la session sont inclus dans l'Assay protocol disponible sur l'instrument et sont affichés automatiquement lorsqu'on sélectionne l'Assay protocol.

Remarque: le système ELITE InGenius peut être relié au «*Location Information Server*» (LIS) qui lui permet d'envoyer les informations de paramétrage de la session. Pour plus d'informations, voir la notice d'instructions de l'instrument.

Les principales opérations pour le paramétrage des trois types de passage sont décrites ci-après.

A Passage intégré

Pour programmer le passage intégré, exécuter les indications suivantes, fournies par l'IG:

- Décongeler les tubes de MRSA/SA - PCR Mix pour la session. Chaque tube suffit pour 24 réactions dans les conditions optimales de consommation du réactif. Mélanger délicatement; centrifuger le contenu pendant 5 secondes.
- Décongeler les tubes de CPE pour la session. Chaque tube suffit pour 12 extractions. Mélanger délicatement; centrifuger le contenu pendant 5 secondes.
- Sélectionner «*Perform Run/Exécuter*» sur la page d'accueil.
- Si l'extraction sera exécutée sur des écouvillons nasaux, s'assurer que l'«*Extraction Input Volume*» est réglé sur 200 µL et l'«*Extracted Elute Volume*» sur 50 µL.
- Si l'extraction sera exécutée sur hémocultures, s'assurer que l'«*Extraction Input Volume*» est réglé sur 200 µL et l'«*Extracted Elute Volume*» sur 100 µL.
- Pour chaque «*Track/Position*» concernée, remplir le «*SampleID*» (SID) en saisissant ou en numérisant le code-barres de l'échantillon.
- Sélectionner l'*Assay protocol* à utiliser dans la colonne «*Assay*» (par exemple, MRSA/SA ELITE_ NS_200_50).
- S'assurer que le «*Protocol*» [Protocole] affiché est: «*Extract + PCR*» [Extraction + PCR].
- Sélectionner la position de chargement de l'échantillon dans la colonne «*Sample Position*» [Emplacement de l'échantillon], puis sélectionner «*Sonicator Tube*» Cliquer sur «*Next/Suivant*» pour passer à l'opération suivante.
- Charger le CPE et la MRSA/SA -PCR Mix dans l'«*Inventory Block*» sélectionné en suivant les instructions fournies par l'IG. Cliquer sur «*Next/Suivant*» pour passer à l'opération suivante.
- Charger et contrôler les compartiments à embouts dans l'«*Inventory Area/Zone* d'inventaire» sélectionnée en suivant les instructions fournies par l'IG. Cliquer sur «*Next/Suivant*» pour passer à l'opération suivante.
- Charger les «*PCR Reaction Cassette/Cassettes PCR*», les cartouches d'extraction «ELITE InGenius SP 200», tous les consommables et les échantillons à extraire dans l'emplacement spécifié au point 8, en suivant les instructions fournies par l'IG. Cliquer sur «*Next/Suivant*» pour passer à l'opération suivante.
- Refermer le volet de l'instrument.
- Appuyer sur «*Start/Démarrage*» pour lancer le passage.

Une fois terminée la session, le système ELITE InGenius permet à l'utilisateur d'afficher, valider et mémoriser les résultats, ainsi que d'imprimer et enregistrer le rapport.

Remarque: À la fin du passage, le reste de l'échantillon extrait dans l'«*Elution Tube*» doit être enlevé de l'instrument; il sera bouché, identifié et conservé à -20 °C. Éviter toute fuite de l'échantillon extrait.

Remarque: À la fin du passage, les «*PCR Cassette/Cassettes PCR*», avec les produits de réaction et les consommables, doivent être enlevés de l'instrument et éliminés sans contaminer l'environnement. Éviter la dispersion des produits de réaction.

Remarque: La PCR Mix peut être conservée dans le bloc réfrigéré pendant **15 heures** maximum (5 sessions de travail de 3 heures chacune).

B Passage d'amplification

Pour programmer le passage d'amplification, exécuter les opérations suivantes, fournies par l'IG:

- Décongeler les tubes de MRSA/SA - PCR Mix pour la session. Chaque tube suffit pour 24 réactions dans les conditions optimales de consommation du réactif. Mélanger délicatement; centrifuger le contenu pendant 5 secondes.
- Sélectionner «*Perform Run/Exécuter*» sur la page d'accueil.
- Même si l'extraction ne sera pas exécutée et si les échantillons de écouvillons nasaux sont traités , s'assurer que l'«*Extraction Input Volume*» est réglé sur 200 µL et l'«*Extracted Elute Volume*» sur 50 µL.
- Même si l'extraction ne sera pas exécutée et si les échantillons de hémocultures sont traités, s'assurer que l'«*Extraction Input Volume*» est réglé sur 200 µL et l'«*Extracted Elute Volume*» sur 100 µL.
- Pour chaque «*Track/Position*» concernée, remplir le SID en saisissant ou en numérisant le code-barres de l'échantillon.
- Sélectionner l'*Assay protocol* à utiliser dans la colonne «*Assay*» (par exemple, MRSA/SA ELITE_ NS_200_50).
- Sélectionner «*PCR Only/PCR seulement*» dans la colonne «*Protocol/Protocole*».
- S'assurer que l'emplacement de chargement de l'échantillon dans la colonne «*Sample Position/Emplacement échantillon*» est réglé sur «*ExtraTube/Extra tube (bottom row/ligne du bas)*». Cliquer sur «*Next/Suivant*» pour passer à l'opération suivante.
- Charger la MRSA/SA - PCR Mix dans l'«*Inventory Block/Partie d'inventaire*» sélectionné en suivant les instructions fournies par l'IG. Cliquer sur «*Next/Suivant*» pour passer à l'opération suivante.
- Charger et contrôler les compartiments à embouts dans l'«*Inventory Area/Zone* d'inventaire» sélectionnée en suivant les instructions fournies par l'IG. Cliquer sur «*Next/Suivant*» pour passer à l'opération suivante.
- Charger les «*PCR Cassette*» et les échantillons des acides nucléiques extraits, en suivant les instructions fournies par l'IG. Cliquer sur le bouton «*Next/Suivant*» pour passer à l'opération suivante.
- Fermer la porte de l'instrument.
- Appuyer sur «*Start/Démarrage*» pour commencer le passage.

Une fois terminée la procédure, le système ELITE InGenius permet d'afficher, valider et mémoriser les résultats, ainsi que d'imprimer et enregistrer le rapport.

Remarque: À la fin du passage, le reste de l'échantillon dans le tube d'élution «*Elution Tube*» doit être enlevé de l'instrument; il sera bouché, identifié et conservé à -20 °C. Éviter toute fuite de l'échantillon extrait.

Remarque: À la fin du passage, les «*PCR Cassette/Cassettes PCR*», avec les produits de réaction et les consommables, doivent être enlevés de l'instrument et éliminés sans contaminer l'environnement. Éviter la dispersion des produits de réaction.

Remarque: La PCR Mix peut être conservée dans le bloc réfrigéré pendant **15 heures** maximum (5 sessions de travail de 3 heures chacune).

