

Instructions for use

Pneumocystis ELITe MGB® Kit

réactifs de PCR en temps réel de l'ADN



REF RTS150ING

UDI 08033891486723



HISTORIQUE DES MODIFICATIONS

Révision	Avis de modification	Date (jj/mm/aaaa)
02	Utilisation prolongée du produit en association avec l'instrument « ELiTe BeGenius® » (RÉF INT040) et la matrice d'expectorations. Mise à jour des CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE : - mise à jour de la valeur ULoQ pour la matrice d'expectorations - mise à jour de la plage de mesure linéaire pour les expectorations traitées dans une matrice au lieu de PBS. Nouveaux graphiques et contenu du mode d'emploi.	25/07/2024
01	Utilisation prolongée du produit sur l'instrument « ELiTe BeGenius® » (RÉF INT040) et la matrice de LBA. Mise à jour de la valeur ULoQ/LLoQ calculée sur la matrice de LBA. Description de la valeur seuil du Contrôle interne (IC).	15/05/2023
00	Nouveau développement de produit	09/11/2019

NOTE!

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

SOMMAIRE

1 APPLICATION	4
2 PRINCIPE DU TEST	4
3 DESCRIPTION DU PRODUIT	4
4 MATÉRIEL FOURNI.....	5
5 MATÉRIEL REQUIS, MAIS NON FOURNI	6
6 AUTRES PRODUITS REQUIS.....	6
7 AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS.....	7
8 ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES.....	9
9 PROCÉDURE AVEC LE ELITe InGenius	11
10 PROCÉDURE AVEC LE ELITe BeGenius	17
11 CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE	23
12 BIBLIOGRAPHIE	32
13 LIMITES DE LA PROCÉDURE.....	32
14 PROBLÈMES ET SOLUTIONS	34
15 LÉGENDE DES SYMBOLES	36
16 NOTE POUR L'ACQUÉREUR : LICENCE LIMITÉE	37
Appendix A QUICK START GUIDE.....	38

1 APPLICATION

Le produit **Pneumocystis ELiTe MGB Kit** est un dispositif médical de diagnostic *in vitro* destiné à être utilisé par les professionnels de santé en tant que test quantitatif de PCR en temps réel des acides nucléiques pour la **détection et la quantification de l'ADN de *Pneumocystis jirovecii* (PJ)** dans des échantillons d'ADN extraits d'échantillons cliniques.

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 lavage bronchoalvéolaire (LBA), d'aspirat bronchique (AB) et d'expectorations liquéfiées.

Le produit est destiné à une utilisation diagnostique *in vitro* en tant qu'aide au diagnostic et à la surveillance d'une infection à *Pneumocystis jirovecii*.

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

2 PRINCIPE DU TEST

Le test est une PCR quantitative en temps réel qui détecte l'ADN de *Pneumocystis jirovecii* (**PJ**) isolé à partir d'échantillons et amplifié à l'aide du réactif du test, le **PJ 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. Les **ELiTe InGenius** et **ELiTe BeGenius** surveillent l'augmentation de la fluorescence et calculent les cycles seuils (Ct) ainsi que les températures de fusion (Tm). La quantité d'ADN de PJ est calculée en se basant sur une courbe d'étalonnage enregistrée.

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.

3 DESCRIPTION DU PRODUIT

Le **Pneumocystis ELiTe MGB Kit** fournit le réactif du test, le **PJ PCR Mix**, un mélange de PCR optimisé et stabilisé qui contient les amorces et les sondes spécifiques pour :

- le **gène de la grande sous-unité de l'ARNr mitochondrial (mtLSU)** de PJ, détecté dans le canal **PJ** ; la sonde est stabilisée par le groupe MGB, désactivée par le désactivateur Eclipse Dark Quencher® et marquée par le colorant FAM,
- le Contrôle interne, 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 525 (AP525).

Le **PJ PCR Mix** contient également un tampon, du chlorure de magnésium, des nucléotides triphosphates et l'enzyme ADN polymérase avec activation thermique (Hot start).

Le **Pneumocystis ELiTe MGB Kit** contient suffisamment de réactifs pour effectuer 96 tests en association avec les **ELiTe InGenius** et **ELiTe BeGenius (12 tests avec chaque tube)**, en utilisant 20 µL par réaction.

Le **Pneumocystis ELiTe MGB Kit** peut également être utilisé en association avec d'autres instruments équivalents.

4 MATÉRIEL FOURNI

Tableau 1

Composant	Description	Quantité	Classification des risques
PJ PCR Mix réf. RTS150ING	Mélange de réactifs pour la PCR en temps réel dans un tube doté d'un capuchon BLANC	8 x 280 µL	-

5 MATÉRIEL REQUIS, MAIS NON FOURNI

- Hotte à flux laminaire.
- Gants non poudrés en nitrile jetables ou matériel similaire.
- Agitateur de type vortex.
- Centrifugeuse de paillasse (~5 000 tr/min).
- Microcentrifugeuse de paillasse (~13 000 tr/min).
- Micropipettes et cônes stériles avec filtre pour les aérosols ou cônes stériles à déplacement positif (0,5-10 µL, 2-20 µL, 5-50 µL, 50-200 µL, 200-1 000 µL).
- Tubes stériles à capuchon vissant de 2,0 mL (Sarstedt, Allemagne, réf. 72.694.005).
- Eau de qualité biologie moléculaire.

6 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, les étalons d'ADN 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 (ELiTechGroup S.p.A., EG SpA réf. INT030) ELiTe InGenius Software version 1.3.0.19 (ou versions ultérieures) PJ ELiTe _STD, protocole de test (Assay Protocol) contenant les paramètres pour l'analyse des calibrateurs PJ ELiTe _PC, protocole de test (Assay Protocol) contenant les paramètres pour l'analyse du Contrôle positif PJ ELiTe _NC, protocole de test (Assay Protocol) contenant les paramètres pour l'analyse du Contrôle négatif PJ ELiTe _BAL_200_100, protocole de test (Assay Protocol) contenant les paramètres pour l'analyse des échantillons de LBA/AB PJ ELiTe _SP_200_100, protocole de test (Assay Protocol) contenant les paramètres pour l'analyse des échantillons d'expectorations	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 Pneumocystis - ELiTe Positive Control (EG SpA, réf. CTR150PLD). Pneumocystis ELiTe Standard (EG SpA, réf. STD150PLD) CPE - Internal Control (EG SpA, réf. CTRCPE).
ELiTe BeGenius (EG SpA réf. INT040) ELiTe BeGenius Software version 2.2.1. (ou versions ultérieures) PJ ELiTe _Be_STD, protocole de test (Assay Protocol) contenant les paramètres pour l'analyse des calibrateurs PJ ELiTe _Be_PC, protocole de test (Assay Protocol) contenant les paramètres pour l'analyse du Contrôle positif PJ ELiTe _Be_NC, protocole de test (Assay Protocol) contenant les paramètres pour l'analyse du Contrôle négatif PJ ELiTe _Be_BAL_200_100, protocole de test (Assay Protocol) contenant les paramètres pour l'analyse des échantillons de LBA/AB PJ ELiTe _Be_SP_200_100, protocole de test (Assay Protocol) contenant les paramètres pour l'analyse des échantillons d'expectorations	

7 AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

Ce produit est exclusivement réservé à une utilisation in vitro.