C. Passage d'amplification pour le contrôle positif et le contrôle négatif

Pour programmer le passage d'amplification du contrôle positif et du contrôle négatif, suivre les indications suivantes, fournies par l'IG :

1. Décongeler le tube de MRSA/SA - PCR Mix pour la session. Chaque tube suffit pour préparer 24 réactions dans les conditions optimales d'utilisation du réactif. Mélanger délicatement ; centrifuger le contenu pendant 5 secondes.
2. Décongeler le tube de MRSA/SA - Positive Control et LGA251/SA - Positive Control pour la session. Chaque tube suffit pour 4 sessions. Mélanger délicatement ; centrifuger le contenu pendant 5 secondes.
3. Transférer au moins 30 µL d'eau ultra-pure pour biologie moléculaire dans un «*Elution tube*», fourni avec ELITE InGenius SP 200 Consumable Set.
4. Sélectionner «*Perform Run/Exécuter*» sur la page d'accueil.
5. Même si l'extraction ne sera pas exécutée, s'assurer que l'«*Extraction Input Volume*» est réglé sur 200 µL et l'«*Extracted Elute Volume*» sur 100 µL.
6. Dans les «*Track/Position*» concernées, sélectionner l'*Assay protocol* à utiliser dans la colonne «*Assay*».
7. Pour le contrôle positif, sélectionner le protocole MRSA/SA ELITE_PC dans la colonne «*Assay*»; puis saisir le numéro de lot et la date de péremption du MRSA/SA - Positive Control.
8. Pour le contrôle négatif, sélectionner le protocole du test MRSA/SA ELITE_NC dans la colonne «*Assay*»; puis saisir le numéro de lot et la date de péremption de l'eau ultra-pure pour biologie moléculaire.
9. Cliquer sur «*Next/Suivant*» pour continuer la programmation.
10. Charger la MRSA/SA - PCR Mix dans l'«*Inventory Block/Partie d'inventaire*» sélectionné en suivant les instructions fournies par l'IG. Cliquer sur «*Next/Suivant*» pour passer à l'opération suivante.
11. Charger/contrôler les compartiments à embouts dans l'«*Inventory Area/Zone d'inventaire*» en suivant les instructions fournies par l'IG. Cliquer sur «*Next/Suivant*» pour passer à l'opération suivante.
12. Charger les «*PCR Cassette/Cassettes PCR*», ainsi que les deux tubes de Positive Control (MRSA/SA e LGA251/SA) et le tube du contrôle négatif en suivant les instructions fournies par l'IG. Cliquer sur le bouton «*Next/Suivant*» pour passer à l'opération suivante.
13. Fermer la porte de l'instrument.
14. Appuyer sur «*Start/Démarrage*» pour commencer le passage.

Une fois terminée la procédure, l'ELITE InGenius permet d'afficher, valider et mémoriser les résultats, ainsi que d'imprimer et enregistrer le rapport.

Remarque: Les résultats des tests des contrôles positifs et négatifs exécutés sont utilisés par le logiciel de l'instrument pour compiler le «*Control Chart/Graphique de contrôle*». Quatre résultats des contrôles positifs et négatifs, issus de quatre sessions différentes, sont nécessaires pour configurer le graphique de contrôle. Les résultats suivants des contrôles positifs et négatifs sont utilisés pour suivre les performances au cours de l'étape d'amplification. Voir la Notice d'utilisation de l'instrument pour plus de détails.

Remarque: À la fin du passage, le reste des contrôles positifs doit être enlevé de l'instrument; il sera bouché, identifié et conservé à -20 C. Éviter toute fuite du contrôle positif. Le reste du contrôle négatif doit être éliminé.

Remarque: À la fin du passage, les «*PCR Cassette/Cassettes PCR*», avec les produits de réaction et les consommables, doivent être enlevées de l'instrument et éliminées sans contaminer l'environnement. Éviter la dispersion des produits de réaction.

Remarque: La PCR Mix peut être conservée dans le bloc réfrigéré pendant **15 heures** maximum (5 sessions de travail de 3 heures chacune).

Examen et approbation des résultats

À la fin du passage, l'écran «*Results Display/Page des résultats*» est affiché automatiquement. Cet écran affiche les résultats concernant l'échantillon/contrôle, ainsi que les informations concernant le passage. Sur cet écran, il est possible de valider le résultat, ainsi qu'imprimer et enregistrer les rapports («*Sample Report/Rapport échantillon*» ou «*Track Report/Rapport position*»). Pour plus d'informations, voir la notice d'instructions de l'instrument.

Remarque: le système ELITE InGenius peut être relié à un système d'interface LIS; ce dernier permet d'envoyer automatiquement les résultats approuvés au centre de traitement des données du laboratoire. Pour plus d'informations, voir la notice d'instructions de l'instrument.

Le système ELITE InGenius génère les résultats avec le produit «**MRSA/SA ELITE MGB® Kit**» par le biais de cette procédure:

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

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

Les signaux de fluorescence émis par les sondes spécifiques des gènes mecA et mecC (mecA) et du gène SA (SA), au cours de la réaction d'amplification des contrôles positifs et négatifs, sont analysés automatiquement et interprétés par le logiciel de l'instrument à l'aide des paramètres inclus dans les *Assay protocols* "MRSA/SA ELITE_PC" et "MRSA/SA ELITE_NC".

Les résultats du contrôle positif et du contrôle négatif d'amplification, spécifiques du lot de réactif d'amplification, sont mémorisés dans la base de données (*Controls*); ils peuvent être affichés et approuvés par le personnel avec la qualification d'«*Administrator/Administrateur*» ou d'«*Analyst/Analyste*», en suivant les instructions fournies par l'IG.

Les résultats du contrôle positif et du contrôle négatif d'amplification, spécifiques pour le lot du réactif d'amplification, expirent **après 15 jours**.

Avant d'analyser un échantillon, il est nécessaire de vérifier la présence des résultats de l'amplification du contrôle positif et du contrôle négatif, approuvés et valides pour le lot de PCR Mix que l'on souhaite utiliser. La disponibilité du résultat du contrôle positif et du contrôle négatif d'amplification «*Approved/Approuvé*» (*Status/Statut*) est affichée sur la fenêtre «*Controls/Contrôles*» de l'IG. Si aucun résultat du contrôle positif et du contrôle négatif d'amplification approuvé et valide n'est présent, il faut les générer ainsi que nous l'avons décrit plus haut.

Remarque: Lorsqu'un résultat d'amplification du contrôle positif ou du contrôle négatif ne satisfait pas les critères d'acceptation, l'instrument affiche le message «*not passed/non passé*» sur l'écran «*Controls/Contrôles*»: il ne sera pas possible de l'approuver. Dans ce cas, la réaction d'amplification du contrôle positif ou du contrôle négatif doit être refaite.

Remarque: Si le contrôle positif ou le contrôle négatif est traité en même temps que les échantillons à analyser et que le résultat n'est pas valide, toute la session n'est pas valide. Dans ce cas, l'amplification des échantillons doit être également refaite.

B. Validation des résultats de l'échantillon

Les signaux de fluorescence émis par les sondes spécifiques pour gènes mecA et mecC (mecA), ainsi que pour le gène SA (SA), et par la sonde pour le contrôle interne (CI) au cours des réactions d'amplification des échantillons sont analysés automatiquement et interprétés par le logiciel de l'instrument à l'aide des paramètres inclus dans l'*Assay protocol*.

Remarque: Avant d'analyser un échantillon, vérifier la présence de résultats des contrôles d'amplification approuvés et valides pour le lot de réactif d'amplification que l'on souhaite utiliser. La disponibilité des résultats des contrôles d'amplification «*Approved/Approuvé*» (*Status/Statut*) est affichée sur la fenêtre «*Controls/Contrôles*» de l'IG. Si aucun résultat des contrôles d'amplification approuvé et valide n'est présent, il faut les générer ainsi que nous l'avons décrit plus haut.

Les résultats sont affichés dans les rapports générés par l'instrument («*Result Display*/Écran des résultats»).

Le passage de l'échantillon peut être approuvé lorsque les deux conditions mentionnées dans le tableau ci-après sont satisfaites.

1) Contrôle positif	Statut
MRSA/SA - Positive Control	APPROVED
LGA251/SA - Positive Control	APPROVED
2) Contrôle négatif	Statut
MRSA/SA - Negative Control	APPROVED

Pour chaque échantillon, le résultat de l'analyse est interprété automatiquement par le système, ainsi que l'établit l'algorithme de l'**ELITE InGenius software**, et par les paramètres de l'*Assay protocol*.

Les éventuels messages concernant le résultat d'un échantillon sont indiqués sur le tableau ci-après.