7.1 Avertissements et précautions d'ordre général

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

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

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

- Ne pas manger, boire, fumer ou appliquer de produits cosmétiques dans les zones de travail.
- Se laver soigneusement les mains après toute manipulation des échantillons et des réactifs.
- Éliminer les réactifs restants et les déchets conformément aux réglementations en vigueur.
- Lire attentivement toutes les instructions indiquées avant d'exécuter le test.
- Lors de l'exécution du test, suivre les instructions fournies avec le produit.
- Ne pas utiliser le produit au-delà de la date de péremption indiquée.
- Utiliser uniquement les réactifs fournis avec le produit et ceux recommandés par le fabricant.
- Ne pas utiliser de réactifs provenant de lots différents.
- Ne pas utiliser de réactifs commercialisés par d'autres fabricants.

7.2 Avertissements et précautions pour la biologie moléculaire

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

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.

7.3 Avertissements et précautions spécifiques pour les composants

Tableau 3

Composant	Température de stockage	Utilisation après la première ouverture	Cycles de congélation/décongélation	Stabilité à bord de l'instrument (ELiTe InGenius et ELiTe BeGenius)
PJ PCR Mix	-20 °C ou température plus basse (à l'abri de la lumière)	un mois	jusqu'à sept	jusqu'à sept sessions d'analyse distinctes* de trois heures chacune ou jusqu'à 7 heures consécutives (2 sessions d'analyse de 3 heures chacune et durée nécessaire au paramétrage d'une troisième session d'analyse)

* avec congélation intermédiaire

8 ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES

8.1 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		
		+2/+8 °C	-20 ± 10 °C	-70 ± 15 °C
Lavage bronchoalvéolaire/ aspirat bronchique (LBA/AB)	dans une solution physiologique stérile ou du PBS* stérile	≤ 1 semaine	≤ 30 jours	≤ 1 an
Expectorations (SP)		≤ 1 semaine	≤ 30 jours	longue période

*PBS : solution saline tamponnée au phosphate

Si les échantillons de LBA/AB sont particulièrement muqueux, ils peuvent être liquéfiés avec des réactifs à base de dithiothréitol (par ex. Sputasol, Oxoid, Thermo Fisher Scientific) conformément aux directives du laboratoire.

Les échantillons d'expectorations doivent être liquéfiés avec des réactifs à base de dithiothréitol (par ex. Sputasol, Oxoid, Thermo Fisher Scientific) conformément aux directives du laboratoire.

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

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

Tableau 5 Protocoles de test pour le Pneumocystis ELiTe MGB Kit

Échantillon	Instrument	Nom du protocole de test	Rapport	Caractéristiques
Lavage bronchoalvéolaire/ aspirat bronchique (LBA/AB)	ELiTe InGenius	PJ ELiTe_BAL_200_100	copies/mL	Volume d'extraction : 200 µL Volume d'élution de l'extraction : 100 µL Contrôle Interne : 10 µL Sonication : NON Facteur de dilution : 1 Volume de PCR Mix : 20 µL Volume initial de PCR de l'échantillon : 20 µL
	ELiTe BeGenius	PJ ELiTe_Be_BAL_200_100		
Expectorations (SP)	ELiTe InGenius	PJ ELiTe_SP_200_100	copies/mL	Volume d'extraction : 200 µL Volume d'élution de l'extraction : 100 µL Contrôle Interne : 10 µL Sonication : NON Facteur de dilution : 1 Volume de PCR Mix : 20 µL Volume initial de PCR de l'échantillon : 20 µL
	ELiTe BeGenius	PJ ELiTe_Be_SP_200_100		

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

NOTE!

Le pipetage des échantillons dans le **tube d'extraction** ou le **tube Sarstedt de 2 mL** peut entraîner une **contamination**. Utiliser les pipettes appropriées et suivre toutes les recommandations indiquées à la section « Avertissements et précautions ».

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 « Caractéristiques de performance » pour obtenir de plus amples informations concernant les substances interférentes.

Des quantités d'ADN génomique humain supérieures à 1 µg extraites de l'échantillon risquent d'inhiber l'amplification en temps réel.

8.2 Calibrateurs et contrôles de la PCR

La courbe d'étalonnage doit être générée et approuvée pour chaque lot de réactifs de PCR.

- Pour la courbe d'étalonnage, utiliser les quatre niveaux du produit **Pneumocystis ELITE Standard** (non inclus dans ce kit) avec les protocoles de test (Assay Protocols) **PJ ELITE_STD** ou **PJ ELITE_Be_STD**.

NOTE!

Les concentrations des étalons Q – PCR Standards sont exprimées en copies/réaction (10⁵ copies/réaction, 10⁴ copies/réaction, 10³ copies/réaction, 10² copies/réaction).

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 **Pneumocystis - ELITE Positive Control** (non inclus dans ce kit) avec les protocoles de test (Assay Protocols) **PJ ELITE_PC** ou **PJ 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) **PJ ELITE_NC** ou **PJ ELITE_Be_NC**.

NOTE!

Les **ELITE InGenius** et **ELITE BeGenius** permettent de générer et de stocker la courbe d'étalonnage et de valider les contrôles de la PCR pour chaque lot de réactifs de PCR.

Les courbes d'étalonnage expirent au bout de **60 jours**, après quoi il est nécessaire d'effectuer à nouveau l'étalonnage.

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 calibrateurs et 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,
- l'instrument **ELITE InGenius** ou **ELITE BeGenius** subit une procédure de maintenance ou d'entretien majeure.

8.3 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.

9 PROCÉDURE AVEC LE ELITE InGenius

La procédure d'utilisation du **Pneumocystis 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 d'étalonnage (PCR Only [PCR seulement])
		D) Analyse du Contrôle positif et du Contrôle négatif (PCR Only [PCR seulement])
ÉTAPE 3	Examen et approbation des résultats	1) Validation de la courbe d'étalonnage
		2) Validation des résultats du Positive Control et du Negative Control
		3) Validation des résultats des échantillons
		4) Rapport des résultats de l'échantillon

9.1 ÉTAPE 1 – Vérification de la préparation du système

Avant de commencer la session d'analyse :

- mettre le **ELITE InGenius** en marche et se connecter en mode « **CLOSED** » (FERMÉ),
- dans le menu « Calibration » (Étalonnage) de la page Home (Accueil), vérifier que les calibrateurs (**Q - PCR Standard**) sont approuvés et valides (Status [Statut]) pour le lot de **PCR Mix** à utiliser. Si aucun calibrateur valide n'est disponible pour le lot de **PCR Mix**, effectuer un étalonnage comme décrit dans les sections suivantes,
- 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 Assay Protocols (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.

9.2 ÉTAPE 2 – Paramétrage de la session d'analyse

Le **Pneumocystis ELITE MGB Kit** peut être utilisé sur le **ELITE InGenius** pour effectuer les opérations suivantes :

- Analyse d'échantillons (Extract + PCR [Extraction + PCR]),
- Analyse d'échantillons élués (PCR Only [PCR seulement]),
- Analyse d'étalonnage (« PCR Only » [PCR seulement]),
- Analyse du Contrôle positif et du Contrôle négatif (PCR Only [PCR seulement]).

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 **12 tests** dans des conditions optimisées (2 tests ou plus par session d'analyse). Mélanger délicatement, centrifuger le contenu pendant 5 secondes puis conserver les tubes sur de la glace ou dans un bloc réfrigéré.

NOTE!

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

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

	A. Analyse d'échantillons (Extract + PCR [Extraction + PCR])	B. Analyse d'échantillons élués (PCR Only [PCR seulement])
1	Identifier les échantillons et, si nécessaire, les décongeler à température ambiante, mélanger délicatement, centrifuger le contenu pendant 5 secondes puis conserver les tubes sur de la glace ou dans un bloc réfrigéré. Si requis, transférer 200 µL d'échantillon dans un tube d'extraction préalablement étiqueté. 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.	Décongeler le tube d'éluion 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.
2	Sélectionner « Perform Run » (Exécution cycle) dans l'écran « Home » (Accueil).	Sélectionner « Perform Run » (Exécution cycle) dans l'écran « Home » (Accueil).
3	Vérifier que le « Extraction Input Volume » (Volume d'extraction) est de 200 µL et que le « Extracted Elute Volume » (Volume d'éluion 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'éluion de l'extraction) est de 100 µL.
4	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.
5	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 »).
6	Vérifier que le « Protocol » (Protocole) affiché est : « Extract + PCR » (Extraction + PCR).	Sélectionner « PCR Only » (PCR seulement) dans la colonne « Protocol » (Protocole).
7	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 le « Dilution factor » (Facteur de dilution) est « 1 ».	Vérifier que la position de chargement de l'échantillon dans la colonne « Sample Position » (Position échantillons) est « Elution Tube (bottom row) » (Tube d'éluion [ligne du bas]). Vérifier que le « Dilution factor » (Facteur de dilution) est « 1 ».
8	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.

	A. Analyse d'échantillons (Extract + PCR [Extraction + PCR])	B. Analyse d'échantillons élués (PCR Only [PCR seulement])
9	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 et la date de péremption du CPE et du PCR Mix ainsi que le nombre de réactions pour chaque tube.	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 et la date de péremption du PCR Mix ainsi que le nombre de réactions pour chaque tube.
10	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
11	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.
12	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
13	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'éluion avec les échantillons extraits.
14	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
15	Fermer le tiroir de l'instrument.	Fermer le tiroir de l'instrument.
16	Appuyer sur « Start » (Début).	Appuyer sur « Start » (Début).

	C. Analyse d'étalonnage (PCR Only [PCR seulement])	D. Analyse du Contrôle positif et du Contrôle négatif (PCR Only [PCR seulement])
1	Décongeler les tubes de Q-PCR Standard nécessaires (Cal1 : Q-PCR Standard 10 ² , Cal2 : Q-PCR Standard 10 ³ , Cal3 : Q-PCR Standard 10 ⁴ , Cal4 : Q-PCR Standard 10 ⁵) 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.	Décongeler les tubes de Contrôle positif 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. Préparer le Contrôle négatif en transférant au minimum 50 µL d'eau de qualité biologie moléculaire dans un « Elution tube » (Tube d'éluion) fourni avec le ELITe InGenius SP 200 Consumable Set.
2	Sélectionner « Perform Run » (Exécution cycle) dans l'écran « Home » (Accueil).	Sélectionner « Perform Run » (Exécution cycle) dans l'écran « Home » (Accueil).
3	Vérifier que le « Extraction Input Volume » (Volume d'extraction) est de 200 µL et que le « Extracted Elute Volume » (Volume d'éluion 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'éluion de l'extraction) est de 100 µL.
4	Pour le Q-PCR Standard, attribuer la « Track » (Position), sélectionner le Assay Protocol (Protocole de test) dans la colonne « Assay » (Analyse) et saisir le numéro de lot et la date de péremption du réactif.	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 Contrôle positif et de l'eau de qualité biologie moléculaire.
5	Vérifier que « PCR Only » (PCR seulement) est sélectionné dans la colonne « Protocol » (Protocole).	Vérifier que « PCR Only » (PCR seulement) est sélectionné dans la colonne « Protocol » (Protocole).
6	Vérifier que la position de chargement de l'échantillon dans la colonne « Sample Position » (Position échantillons) est « Elution Tube (bottom row) » (Tube d'éluion [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'éluion [ligne du bas]).
7	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 et la date de péremption du PCR Mix ainsi que le nombre de réactions pour chaque tube.	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 et la date de péremption du PCR Mix ainsi que le nombre de réactions pour chaque tube.

	C. Analyse d'étalonnage (PCR Only [PCR seulement])	D. Analyse du Contrôle positif et du Contrôle négatif (PCR Only [PCR seulement])
8	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
9	Vérifier les embouts dans le (s) « Tip Rack (s) » (Compartiment(s) à embouts) de la « Inventory Area » (Zone de Stockage) et remplacer le(s) « Tip Rack(s) » si nécessaire.	Vérifier les embouts dans le (s) « Tip Rack (s) » (Compartiment(s) à embouts) de la « Inventory Area » (Zone de Stockage) et remplacer le(s) « Tip Rack(s) » si nécessaire.
10	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
11	Charger la PCR Cassette (Cassette de PCR) et les tubes de Q-PCR Standard.	Charger la PCR Cassette (Cassette de PCR), le Contrôle positif et le Contrôle négatif.
12	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
13	Fermer le tiroir de l'instrument.	Fermer le tiroir de l'instrument.
14	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 7 heures (2 sessions d'analyse de 3 heures chacune et durée nécessaire au paramétrage d'une troisième session d'analyse). Mélanger délicatement et centrifuger le contenu pendant 5 secondes avant de commencer la session d'analyse suivante.