Résultat du passage de l'échantillon	Interprétation
MRSA Detected.	L'ADN de MRSA/SA a été décelé dans l'échantillon.
MRSA/SA Not Detected or below LoD	L'ADN de MRSA/SA n'a pas été décelé dans l'échantillon. L'échantillon est négatif pour ce gène ou sa présence est inférieure au seuil de détection du produit.
MRSA Not Detected or below LoD, SA Detected	L'ADN de MRSA n'a pas été décelé dans l'échantillon. L'échantillon est négatif pour ce gène ou sa présence est inférieure au seuil de détection du produit. L'ADN de SA a été décelé.
Invalid - Retest Sample	Résultat du test non valide à cause d'un problème avec le contrôle interne (extraction erronée ou présence d'un inhibiteur).

Les échantillons dont les résultats ne peuvent pas être interprétés sont indiqués comme «Non valide - Retester l'échantillon» par le logiciel **ELITE InGenius**. Dans ce cas, l'ADN du Contrôle interne n'a pas été détecté correctement et des problèmes sont apparus pendant la phase d'amplification ou lors de la phase d'extraction (altération de l'ADN, perte de l'ADN pendant l'extraction ou présence d'inhibiteurs). Ces problèmes peuvent engendrer des résultats erronés et des faux négatifs.

Lorsque le volume de l'éluat est suffisant, l'échantillon extrait peut être réanalysé à l'aide de l'amplification en mode «PCR seulement». Si le résultat non valide est confirmé, l'échantillon doit être retesté à partir de l'extraction d'un nouveau tube en utilisant le mode «Extract + PCR».

Les échantillons appropriés dans lesquels l'ADN de MRSA/SA n'a pas été détecté sont signalés comme «*DNA Not Detected or below LoD*/ADN non détecté ou inférieur à LoD». Dans ce cas, il n'est pas exclu que l'ADN de MRSA/SA soit présent à un titre inférieur au seuil de détection du produit (voir paragraphe «Performances»).

Remarque: Les résultats obtenus avec ce test doivent être interprétés compte tenu de tout le tableau clinique et des autres résultats des examens de laboratoire concernant le patient.

Les résultats du passage de l'échantillon sont mémorisés dans la base de données et, s'ils sont valides, ils peuvent être approuvés (*Result Display*) par le personnel ayant la qualification d'«Administrateur» ou d'«Analyste» conformément aux instructions de l'IG. Sur la fenêtre «*Result Display*/Écran des résultats», il est possible d'imprimer et d'enregistrer les résultats de la session comme «*Sample Report*/Rapport échantillon» et «*Track Report*/Rapport position».

C. Compte-rendu des résultats de l'échantillon

Les résultats de l'échantillon sont mémorisés dans la base de données et ils peuvent être exportés comme «*Sample Report*/Rapport échantillon» et «*Track Report*/Rapport position».

Le «*Sample Report*/Rapport échantillon» montre les détails d'une session de travail pour les échantillons sélectionnés (SID).

Le «*Track Report*/Rapport position» montre les détails d'une session de travail pour les positions sélectionnées.

Les «*Sample Report*/Rapport échantillon» et les «*Track Report*/Rapport position» peuvent être imprimés et signés par le personnel agréé.

PERFORMANCES

Sensibilité analytique: seuil de détection

La sensibilité analytique de ce test (LoD), ou le seuil de détection, permet de détecter la présence d'environ 20 copies dans les 10 µL d'ADN ajoutés à la réaction d'amplification.

La sensibilité analytique du test, ou le seuil de détection, a été testée à partir d'un ADN plasmidique contenant le produit d'amplification, dont la concentration initiale a été mesurée au spectrophotomètre. L'ADN plasmidique a été dilué à un titre de 10 copies/10 µL en présence de 40000 copies de contrôle interne (CI)/10 µL. Cet échantillon a été amplifié 18 fois, avec les produits fabriqués par ELITechGroup S.p.A, sur deux instruments différents.

Les résultats finaux sont résumés dans le tableau suivant.

Échantillons	N	positifs	négatifs	Mec A Ct media	SA Ct media
20 copies de plasmides MRSA/SA ADN + 40 000 copies de CI	18	17	1	35,04	34,43
20 copies de plasmides LGA251/SA ADN + 40 000 copies de CI	18	18	0	34,75	34,12

Sensibilité analytique: reproductibilité avec matériel de référence certifié

La sensibilité analytique du test, comme reproductibilité des valeurs d'un matériel de référence calibré, a été évaluée en utilisant comme matériel de référence le panel calibré «QCMD 2014 Methicillin Resistant S. aureus EQA» (Qnostics, Ltd, Royaume-Uni) et un panel de dilutions de MRSA/SA à des concentrations limites. Chaque échantillon du panel a été testé dans 2 réplifications en exécutant toute la procédure d'analyse, extraction, amplification, détection et interprétation des résultats avec «**ELITE InGenius**» et les produits fabriqués par ELITechGroup S.p.A.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant.

Essais avec matériel de référence calibré et «ELITE InGenius»			
Échantillon	Contenu de l'échantillon	Résultats attendus	Résultats obtenus
MRSADNA14-01	MRSA N315	MRSA déterminé	MRSA déterminé
MRSADNA14-02	MSSA ATCC 29213	MRSA négatif	MRSA négatif
MRSADNA14-03	MSSA 29213 + MRCoNS 634	MRSA négatif	MRSA négatif
MRSADNA14-04	E. coli ATCC 35218	MRSA négatif	MRSA négatif
MRSADNA14-05	MRSA N315	MRSA fréquemment déterminé	MRSA déterminé
MRSADNA14-06	MHB seulement	MRSA négatif	MRSA négatif
MRSADNA14-07	MRSA N315	MRSA non fréquemment déterminé	MRSA déterminé
MRSADNA14-08	MRSA mecC	MRSA non fréquemment déterminé	MRSA déterminé
MRSADNA14-09	MRCoNS 634	MRSA négatif	MRSA négatif
MRSADNA14-10	MRSA ST398	MRSA déterminé	MRSA déterminé
MRSADNA14-11	MRSA N315	MRSA fréquemment déterminé	MRSA déterminé
MRSADNA14-12	MRSA N315	MRSA déterminé	MRSA déterminé

Tous les échantillons ont été déterminés correctement.

La sensibilité analytique du test, comme reproductibilité des valeurs d'un matériel de référence calibré, a été évaluée en utilisant comme matériel de référence le panel NATrol™ MRSA/SA (Zeptometrix, États-Unis), panel de *S. aureus* ou *S. epidermidis*. Chaque échantillon du panel a été testé dans 2 répliqués en exécutant toute la procédure d'analyse, extraction, amplification, détection et interprétation des résultats avec «ELITE InGenius» et les produits fabriqués par ELITechGroup S.p.A.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant.

Essais avec matériel de référence calibré et «ELITE InGenius»		
Échantillon	Résultats attendus	Résultats obtenus
S. aureus_MRSA Community Strain	MRSA Positif	MRSA déterminé
S. aureus_MRSA Hospital Strain	MRSA Positif	MRSA déterminé
S. aureus_MSSA	MSSA Positif	MSSA déterminé
S. aureus_MSSA – empty cassette	MSSA Positif	MSSA déterminé
S. epidermidis_MSSE HER 1292	Négatif	Négatif

Tous les échantillons ont été déterminés correctement.

Sensibilité diagnostique: confirmation d'échantillons positifs

La sensibilité diagnostique du test, entendue comme confirmation d'échantillons cliniques positifs, a été évaluée en utilisant plusieurs échantillons cliniques d'écouvillons nasaux et des hémocultures positifs pour MRSA et MSSA.

La sensibilité diagnostique du test a été évaluée en utilisant 60 échantillons d'écouvillons nasaux positifs pour MSSA, 21 échantillon d'écouvillons nasaux positifs pour MRSA, et 20 écouvillons nasaux positifs pour MRSA avec l'ajout de MRSA BAA-1556 (ATCC) à un titre de 100 000 UFC/mL.

La sensibilité diagnostique du test a également été évaluée à l'aide de 39 hémocultures positives pour le MSSA, 21 prélèvements sanguins positifs pour le MRSA et 10 prélèvements sanguins positivisés avec des isolats de MRSA.

Chaque échantillon a été testé en exécutant toute la procédure d'analyse, extraction, amplification, détection et interprétation des résultats avec «ELITE InGenius» et les produits fabriqués par ELITechGroup S.p.A.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant.