NOTE!

À la fin de l'analyse, les étalons **Q - PCR Standard** restants peuvent être retirés de l'instrument, bouchés et conservés à -20 °C ou à une température plus basse. Éviter de renverser les étalons Q - PCR Standard.

NOTE!

Les étalons **Q - PCR Standard** peuvent être utilisés pendant 4 sessions d'analyse distinctes de 2 heures chacune.

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 de renverser le Contrôle positif. 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.

9.3 ÉTAPE 3 - Examen et approbation des résultats

Le **ELITE InGenius** surveille les signaux de fluorescence cibles et de contrôle interne pour chaque réaction et applique automatiquement les paramètres du Assay Protocol (Protocole de test) pour générer des courbes de PCR qui sont ensuite interprétées en résultats.

At the end of the run, the “Results Display” screen is automatically shown. Cet écran présente les résultats et les informations de l'analyse. À partir de cet écran, les résultats peuvent être approuvés et les rapports imprimés ou enregistrés (« Sample Report » [Rapport échantillons] ou « Track Report » [Rapport des positions]). Se reporter au manuel de l'instrument pour plus de détails.

NOTE!

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

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

1. Validation de la courbe d'étalonnage,
2. Validation des résultats du Contrôle positif et du Contrôle négatif,
3. validation des résultats des échantillons,
4. rapport des résultats de l'échantillon.

9.3.1 A. Validation de la courbe d'étalonnage

Le **ELITE InGenius Software** interprète les résultats de la PCR pour la cible des réactions des calibrateurs avec les paramètres du Assay Protocol (Protocole de test) **ELITE STD**. Les valeurs Ct versus la concentration génèrent la courbe d'étalonnage.

Les courbes d'étalonnage, spécifiques au lot de réactifs de PCR, sont enregistrées dans la base de données (Calibration [Étalonnage]). Elles peuvent être visualisées et approuvées par des utilisateurs « Administrator » (Administrateur) ou « Analyst » (Analyste) en suivant les instructions de la GUI.

La courbe d'étalonnage expire **au bout de 60 jours**.

NOTE!

Si la courbe d'étalonnage ne répond pas aux critères d'acceptation, le message « Failed » (Échec) s'affiche dans l'écran « Calibration » (Étalonnage). Dans ce cas, les résultats ne peuvent pas être approuvés et les réactions d'amplification du calibrateur doivent être répétées. De plus, si des échantillons ont été inclus dans l'analyse, ceux-ci ne sont pas quantifiés et doivent également être répétés pour générer des résultats quantitatifs.

9.3.2 Validation des résultats du Contrôle positif et du Contrôle négatif d'amplification

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

Les résultats du Contrôle positif et du Contrôle négatif, 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 Contrôle positif et du Contrôle négatif expirent **au bout de 15 jours**.

Le **ELITE InGenius software** traite les résultats du Contrôle positif et du Contrôle négatif et génère des Control Charts (Graphiques de contrôle). Quatre résultats de Contrôle positif et de Contrôle négatif approuvés sont utilisés pour configurer le graphique de contrôle initial. Pour les contrôles ultérieurs, les résultats sont analysés par le logiciel pour s'assurer que les performances du système sont conformes aux critères d'acceptation, indiqués dans les tracés du graphique de contrôle. Se reporter au manuel de l'instrument pour plus de détails.

NOTE!

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

NOTE!

si le résultat du Contrôle positif ou du Contrôle négatif 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.

9.3.3 C. Validation des résultats de l'échantillon

Le **ELiTe InGenius Software** interprète les résultats de la PCR pour la cible (canal **PJ**) et le Contrôle interne (canal **IC**) avec les paramètres de protocole de test (Assay Protocol) **PJ ELiTe_BAL_200_100** et **PJ ELiTe_SP_200_100**. Les valeurs Ct des cibles résultantes sont converties en concentration.

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

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

1) Courbe d'étalonnage	Statut
PJ Q-PCR Standard	APPROUVÉ
2) Contrôle positif	Statut
PJ Positive Control	APPROUVÉ
3) Contrôle négatif	Statut
PJ 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.

Résultat de l'analyse de l'échantillon	Interprétation
PJ: DNA Detected, quantity equal to XXX copies/ml (PJ : ADN détecté, détecté, quantité égale à « XXX » copies/mL)	L'ADN de PJ a été détecté dans l'échantillon dans la plage de mesure de l'analyse ; sa concentration est celle affichée.
PJ: DNA Detected, quantity below LLoQ copies/mL (PJ : ADN détecté, quantité inférieure à « LLoQ » copies/mL)	L'ADN de PJ a été détecté dans l'échantillon ; sa concentration est inférieure à la limite inférieure de quantification de l'analyse.
PJ: DNA Detected, quantity beyond ULoQ copies/mL (PJ : ADN détecté, quantité supérieure à « ULoQ » copies/mL)	L'ADN de PJ a été détecté dans l'échantillon ; sa concentration est supérieure à la limite supérieure de quantification de l'analyse.
PJ: DNA Not detected or below LoD copies/mL (PJ : ADN non détecté ou inférieur à « LoD » copies/mL)	L'ADN de PJ n'a pas été détecté dans l'échantillon. L'échantillon est négatif pour l'ADN cible ou sa concentration est inférieure à la limite de détection de l'analyse.
Invalid - Retest Sample (Non valide - Tester à nouveau l'échantillon).	Résultat d'analyse non valide en raison d'un échec du Contrôle interne (en raison, par exemple, d'une extraction incorrecte, d'un transfert d'inhibiteurs). Le test doit être répété.

Échantillons rapportés comme « Invalid-Retest Sample » (Non valide - Tester à nouveau l'échantillon) : dans ce cas, l'ADN du Contrôle Interne n'a pas été efficacement détecté, ce qui peut être dû à des problèmes lors des étapes de prélèvement de l'échantillon, d'extraction ou de PCR (par ex. échantillonnage incorrect, dégradation ou perte d'ADN pendant l'extraction ou inhibiteurs dans l'éluat), ce qui peut générer des résultats incorrects.

S'il reste un volume d'éluat suffisant, l'éluat peut être à nouveau testé (pur ou dilué), par une analyse d'amplification en mode « PCR Only » (PCR seulement). Si le deuxième résultat est non valide, l'échantillon doit être à nouveau testé en procédant à l'extraction d'un nouvel échantillon en utilisant le mode « Extract + PCR » (Extraction + PCR) (se reporter à la section [14 « Problèmes et solutions » page 34](#)).

Les échantillons rapportés comme « PJ: DNA Not detected or below the "LoD" copies/mL » (PJ : ADN non détecté ou inférieur à « LoD » copies/mL) sont appropriés pour l'analyse mais il n'a pas été possible de détecter l'ADN de PJ. Dans ce cas, l'échantillon peut être négatif pour l'ADN de PJ ou l'ADN de PJ est présent à une concentration inférieure à la limite de détection de l'analyse (se reporter à la section [11 « Caractéristiques de performance » page 23](#)).

Les échantillons positifs pour l'ADN de PJ à une concentration inférieure à la limite de détection (et à la limite inférieure de quantification) de l'analyse, s'ils sont détectés, sont rapportés comme « PJ: DNA Detected, quantity below « LLoQ » copies/mL » (PJ : ADN détecté, quantité inférieure à « LLoQ » copies/mL (se reporter à la section [11 « Caractéristiques de performance » page 23](#)).

Les échantillons positifs pour l'ADN de PJ dans la plage de mesure linéaire sont détectés et rapportés comme « PJ: DNA Detected, quantity equal to "XXX" copies/mL » (PJ : ADN détecté, quantité égale à « XXX » copies/mL) (se reporter à la section [11 « Caractéristiques de performance » page 23](#)).

Les échantillons positifs pour l'ADN de PJ qui sont supérieurs à la limite supérieure de quantification sont rapportés comme « PJ: DNA Detected, quantity beyond "ULoQ" copies/mL » (PJ : ADN détecté, quantité supérieure à « ULoQ » copies/mL) et ne sont pas appropriés pour une quantification. Si nécessaire, l'échantillon peut être dilué avant l'extraction ou la PCR pour être testé à nouveau afin de générer des résultats compris dans la plage de mesure linéaire de l'analyse (se reporter à la section [11 « Caractéristiques de performance » page 23](#)).

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).

9.3.4 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.

10 PROCÉDURE AVEC LE ELiTe BeGenius

La procédure d'utilisation du **Pneumocystis ELiTe MGB Kit** avec le **ELiTe BeGenius** comporte trois étapes :

Tableau 7

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 d'étalonnage (PCR Only [PCR seulement])
		D) Analyse du Contrôle positif et du Contrôle négatif (PCR Only [PCR seulement])
ÉTAPE 3	Examen et approbation des résultats	1) Validation de la courbe d'étalonnage
		2) Validation des résultats du Positive Control et du Negative Control
		3) Validation des résultats des échantillons
		4) Rapport des résultats de l'échantillon

10.1 ÉTAPE 1 - Vérification de la préparation du système

Avant de commencer la session d'analyse :

- mettre le ELITe BeGenius en marche et se connecter en mode « **CLOSED** » (FERMÉ),
- dans le menu « Calibration » (Étalonnage) de la page Home (Accueil), vérifier que les calibrateurs (**Q - PCR Standard**) sont approuvés et valides (Status [Statut]) pour le lot de **PCR Mix** à utiliser. Si aucun calibrateur valide n'est disponible pour le lot de **PCR Mix**, effectuer un étalonnage comme décrit dans les sections suivantes,
- 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.

10.2 ÉTAPE 2 – Paramétrage de la session d'analyse

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

- Analyse d'échantillons (Extract + PCR [Extraction + PCR]),
- Analyse d'échantillons élués (PCR Only [PCR seulement]),
- Analyse d'étalonnage (« PCR Only » [PCR seulement]),
- Analyse du Contrôle positif et du Contrôle négatif (PCR Only [PCR seulement]).

Tous les paramètres requis sont inclus dans le protocole de test disponible 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 **12 tests** dans des conditions optimisées (2 tests ou plus par session d'analyse). Mélanger délicatement, puis centrifuger le contenu pendant 5 secondes et conserver les tubes sur de la glace ou 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 quatre types d'analyse, suivre les étapes ci-dessous tout en se reportant à la GUI :

	A. Analyse d'échantillons (Extract + PCR [Extraction + PCR])	B. Analyse d'échantillons élués (PCR Only [PCR seulement])
1	Identifier les échantillons et, si nécessaire, les décongeler 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 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.	Si nécessaire, décongeler le « Elution tube » (Tube d'élué) 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.
2	Sélectionner « Perform Run » (Exécution cycle) dans l'écran « Home » (Accueil).	Sélectionner « Perform Run » (Exécution cycle) dans l'écran « Home » (Accueil).
3	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.
4	Sélectionner le « Run mode » (run mode) : « Extract + PCR » (Extraction + PCR).	Sélectionner le « Run mode » (run mode) : « PCR Only » (PCR seulement).
5	Charger les échantillons dans le « Sample Rack » (Compartiment des échantillons). (Remarque : 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'élué).
6	Insérer le « Sample Rack » (Compartiment des échantillons) dans la « Cooler Unit », en commençant par la « Lane 5 » (L5). Si nécessaire, insérer le « Sample ID » (ID échantillon) (SID) pour chaque « Position » utilisée. (Si des tubes secondaires sont chargés, les marquer « 2 mL Tube » (Tube de 2 mL). Si les tubes secondaires ne comportent pas de codes-barres, saisir manuellement le « Sample ID » [ID échantillon]).	Insérer le « Elution Rack » (Rack d'élué) 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'élué extrait).
7	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
8	Vérifier que le « Extraction Input Volume » (Volume d'extraction) est de 200 µL et que le « Extracted Elute Volume » (Volume d'élué 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'élué de l'extraction) est de 100 µL.
9	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 »).
10	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
11	En cas de traitement de plus de 12 échantillons, répéter la procédure à partir du point 6.	En cas de traitement de plus de 12 échantillons, répéter la procédure à partir du point 6.