Échantillons	N	positifs	négatifs
Échantillons d'écouvillons nasaux positifs pour l'ADN de MSSA	60	56	4
Échantillons d'écouvillons nasaux positifs pour l'ADN de MRSA	41	40	1
Échantillons d'hémocultures positifs pour l'ADN de MSSA	39	39	0
Échantillons d'hémocultures positifs pour l'ADN de MRSA	31	31	0

Pour les écouvillons nasaux, 56 des 60 échantillons MSSA ont été correctement détectés. 4 échantillons se sont avérés négatifs. 40 des 41 échantillons MRSA ont été correctement détectés. Un échantillon s'est avéré MSSA positif.

La sensibilité diagnostique de ce test en association avec les écouvillons nasaux s'est avérée égale à 93% pour MSSA et à 98% pour MRSA.

Pour les hémocultures, tous les échantillons ont été détectés correctement.

La sensibilité diagnostique de ce test en association avec les hémocultures s'est avérée égale à 100% pour MSSA et à 100% pour MRSA.

La sensibilité diagnostique de ce test s'est avérée égale à 96% pour MSSA et à 99% pour MRSA.

Spécificité diagnostique: confirmation d'échantillons négatifs

La spécificité diagnostique du test, entendue comme confirmation d'échantillons cliniques négatifs, a été évaluée en utilisant 48 échantillons cliniques d'écouvillons nasaux et 34 échantillons cliniques d'hémocultures négatifs pour MRSA/SA.

Chaque échantillon a été testé en exécutant toute la procédure d'analyse, extraction, amplification, détection et interprétation des résultats avec «ELITE InGenius» et les produits fabriqués par ELITechGroup S.p.A.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant.

Échantillons	N	positifs	négatifs
Échantillons d'écouvillons nasaux négatifs pour l'ADN de MRSA/SA	48	0	48
Échantillons d'hémocultures négatifs pour l'ADN de MRSA/SA	34	0	34

Tous les échantillons ont été correctement détectés.

La spécificité diagnostique de ce test s'est avérée égale à 100%.

AUTRES SYSTÈMES

ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES

Échantillons

Ce produit doit être utilisé avec l'ADN extrait à partir d'écouvillons nasaux.

Les échantillons d'écouvillons nasaux destinés à l'extraction de l'ADN doivent être prélevés à l'aide de tampons «BBL CultureSwab Plus Amies Gel without Charcoal swabs» (Becton-Dickinson) et identifiés suivant les lignes de conduite du laboratoire. Les échantillons d'écouvillons nasaux doivent être transportés et stockés à +18/+25°C pendant un jour au maximum; autrement, ils doivent être stockés à +2/+8 C pendant un maximum de sept jours. Avant d'entamer la procédure d'extraction, les échantillons d'écouvillons nasaux doivent être ensemencés dans 1 mL de Bouillon Trypticase Soja (TSB - Soy Broth Trypticase) et vortexé pendant 10 secondes.

Remarque: lors de l'extraction de l'ADN avec le système «NucliSENS® easyMAG®», respecter la configuration suivante.

- Définir comme suit les paramètres d'extraction: - Matrice = Autre;
 - Protocole = Générique 2.0.1;
 - Volume (mL) = 1,0 mL;
 - Eluat (µL) = 50 µL;
 - Type = Primaire.

Transférer **1 mL** de chaque échantillon de TSB dans le récipient jetable à 8 puits, comme prévu dans la feuille de travail de l'instrument, et distribuer le tampon de lyse. Pendant les 10 minutes d'incubation, préparer la suspension de silice magnétique pour 8 échantillons, en mélangeant **550 µL de silice magnétique NucliSENS® easyMAG®, 540 µL d'eau pour biologie moléculaire** et **5 µL de CPE**. Pour chaque échantillon, utiliser le pipetteur BioHit pour transférer 125 µL de suspension de silice magnétique dans le NucliSENS easyMAG Strip for Premix. Utiliser le pipetteur BioHit pour transférer 100 µL de suspension de silice magnétique dans chaque échantillon, dans le récipient jetable à 8 puits; mélanger soigneusement en pipetant à trois reprises, puis commencer la procédure d'extraction.

Substances interférentes

Le propylène glycol et des quantités excessives de sécrétions nasales/mucus sont susceptibles d'interférer avec la détection du SA et du MRSA par le «**MRSA/SA - ELITE MGB® Kit**» et d'engendrer des résultats potentiellement erronés.

Hormis le propylène glycol, il a été démontré que les substances exogènes énumérées ci-dessous n'interfèrent pas avec la détection du SA ou du MRSA par le «**MRSA / SA - ELITE MGB® Kit**». Ces substances sont trouvées dans les médicaments décongestionnants ou sont utilisées pour soulager la sécheresse et/ou l'irritation nasale. Il a été démontré que la présence de sang humain dans les échantillons n'interfère pas avec la détection du MRSA ou du SA par le «**MRSA/SA - ELITE MGB® Kit**» utilisé avec le «**NucliSENS® easyMAG®**».

Substance potentiellement interférante (Type)	Ingrédient actif	Interférence ?
Mucine isolée de la glande sous-maxillaire bovine, type I-S	Protéine de mucine purifiée	Non
Sang (humain)	Hémoglobine	Non
Sprays ou gouttes pour le nez	Phényléphrine	Non
	Oxymétazoline	Non
	Chlorure de sodium avec conservateurs	Non
	Chlorure de benzalkonium	Non
	Phosphate de sodium	Non
	Phénylcarbinol	Non
	Propylène glycol	Oui
	Sorbitol, alcool benzylique	Non
	Edétate disodique, hypromellose	Non
	Acide phosphorique	Non
Corticostéroïdes pour le nez	Dexaméthasone	Non
	Triamcinolone	Non
	Béclométhasone	Non
	Flunisolide	Non
	Budésonide	Non
	Mométasone	Non
Gel pour le nez	Fluticasone	Non
	Luffa operculata, soufre	Non
Médicament homéopathique anti-allergique	Galphimia glauca	Non
	Histaminum hydrochloricum	Non
Vaccin	Vaccin vivant intranasal contre le virus de la grippe	Non
Pastilles pour la gorge, à action anesthésique ou analgésique par voie orale	Benzocaïne, Menthol	Non
Médicaments antiviraux	Zanamivir, Oseltamivir phosphate	Non
Antibiotique, pommade nasale	Mupirocin	Non
Antibactérien, systémique	Tobramycine	Non

L'étude des substances interférentes a été effectuée avec l'extracteur NucliSENS® easyMAG® et le thermocycleur programmable 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument avec la version précédente du produit «**MRSA / SA ELITE MGB® Kit**» qui ne contenait pas d'oligonucléotides spécifiques au gène *mecC*.

Aucune donnée n'est disponible concernant d'éventuelles inhibitions par d'autres médicaments antiviraux, antibiotiques, chimiothérapeutiques ou immunosuppresseurs.

La présence d'une importante quantité d'ADN génomique humain dans l'ADN obtenu à partir des échantillons, pourrait inhiber la réaction d'amplification.

Contrôles d'amplification

Chaque session d'amplification doit impérativement être validée en préparant une réaction pour le contrôle négatif et une réaction pour le contrôle positif.

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

Pour le contrôle positif, utiliser le «**MRSA / SA - Positive Control**» (non fourni).

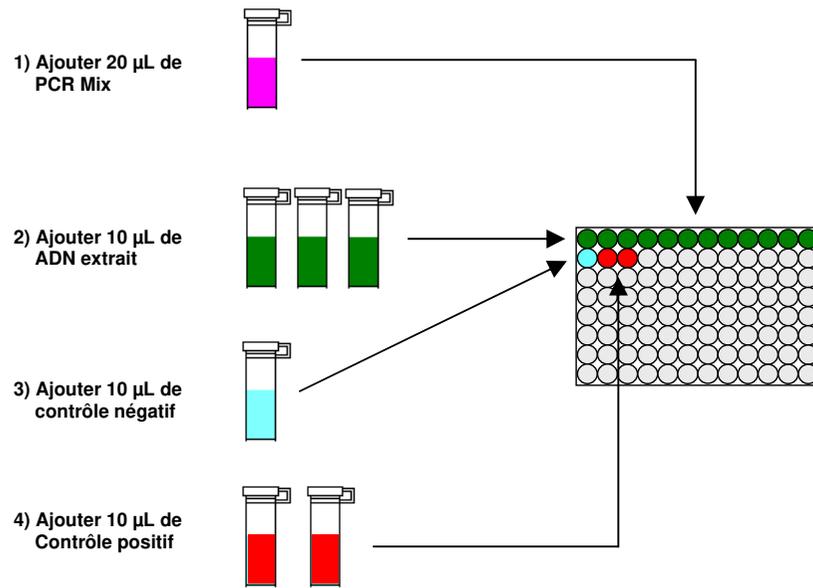
Contrôles de la qualité

Pour chaque session d'extraction et d'amplification, il est recommandé de valider toute la procédure d'analyse en utilisant un échantillon négatif et un échantillon positif déjà testés ou du matériel de référence calibré.

- Conformément à la **Grille de travail**, ajouter au mélange réactionnel **10 µL de LGA251 Positive Control** dans le puits correspondant au contrôle positif LGA251. Mélanger soigneusement l'échantillon en pipetant trois fois le **LGA251 Positive Control** dans le mélange réactionnel. Éviter la formation de bulles d'air.
- Sceller soigneusement l'**Amplification microplate** à l'aide de l'**Amplification Sealing Sheet** (feuille adhésive d'amplification).
- Transférer l'**Amplification microplate** dans le thermocycleur à temps réel, placé dans la zone des produits d'amplification/révélation, et lancer le cycle de températures d'amplification. Sauvegarder le paramétrage de la session dans un fichier au nom univoque et identifiable (par exemple, «année-mois-jour-MRSA/SA-ELITECHGROUP»).

Remarque: à la fin du cycle de températures, retirer l'**Amplification microplate** contenant les produits de réaction et la jeter en évitant de contaminer l'environnement. Ne jamais retirer l'**Amplification Sealing Sheet** de l'**Amplification microplate** afin d'éviter toute fuite des produits de réaction.

La figure ci-dessous illustre la préparation d'une réaction d'amplification.



Analyse qualitative des résultats

La fluorescence émise, lors de l'amplification, par la sonde du gène spécifique à SA (détecteur TAMRA «SA»), par les sondes des gènes *meCA* et *meCALGA251* (détecteur FAM «meCA»), et par la sonde du contrôle interne (détecteur Cy5 «IC») doivent être analysées à l'aide du logiciel de l'instrument.

Avant de procéder à l'analyse, consulter la documentation livrée par le fabricant de l'instrument et:
 - pour tous les détecteurs, configurer les **paramètres d'analyse/Analysis Settings** (Results > Amplification plot > delta Rn vs. Cycle) sur **Auto Baseline** et **Manual Ct**, avec le **seuil (Threshold)** programmé à **0,1**. Appuyer sur le bouton **Analyse** et **enregistrer** les résultats.

Les valeurs de fluorescence émises par les sondes spécifiques pendant l'amplification et la valeur du **seuil/Threshold** de fluorescence sont utilisées pour déterminer le **Cycle seuil (Ct - Threshold Cycle)**. Le Ct est le cycle où la fluorescence a atteint la valeur de **seuil**; il est proportionnel à la quantité cible de départ.

Pour l'amplification avec le **MRSA/SA Positive Control** et le **LGA251/SA Positive Control**, les valeurs des **Ct** des détecteurs de SA et de *meCA* (Results > Report) servent à valider l'amplification et la détection, comme indiqué dans les tableaux ci-dessous:

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

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

Si le résultat de l'amplification du **Positive Control** est **Ct > 35** ou si le **Ct des détecteurs SA et e meCA est non interprétable** (Undetermined), cela indique que l'ADN cible n'a pas été détecté correctement. Cela signifie que des problèmes pouvant générer des résultats erronés sont apparus pendant la phase d'amplification ou de détection (distribution erronée du mélange de réaction ou des contrôles positifs, dégradation du mélange de réaction ou des contrôles positifs, paramétrage erroné de la position du contrôle positif ou du cycle de température). La session n'est pas valide et doit être refaite à partir de l'amplification.

Pour l'amplification du **Contrôle Négatif**, les valeurs de **Ct** des détecteurs de SA, de *meCA* et du IC (Results > Report) servent à valider l'amplification et la détection, comme indiqué dans le tableau ci-dessous :

Réaction Contrôle Négatif détecteur TAMRA «SA»	Résultat du test	Amplification/Détection
Ct Non interprétable ou Ct > 35	NÉGATIF	CORRECTE

Réaction Contrôle négatif détecteur FAM «meCA»	Résultat du test	Amplification/Détection
Ct Non interprétable ou Ct > 35	NÉGATIF	CORRECTE

Réaction Contrôle Négatif détecteur Cy5 «IC»	Résultat du test	Amplification/Détection
Ct Non interprétable ou Ct ≥ 34	NÉGATIF	CORRECTE

Si le résultat de l'amplification du **contrôle négatif** est **Ct ≤ 35** pour les détecteurs SA ou *meCA* ou **Ct < 34** pour le détecteur IC, cela indique que l'ADN cible n'a pas été détecté correctement. Des problèmes sont apparus pendant l'amplification (contamination) pouvant engendrer des résultats erronés et des faux positifs. La session n'est pas valide et doit être refaite à partir de l'amplification.

Pour chaque réaction d'amplification de l'**échantillon**, les valeurs du **Ct** des détecteurs de *meCA* et SA sont utilisées pour détecter la présence de l'ADN cible et la valeur du **Ct** du contrôle interne est utilisée pour valider l'extraction, l'amplification et la détection.

Remarque: vérifier, à l'aide du logiciel de l'instrument (Results > Amplification plot > delta Rn vs Cycle), que le **Ct** est bien déterminé à partir d'une augmentation rapide et régulière des valeurs de fluorescence et non pas à partir de phénomènes de pic ou d'augmentation du signal de fond (irrégulier ou élevé).

Les Ct des amplification de chaque échantillon (Results > Report) sont utilisés comme indiqué dans le tableau ci-dessous :

Réaction de l'échantillon				Résultat du test	
détecteur TAMRA «SA» (Ct1)	détecteur FAM «mecA» (Ct2)	ΔCt Ct1 – Ct2	détecteur Cy5 «IC»	Résultat SA	Résultat MRSA
Non interprétable ou Ct ≥ 35	Non interprétable ou Ct ≥ 35	NA	Ct ≤ 34	Négatif	Négatif
		NA	Non interprétable ou Ct ≥ 34	Non valide	Non valide
Interprétable, Ct ≤ 35	Non interprétable ou Ct ≥ 35	NA	NA	Positif	Négatif
		ΔCt ≥ 2	NA	Positif	Négatif
		ΔCt < 2	NA	Positif	Positif
Non interprétable ou Ct ≥ 35	Interprétable, Ct ≤ 35	NA	NA	Négatif	Négatif

Résultat du test		Interprétation du résultat
Résultat SA	Résultat MRSA	
Négatif	Négatif	Aucun ADN de SA, ni de MRSA détecté. L'échantillon est supposé négatif pour tous les SA, y compris les MRSA, ou le nombre d'organismes est inférieur au seuil de détection.
Non valide	Non valide	Résultat non valide. Refaire l'analyse à partir de l'extraction du même échantillon ou d'un nouvel échantillon.
Positif	Négatif	Aucun ADN de MRSA détecté. L'échantillon est supposé négatif pour le MRSA ou le nombre de MRSA est inférieur au seuil de détection. ADN de SA détecté. L'échantillon est supposé positif pour les SA.
Positif	Positif	ADN de MRSA détecté. L'échantillon est supposé positif pour les MRSA.