	A. Analyse d'échantillons (Extract + PCR [Extraction + PCR])	B. Analyse d'échantillons élués (PCR Only [PCR seulement])
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
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
14	Non applicable	Non applicable
15	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.	Non applicable
16	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).
17	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 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 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).
18	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
19	Vérifier les embouts dans le (s) « Tip Rack (s) » (Compartiment(s) à embouts) de la « Inventory Area » (Zone de Stockage) et remplacer le(s) « Tip Rack(s) » si nécessaire.	Vérifier les embouts dans le (s) « Tip Rack (s) » (Compartiment(s) à embouts) de la « Inventory Area » (Zone de Stockage) et remplacer le(s) « Tip Rack(s) » si nécessaire.
20	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
21	Charger le « PCR Rack » (Portoir de PCR) avec la « PCR Cassette » (Cassette de PCR) dans la « Inventory Area » (Zone de Stockage).	Charger le « PCR Rack » (Portoir de PCR) avec la « PCR Cassette » (Cassette de PCR) dans la « Inventory Area » (Zone de Stockage).
22	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
23	Charger le « Extraction Rack » (Rack d'extraction) avec les cartouches d'extraction « ELITE InGenius SP 200 » et les consommables d'extraction requis.	Non applicable
24	Fermer le tiroir de l'instrument.	Fermer le tiroir de l'instrument.
25	Appuyer sur « Start » (Début).	Appuyer sur « Start » (Début).
	C. Analyse d'étalonnage (PCR Only [PCR seulement])	D. Analyse du Contrôle positif et du Contrôle négatif (PCR Only [PCR seulement])
1	Décongeler les tubes de Q-PCR Standard nécessaires (Cal1 : Q-PCR Standard 10 ² , Cal2 : Q-PCR Standard 10 ³ , Cal3 : Q-PCR Standard 10 ⁴ , Cal4 : Q-PCR Standard 10 ⁵) pendant 30 minutes 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 Contrôle positif 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. Préparer le Contrôle négatif 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.
2	Sélectionner « Perform Run » (Exécution cycle) dans l'écran « Home » (Accueil).	Sélectionner « Perform Run » (Exécution cycle) dans l'écran « Home » (Accueil).

	C. Analyse d'étalonnage (PCR Only [PCR seulement])	D. Analyse du Contrôle positif et du Contrôle négatif (PCR Only [PCR seulement])
3	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.
4	Sélectionner le « Run mode » (run mode) : « PCR Only » (PCR seulement).	Sélectionner le « Run mode » (run mode) : « PCR Only » (PCR seulement).
5	Charger les tubes de Q-PCR Standard dans le « Elution Rack » (Rack d'élution).	Charger les tubes de Contrôle positif et de Contrôle négatif dans le « Elution Rack » (Rack d'élution).
6	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).	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).
7	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
8	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.
9	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 »).
10	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
11	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).
12	Insérer le « Reagent/Elution Rack » (Rack de réactifs/d'élution) dans la « Lane 2 » (L2) de la « Cooler Unit ». Si nécessaire, pour chaque 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) de la « Cooler Unit ». Si nécessaire, pour chaque 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).
13	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
14	Vérifier les embouts dans les « Tip Racks » (Compartiment à embouts) de la « Inventory Area » (Zone de Stockage) et remplacer le(s) « Tip Rack(s) » si nécessaire.	Vérifier les embouts dans les « Tip Racks » (Compartiment à embouts) de la « Inventory Area » (Zone de Stockage) et remplacer le(s) « Tip Rack(s) » si nécessaire.
15	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
16	Charger le « PCR Rack » (Portoir de PCR) avec la « PCR Cassette » (Cassette de PCR) dans la « Inventory Area » (Zone de Stockage).	Charger le « PCR Rack » (Portoir de PCR) avec la « PCR Cassette » (Cassette de PCR) dans la « Inventory Area » (Zone de Stockage).
17	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.	Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre.
18	Fermer le tiroir de l'instrument.	Fermer le tiroir de l'instrument.
19	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 7 heures (2 sessions d'analyse de 3 heures chacune et durée nécessaire au paramétrage d'une troisième session d'analyse). Mélanger délicatement et centrifuger le contenu pendant 5 secondes avant de commencer la session d'analyse suivante.

NOTE!

À la fin de l'analyse, les étalons **Q - PCR Standard** restants peuvent être retirés de l'instrument, bouchés et conservés à -20 °C ou à une température plus basse. Éviter de renverser les étalons Q - PCR Standard.

NOTE!

Les étalons **Q - PCR Standard** peuvent être utilisés pendant 4 sessions d'analyse distinctes de 2 heures chacune.

NOTE!

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

NOTE!

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

NOTE!

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

10.3 ÉTAPE 3 - Examen et approbation des résultats

Le **ELiTe BeGenius** surveille les signaux de fluorescence cibles et de contrôle interne pour chaque réaction et applique automatiquement les paramètres du Assay Protocol (Protocole de test) 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 **Pneumocystis ELiTe MGB Kit** en exécutant la procédure suivante :

1. Validation de la courbe d'étalonnage,
2. Validation des résultats du Contrôle positif et du Contrôle négatif,

3. validation des résultats des échantillons,
4. rapport des résultats de l'échantillon.

NOTE!

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

11 CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

11.1 Sensibilité analytique : limite de détection (LoD)

La sensibilité analytique du Pneumocystis ELITE MGB Kit, en tant que limite de détection (LoD), a été définie en association avec des échantillons de LBA/AB et le système **ELITE InGenius**.

La LoD a été calculée en testant un panel d'échantillons de LBA/AB négatifs qui avaient été dopés avec un matériel de référence certifié de *Pneumocystis jirovecii* (PJ) dont le titre était connu (Qnostics). La LoD a été définie comme la concentration correspondant à une probabilité de résultat positif de 95 % obtenue par une analyse de régression des probits des données.

Les résultats finaux sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau 8 Limite de détection dans les échantillons de LBA/AB avec le ELITE InGenius

LoD	Intervalle de confiance à 95 %	
	limite inférieure	limite supérieure
97 copies/mL	60 copies/mL	275 copies/mL

La valeur de LoD calculée a été vérifiée pour chaque matrice en testant, sur le **ELITE InGenius** et le **ELITE BeGenius**, un pool de matrices dopées avec un matériel de référence de Pneumocystis à la concentration revendiquée.

Pour chaque matrice, les résultats obtenus ont confirmé la concentration revendiquée pour la cible du Pneumocystis ELITE MGB Kit sur les ELITE InGenius et ELITE BeGenius.

11.2 Plage de mesure linéaire

La plage de mesure linéaire du test a été déterminée en association avec chaque matrice sur les **ELITE InGenius** et **ELITE BeGenius** en utilisant un panel de dilutions de l'ADN cible de PJ (dopé avec un ADN plasmidique quantifié contenant l'amplicon du gène mtLSU) dans une matrice négative pour l'ADN de PJ.

Les résultats de chaque matrice sont présentés aux paragraphes suivants.