NA = non applicable

La présence des deux marqueurs (gène SA et mecA) à la même quantité relative mesurée à l'aide de la valeur de Ct (une différence de Ct inférieure à 2) est un indice de MRSA (y compris la souche LGA251, récemment identifiée). Des quantités relatives différentes (différences de Ct égales ou supérieures à 2) ou la présence du seul marqueur du gène spécifique à *Staphylococcus aureus* sont des indices de SA.

Si le résultat de l'amplification de l'échantillon est **Ct Non interprétable** ou **Ct > 35** pour les détecteurs SA et mecA, et **Ct Non interprétable** ou **Ct ≥ 34** pour le détecteur IC, cela indique que l'ADN du contrôle interne n'a pas pu être détecté efficacement. Des problèmes sont apparus pendant l'amplification (amplification inefficace ou absente) ou pendant l'extraction (dégradation de l'ADN, perte d'ADN pendant l'extraction ou présence d'inhibiteurs dans l'ADN extrait). Ces problèmes peuvent engendrer des résultats erronés ou des faux négatifs. L'échantillon est inapproprié, la test n'est pas valide et doit être refait à partir de l'extraction du même échantillon ou d'un nouvel échantillon prélevé chez le même patient.

Si le résultat de l'amplification de l'échantillon est **Ct Non interprétable** ou **Ct > 35** pour le détecteur SA et **Ct < 34** pour le détecteur IC, cela indique que l'ADN du SA (y compris du MRSA) n'a pas été détecté dans l'échantillon traité. L'échantillon est supposé négatif ou le nombre de micro-organismes dans l'échantillon est inférieur au seuil de détection du produit (voir «Performances»). Dans ce cas, le résultat pourrait être un faux négatif.

Remarque: lorsque l'ADN du SA ou du MRSA est détecté dans un échantillon, le détecteur CI pourrait présenter un **Ct Non interprétable** ou **Ct ≥ 34**. En effet, la haute efficacité de l'amplification du SA ou du MRSA pourrait être en concurrence avec la faible efficacité de l'amplification du contrôle interne. Dans ce cas, l'échantillon est approprié et le résultat positif du test est valide.

PERFORMANCES

Performances cliniques

Les performances du «MRSA / SA ELITE MGB® Kit» ont été déterminées en comparant le produit en question «MRSA / SA ELITE MGB® Kit» utilisé avec NucliSENS® easyMAG®, à Remel Spectra™ MRSA et/ou à des tests d'agglutination/sensibilité. Un échantillon est défini comme vrai positif pour le MRSA lorsque le MRSA a été identifié à l'aide de toutes les techniques de culture utilisées. Un échantillon est défini comme vrai positif pour le SA sensible à la méthicilline lorsqu'il a été identifié comme négatif à l'aide de toutes les techniques de cultures utilisées à l'exception du test d'agglutination au latex.

Un écouvillon nasal a été collecté chez chaque patient et utilisé pour inoculer une gélose chromogénique sélective pour le dépistage du MRSA (Remel Spectra™ MRSA). Le prélèvement a ensuite été ensemencé dans un bouillon trypticase soja et soigneusement mélangé. La totalité du volume de la suspension cellulaire a été ensuite traitée comme décrit plus haut. Par la suite, chaque prélèvement a été enrichi dans bouillon trypticase-soja complété avec 6,5% de NaCl. Les cultures enrichies ont été ensemencées sur des géloses trypticase-soja sang. Les colonies provenant des géloses trypticase-soja sang ont été utilisées pour le test d'agglutination au latex (Remel Staphaurex®). Conformément aux instructions, les échantillons positifs pour le test d'agglutination au latex ont été utilisés pour le test de susceptibilité à la céfoxitine (BD BBL™ SensiDisc™ Susceptibility Test Disc Cefoxitin 20).

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

Des écouvillons nasaux, provenant de structures sanitaires ou de donneurs sains, ont été collectés et testés suivant une combinaison de tests de culture (décrits auparavant). 20 échantillons positifs en culture pour les MRSA, 20 échantillons positifs en culture pour les SASM et 40 échantillons négatifs pour les SA ont été identifiés. 20 de ces derniers échantillons SA négatifs ont été identifiés comme souche MRSA BAA-2312 (porteuse de la mutation du gène mecA_{LGA251}) proche du niveau LoD (seuil de détection).

Par rapport à la méthode de culture de référence, le «MRSA / SA ELITE MGB® Kit» a identifié 100% des échantillons positifs au MRSA et au MRSA mecA_{LGA251} (sensibilité diagnostique), et 97,5% des échantillons négatifs (spécificité diagnostique). En ce qui concerne les échantillons testés, pour MRSA, la valeur prédictive positive (VPP) était de 97,6% et la valeur prédictive négative (VPN) de 100%.

Résultats pour les MRSA obtenus avec le «MRSA / SA ELITE MGB® Kit» par rapport à la méthode de référence.

	MRSA mecA Sensibilité diagnostique	MRSA mecA _{LGA251} Sensibilité diagnostique	MRSA Spécificité diagnostique
7500 Fast Dx Real Time PCR Instrument	100 %	100 %	97,5 %
7500 Real Time PCR System	100 %	100 %	97,5 %

Par rapport à la méthode de culture de référence, le «MRSA / SA ELITE MGB® Kit» a identifié 95% des échantillons positifs au SA (sensibilité diagnostique) et 100% des échantillons négatifs (spécificité diagnostique). En ce qui concerne les échantillons testés, pour SA, la valeur prédictive positive (VPP) était de 100% et la valeur prédictive négative (VPN) de 95%.

Résultats pour les SA obtenus avec le «MRSA / SA ELITE MGB® Kit» par rapport à la méthode de référence.

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

Seuil de détection

Le seuil de détection (LoD) du «MRSA / SA ELite MGB® Kit», employé conjointement à NucliSENS® easyMAG® a été déterminé en utilisant les souches indiquées dans le tableau ci-dessous. Les cultures de ces souches ont été quantifiées, diluées dans une matrice reproduisant un échantillon nasal, puis ensemencées sur un écouvillon. La dilution est approximative et est comprise entre 5 et 1500 unités formant une colonie (UFC). Toutes les dilutions ont été testées et le seuil de détection (LoD) a été déterminé par l'analyse Probit. Le LoD pour chaque souche représente le plus petit nombre d' UFC/prélèvement pour lequel un résultat positif sera obtenu avec 95 % de probabilité et une confiance d'au moins 95 %. Le LoD pour chaque souche a ensuite été vérifié en testant au moins 20 réplifications.

Liste des souches bactériennes étudiées pour la détermination du seuil de détection

Souche	Désignation	Description	Résistance pharmacologique
ATCC 29213	Wichita	Souche QC	MSSA
ATCC BAA-1556	MRSA252	Infection nosocomiale, UK	MRSA
ATCC BAA-2312	M10/0061	LGA251	MRSA

Résultat du seuil de détection

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

Efficacité de la détermination génotypique (capacité d'inclusion)

Les performances du «MRSA / SA ELite MGB® Kit», employé avec NucliSENS® easyMAG®, ont été testées avec le MRSA/SA QCMD proficiency panel. Toutes les souches ont été identifiées correctement. De plus, le test a été comparé à 75 souches isolées bien caractérisées de MRSA et de SASM. Ces souches sont représentatives de la diversité génétique globale, comprenant des complexes clonaux et des types de séquences, ainsi que différents types d'électrophorèse sur gel en champ pulsé (PFGE) et des valeurs de CMI (concentration minimale inhibitrice). Les souches ont été obtenues grâce au Programme NARSA (Network on Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus*) ou grâce à l'ATCC (American Tissue Culture Collection), ou elles ont été offertes par le Medical College of Wisconsin. Toutes les souches ont été absorbées sur des tampons en quantité proche du seuil de détection, puis testées. En plus, toutes les souches SA sensibles à la méthicilline ont été testées à une concentration de 1x10⁶ UFC/prélèvement. Toutes les souches de SA sensibles à la méthicilline ont été testées positives pour le SA et négatives pour le MRSA. Toutes les souches de MRSA ont été testées positives pour MRSA. Deux isolats BORSA (Borderline Oxacillin Resistant *Staphylococcus aureus*), dépourvus du gène *mecA*, ont été testés positifs pour le SA et négatifs pour le MRSA. Ces résultats induisent une efficacité générale de détection du génotype (capacité d'inclusion) de 97,3%.

L'analyse des régions d'hybridation des amorces et des sondes fluorescentes dans l'alignement des séquences disponibles dans la base de données des éléments SSC *mecA*, y compris *mecC*, a démontré leur conservation et l'absence de mutations significatives.

Spécificité analytique (réaction croisée)

La spécificité du «MRSA / SA ELite MGB®Kit» et l'absence d'homologie significative ont été évaluées en comparant l'alignement des séquences des amorces SA des sondes fluorescentes avec les séquences d'espèces phylogénétiquement liées au *Staphylococcus aureus*, des micro-organismes pathogènes et des microorganismes normalement présents dans la microflore normale des fosses nasales. Ces séquences sont disponibles dans la base de données pour microorganismes différents de SA.

Espèces testées pour la réaction croisée par l'analyse de la séquence dans la base de données

Espèces de <i>Staphylococci</i>	Autres micro-organismes	Virus
<i>Staphylococcus arlettae</i>	CoNS	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>
<i>Staphylococcus capitis</i>	CoNS	<i>Bacillus cereus</i>
<i>Staphylococcus carnosus</i>	CoNS	<i>Bordetella pertussis</i>
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	CoNS	<i>Citrobacter freundii</i>
<i>Staphylococcus delphini</i>	MSCoPS	<i>Citrobacter koseri</i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MSCoNS	<i>Corynebacterium aquaticum</i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MRCoNS	<i>Corynebacterium bovis</i>
<i>Staphylococcus equorum</i>	CoNS	<i>Corynebacterium flavescens</i>
<i>Staphylococcus felis</i>	CoNS	<i>Corynebacterium genitalium</i>
<i>Staphylococcus gallinarum</i>	CoNS	<i>Enterobacter aerogenes</i>
<i>Staphylococcus hyicus</i>	CoPS	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Staphylococcus intermedius</i>	CoPS	<i>Enterococcus flavescens</i>
<i>Staphylococcus kloosii</i>	CoPS	<i>Enterococcus gallinarum</i>
<i>Staphylococcus lentus</i>	CoPS	<i>Enterococcus hirae</i>
<i>Staphylococcus pulvereri</i>	CoNS	<i>Escherichia coli</i>
<i>Staphylococcus simulans</i>	CoNS	<i>Klebsiella oxytoca</i>
<i>Staphylococcus warneri</i>	CoNS	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Staphylococcus xylosum</i>	MSCoNS	<i>Listeria monocytogenes</i>
		<i>Micrococcus luteus</i>
		<i>Moraxella catarrhalis</i>
		<i>Pasteurella aerogenes</i>
		<i>Proteus mirabilis</i>
		<i>Proteus vulgaris</i>
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
		<i>Salmonella typhimurium</i>
		<i>Serratia marcescens</i>
		<i>Shigella sonnei</i>
		<i>Streptococcus mitis</i>
		<i>Streptococcus salivarius</i>
		<i>Yersinia enterocolitica</i>
		<i>Candida albicans</i>
		<i>Candida glabrata</i>
		<i>Cryptococcus neoformans</i>
		<i>Lactobacillus acidophilus</i>
		<i>Legionella pneumophila</i>
		<i>Mycobacterium tuberculosis avirulent</i>
		<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
		<i>Neisseria meningitidis</i>
		<i>Streptococcus mutans</i>
		<i>Streptococcus pneumoniae</i>
		<i>Streptococcus pyogenes</i>
		<i>Homo sapiens</i>

CoNS = Coagulase Negative *Staphylococcus* (*Staphylococcus* à Coagulase Négative).
 MSCoNS = méthicilline-sensible Coagulase Négative *Staphylococcus* (*Staphylococcus* à Coagulase Négative et sensible à la méthicilline).
 MRCoNS = méthicilline-résistant Coagulase Négative *Staphylococcus* (*Staphylococcus* à Coagulase Négative et résistant à la méthicilline).
 CoPS = Coagulase Positive *Staphylococcus* (*Staphylococcus* à Coagulase Positive).

Reproductibilité avec du matériel de référence certifié

La sensibilité analytique du test, ou la reproductibilité des résultats comparés aux résultats obtenus avec d'autres méthodes dans différents laboratoires, a été vérifiée en testant un panel de matériel de référence certifié.

Les essais ont été menés en utilisant comme matériel de référence, calibré et certifié, un panel de dilutions de MRSA (QCMD 2012 Methicillin Resistant *S. aureus* EQA panel). Le panel est composé de douze échantillons divisés comme suit : six échantillons de MRSA à différentes concentrations, trois échantillons de *Staphylococcus aureus* sensible à la méthicilline (MSSA), un échantillon de staphylocoques à coagulase négative et résistants à la méthicilline (MRCoNS), un échantillon d'*Escherichia coli* (*E. coli*) et deux échantillons vrais négatifs. Chaque échantillon du panel a été testé dans 2 répliques en suivant toute la procédure d'analyse, extraction avec NucliSENS® easyMAG® et amplification avec les produits de ELITechGroup S.p.A.

Les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous

Tests avec le matériel de référence certifié				
ID échantillon	Contenu	Concentration de l'échantillon UFC/mL	Résultat attendu	Résultat obtenu
MRSADNA10-04	MRSA	1 x 10 ⁸	Fréquemment déterminé	Interprétable
MRSADNA10-03	MRSA	5 x 10 ⁷	Fréquemment déterminé	Interprétable
MRSADNA10-01	MRSA	5 x 10 ⁸	Fréquemment déterminé	Interprétable
MRSADNA10-09	MRSA	5 x 10 ⁵	Fréquemment déterminé	Interprétable
MRSADNA10-08	MRSA	5 x 10 ⁵	Fréquemment déterminé	Interprétable
MRSADNA10-02	MRSA	5 x 10 ⁵	Interprétable	Interprétable
MRSADNA10-05	MSSA	5 x 10 ⁶	MRSA négatif	MRSA négatif, SA positif
MRSADNA10-06	MSSA	1 x 10 ⁷	MRSA négatif	MRSA négatif, SA positif
MRSADNA10-07	MSSA	5 x 10 ⁶	MRSA négatif	MRSA négatif, SA positif
MRSADNA10-12	MRCoNS	1 x 10 ⁷	Négatif	Négatif
MRSADNA10-10	<i>E. coli</i>	5 x 10 ⁶	Négatif	Négatif
MRSADNA10-11	MHB seulement	-	Négatif	Négatif

Tous les échantillons ont été correctement détectés.

Migration/Contamination croisée

Une étude analytique a été menée pour évaluer le potentiel de contamination croisée entre les échantillons fortement concentrés en MRSA (1x10⁷ UFC/mL) et les échantillons négatifs tout au long d'une session de «MRSA / SA ELITE MGB® Kit». Deux opérateurs ont effectué cinq cycles d'extraction de 24 échantillons. Pour chaque cycle, 11 échantillons fortement concentrés en MRSA, 11 échantillons négatifs, 1 contrôle positif et 1 contrôle négatif ont été utilisés. Ces échantillons ont été déposés selon un schéma en damier (des échantillons fortement concentrés en MRSA sont alternés avec des échantillons négatifs). Les échantillons extraits ont été ensuite amplifiés dans cinq cycles séparés, en utilisant deux schémas en damier différents. Les résultats du test de contamination croisée sont zéro faux négatifs sur 55 échantillons positifs fortement concentrés en MRSA, et un faux positif sur 55 échantillons négatifs.

Les données de migration/contamination croisée ont été obtenues en utilisant l'extracteur NucliSENS® easyMAG®, le thermocycleur 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument avec la version précédente du kit d'amplification «MRSA / SA ELITE MGB® Kit» qui ne contenait pas d'oligonucléotides spécifiques au gène *mecA_{MECC}*.

Remarque: Les données et les résultats complets des essais effectués pour l'évaluation des caractéristiques des performances du produit, avec les matrices et les instruments, sont enregistrés dans la Section 7 du Fascicule Technique de Produit «MRSA/SA ELITE MGB® Kit», FTP M800351.