Expectorations :

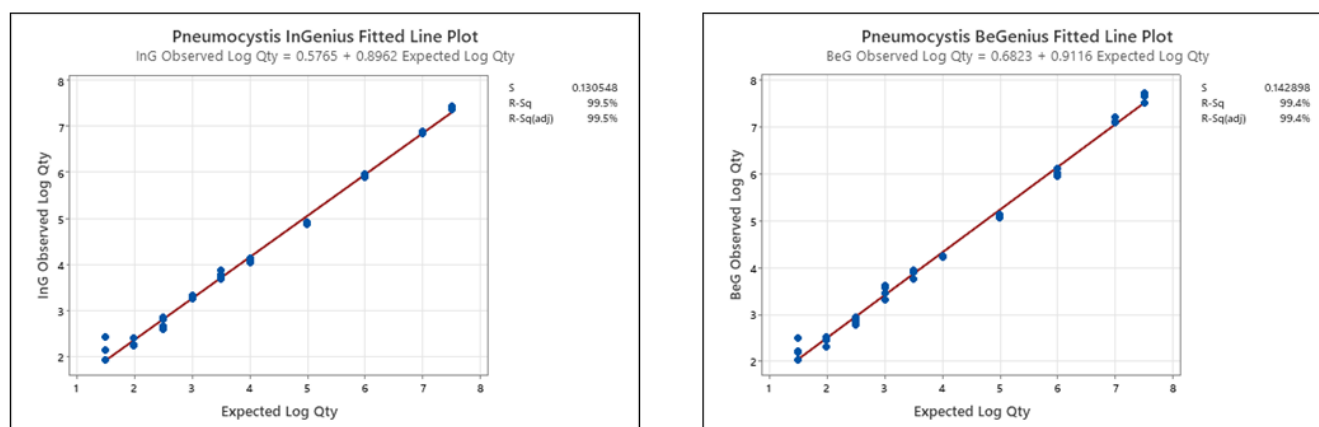


Fig. 1

Les résultats obtenus avec les ELITE InGenius et ELITE BeGenius ont été analysés par une régression orthogonale et linéaire afin de calculer la corrélation entre les méthodes.

Les résultats sont résumés sur la figure suivante.

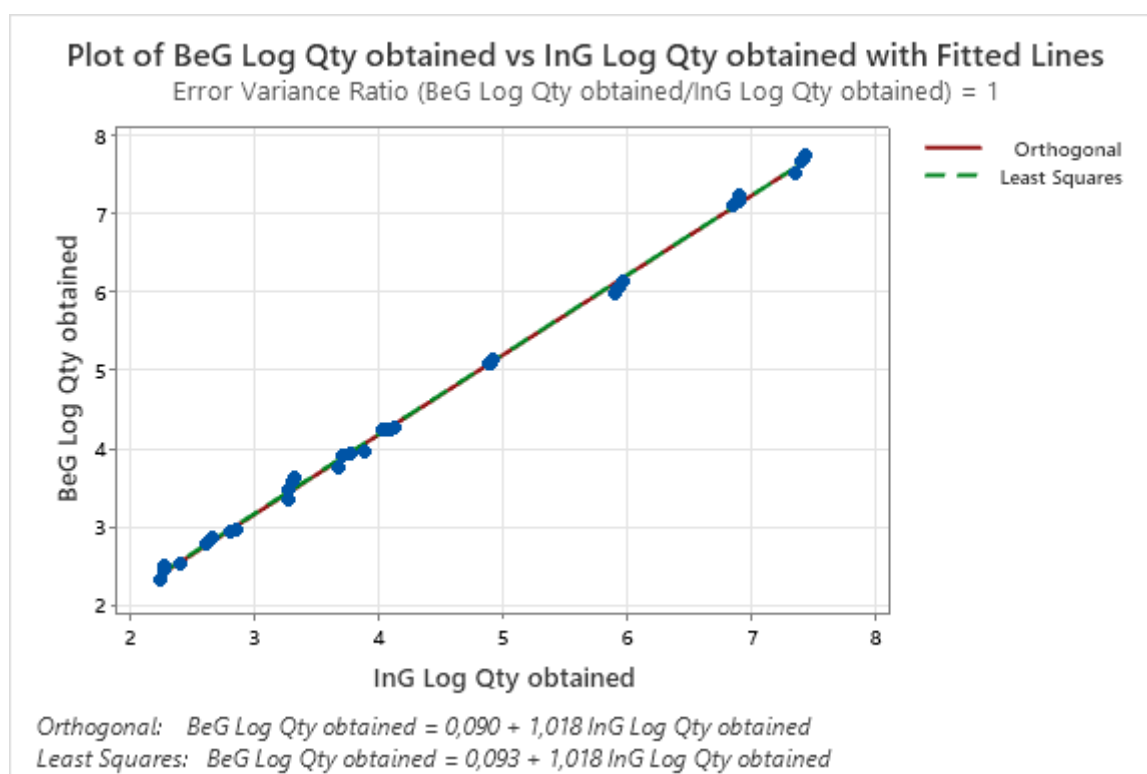


Fig. 2

L'analyse de régression orthogonale générât une ordonnée à l'origine de 0,090 (IC à 95 % : 0,0291, 0,1509) et une pente de 1,018 (CI à 95 % : 1,0059, 1,0308).

LBA/AB :

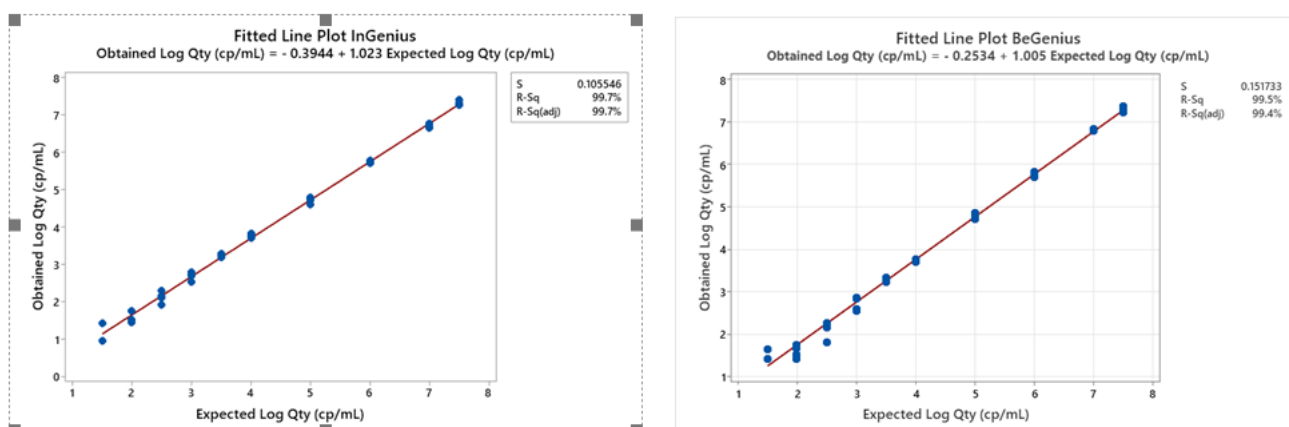


Fig. 3

Les résultats obtenus avec les ELITE InGenius et ELITE BeGenius ont été analysés par une régression orthogonale et linéaire afin de calculer la corrélation entre les méthodes.