BIBLIOGRAPHIE

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

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

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

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

Stegger, M. et al. Rapid detection, differentiation and typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harboring either *mecA* or the new *mecA* homologue *mecA_{LG251}*. Clin Microbiol Infect 2012; 18:395-400.

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

LIMITES DE LA PROCÉDURE

Ce produit doit uniquement être utilisé en association avec les systèmes d'extraction et les instruments de PCR en temps réel recommandés.

Utiliser uniquement de l'ADN extrait à partir d'écouvillons nasaux humains.

Ne pas utiliser d'ADN extrait contaminé par des mucoprotéines, du propylène glycol, de l'éthanol ou du 2-propanol. Ces substances inhibent l'amplification des acides nucléiques et elles peuvent engendrer des résultats erronés.

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

La fiabilité des résultats obtenus dépendent de la bonne exécution de l'identification, de la collecte, du transport, du stockage et de la préparation des échantillons. Afin d'éviter tout résultat erroné, il est essentiel d'apporter à ces opérations tout le soin possible et de suivre scrupuleusement les instructions fournies avec ces produits.

Compte tenu de sa forte sensibilité analytique, l'amplification en temps réel est sujette à la contamination croisée par des échantillons cliniques positifs pour le SA ou pour le MRSA, par des contrôles positifs et par des produits de la même amplification. La contamination croisée engendre des résultats faux positifs. Le protocole du produit a été élaboré afin de limiter la contamination croisée. Cependant, ces contaminations ne peuvent être évitées qu'avec une bonnes pratiques de laboratoire et du respect scrupuleux des consignes fournies dans cette notice.

Pour éviter tout accident pouvant avoir des conséquences graves pour l'utilisateur ou des tierces personnes, ce produit doit être manipulé par un personnel qualifié et formé à la manipulation d'échantillons biologiques pouvant transmettre des agents infectieux et de produits chimiques classés comme dangereux.

Pour éviter tout accident pouvant avoir des conséquences graves pour l'utilisateur ou des tierces personnes, le port de vêtements de travail et l'accès à des locaux adaptés à la manipulation d'échantillons biologiques (pouvant transmettre des agents infectieux) et des produits chimiques dangereux sont requis.

Afin d'éviter d'obtenir des résultats erronés, ce produit doit être manipulé par un personnel qualifié et formé aux techniques de biologies moléculaire(extraction, amplification et détection d'acides nucléiques).

Afin d'éviter les faux positifs, il est nécessaire de disposer de locaux distincts pour l'extraction/préparation des amplifications et pour l'amplification/révélation des produits d'amplification.

Afin d'éviter les faux positifs, il est nécessaire de porter des vêtements de travail et d'utiliser des instruments dédiés à l'extraction/préparation des amplifications ou à l'amplification/révélation des produits d'amplification.

À cause des différences intrinsèques qui existent entre les diverses technologies, il est recommandé de mener des études de corrélation des méthodes pour évaluer ces différences avant de passer à une nouvelle technologie.

Un résultat positif n'indique pas la présence de SA ou de MRSA viables, mais il suppose la présence de SA ou de MRSA. Par conséquent, un résultat positif n'indique pas forcément l'échec des mesures d'éradication mises en place, car de l'ADN non viable pourrait persister.

Un résultat négatif signifie que l'ADN de SA ou de MRSA n'a pas été détecté dans l'ADN extrait de l'échantillon, mais il n'exclue pas que l'ADN de SA ou de MRSA soit présent à un titre inférieur au seuil de détection du produit (voir Caractéristiques des performances, page 15). Dans ce cas, le résultat pourrait être un faux négatif.

Un résultat négatif successif à un résultat précédemment positif peut indiquer ou non le succès des mesures d'éradication.

Les résultats obtenus à l'aide de ce produit peuvent être parfois « Non valables » suite à l'échec de l'amplification du contrôle interne. Ce résultat demande de réitérer l'analyse, ce qui prolonge les délais d'obtention des résultats définitifs.

Bien que rares, des polymorphismes, à l'intérieur de la région du génome bactérien couverte par les amorces et les sondes, peuvent entraver la détection.

En présence d'une quantité excessive de porteurs de SA sensible à la méthicilline ou de *meCA* négatifs à la coagulase, la détection du MRSA peut être entravée.

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

Les résultats doivent être interprétés en tenant compte des autres données cliniques et des autres examens de laboratoire et cliniques mises à la disposition du clinicien. De plus ils doivent être utilisés comme complément dans la lutte contre les infections nosocomiales afin d'identifier les patients qui requièrent la prise de mesures plus poussées.

PROBLÈMES ET SOLUTIONS

L'ADN cible n'est pas détecté dans la réaction du contrôle positif	
Causes éventuelles	Solutions
Erreur de distribution dans les puits de la microplaque.	Distribuer soigneusement les réactifs dans les puits de la microplaque en suivant la grille de travail. Vérifier le volume du mélange réactionnel distribué. Vérifier le volume du contrôle positif distribué.
Dégradation de la sonde.	Utiliser un nouveau tube de mélange de réaction.
Dégradation standard.	Utiliser un nouveau tube de contrôle positif.
Erreur de paramétrage de l'instrument.	Vérifier le paramétrage de l'instrument pour les réactions du contrôle positif. Vérifier le paramétrage de l'instrument pour le cycle thermique.

L'ADN cible est détecté dans la réaction du contrôle négatif	
Causes éventuelles	Solutions
Erreur de distribution dans les puits de la microplaque.	Éviter de répandre le contenu des tubes d'échantillons. Changer toujours d'embout entre deux échantillons. Distribuer soigneusement les échantillons, le contrôle négatif et le contrôle positif dans les puits de la microplaque, en suivant la grille de travail.
Erreur de paramétrage de l'instrument.	Vérifier le paramétrage de la position des échantillons, du contrôle négatif et du contrôle positif.
Microplaque mal scellée.	Sceller méticuleusement la microplaque.
Contamination de l'eau pour biologie moléculaire.	Utiliser un nouveau tube d'eau pour biologie moléculaire.
Contamination du mélange de réaction.	Utiliser un nouveau tube de mélange de réaction.
Contamination de la zone d'extraction/préparation des réactions d'amplification.	Nettoyer les surfaces et les instruments à l'aide d'un détergent aqueux. Laver les blouses et remplacer les tubes et les embouts utilisés.

Fluorescence de base irrégulière ou élevée dans les réactions	
Causes éventuelles	Solutions
Erreur de distribution ou de mélange de l'échantillon.	Mélanger soigneusement, en pipetant trois fois, les échantillons, le contrôle négatif et le contrôle positif dans le mélange réactionnel. Éviter de faire des bulles lors de la distribution de l'échantillon.

LÉGENDE DES SYMBOLES

NOTE POUR L'ACQUÉREUR : LICENCE LIMITÉE

-  Référence du catalogue.
-  Seuil supérieur de température.
-  Numéro de lot.
-  Date de péremption (dernier jour du mois).
-  Diagnostic *in vitro*.
-  Conforme aux exigences essentielles de la Directive européenne 98/79/CE concernant le diagnostic *in vitro*.
-  Contenu suffisant pour « N » tests.
-  Attention, consulter le mode d'emploi.
-  Contenus.
-  Matériel de contrôle
-  Fabriqué par.

Ce produit contient des réactifs fabriqués par Life Technologies Corporation et commercialisés selon des accords de licence entre ELITechGroup S.p.A. et ses filiales et Life Technologies Corporation. 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, Life Technologies Corporation, 5781 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008. Téléphone : +1(760)603-7200. Fax : +1(760)602-6500. E-mail : outlicensing@thermofisher.com.

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

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

"ELITE MGB®" et le logo "ELITE MGB®" sont des marques commerciales enregistrées pour l'Union européenne.

ELITE InGenius® est une marque enregistrée de ELITechGroup

NuciSENS® easyMAG® sont des marques déposées de bioMérieux.

eNAT™ est une marque enregistrée de COPAN Italia S.p.A.