Les résultats sont résumés sur la figure suivante.

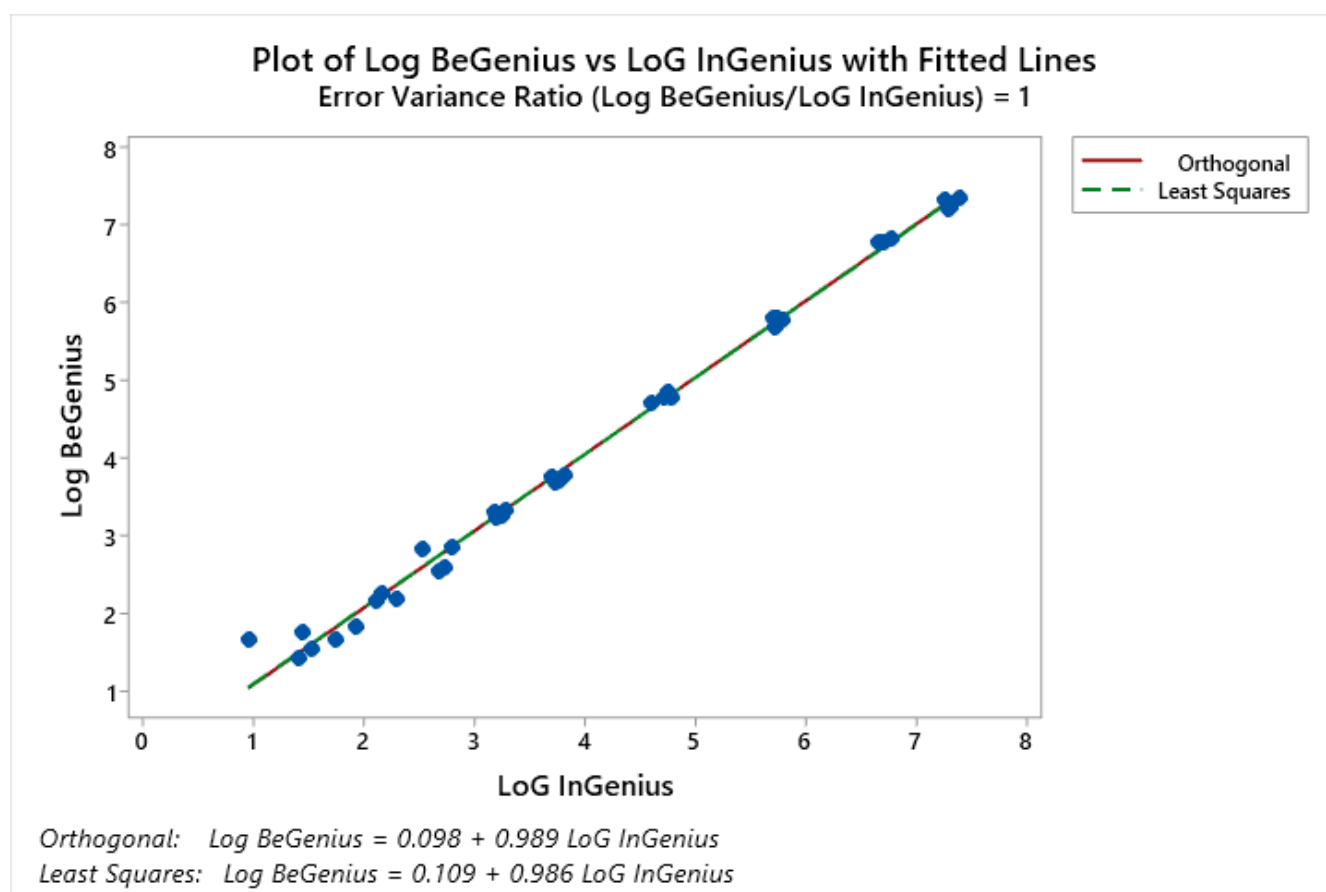


Fig. 4

L'analyse de régression orthogonale génère une ordonnée à l'origine de 0,098 (IC à 95 % : -0,0134 ; 0,2099) et une pente de 0,989 (IC à 95 % : 0,9647, 1,0137).

Les résultats finaux sont résumés dans le tableau suivant.

Tableau 9 Plage de mesure linéaire pour les échantillons d'expectorations et de LBA/AB avec les ELiTe InGenius et ELiTe BeGenius

Limite inférieure	Limite supérieure
97 copies/mL	31 622 777 copies/mL

11.3 Inclusivité : efficacité de détection et de quantification de différents génotypes

L'efficacité de détection de différents génotypes a été évaluée par une comparaison avec des séquences disponibles dans la base de données de nucléotides ENA de l'EBI.

L'analyse des régions choisies pour l'hybridation des amorces et des sondes fluorescentes dans l'alignement des séquences disponibles dans la base de données pour la région du gène mtLSU des isolats de PJ a montré leur conservation et une absence de mutations significatives.

L'inclusivité du test, en ce qui concerne l'efficacité de détection de différents isolats de *Pneumocystis*, a été évaluée en testant le panel QCMD 2018 *Pneumocystis jirovecii pneumonia* EQA Panel (Qnostics), qui est composé de 6 isolats cliniques différents.

Les résultats finaux sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau 10

Matériel de référence				Résultats du Pneumocystis ELiTe MGB Kit	
Échantillons	Description de l'échantillon	Fréquence de détection	Échantillon Statut	Ct de PJ	Copies/mL de PJ
PCPDNA18S-01	<i>P. jirovecii</i> (Clinique)	Détecté	Authentique	33,60	1771
				33,69	2704
PCPDNA18S-02	<i>P. jirovecii</i> (j888023)	Fréquemment détecté	Authentique	32,19	4805
				32,56	5706
PCPDNA18S-03	<i>P. jirovecii</i> (j888023)	Fréquemment détecté	Authentique	30,11	20904
				30,28	25449
PCPDNA18S-04	<i>P. jirovecii</i> (Type A1)	Fréquemment détecté	Authentique	33,83	1507
				33,57	2933
PCPDNA18S-05	<i>P. jirovecii</i> (Clinique)	Détecté	Authentique	34,06	1280
				34,81	1298
PCPDNA18S-06	<i>P. jirovecii</i> (g885652)	Fréquemment détecté	Authentique	35,60	432
				37,69	196
PCPDNA18S-07	<i>P. jirovecii</i> (j888023)	Détecté	Matériel pédagogique	37,55	109
				37,14	280
PCPDNA18S-08	<i>P. jirovecii</i> Négatif	Négatif	Authentique	Indéterminé	Indéterminé
				Indéterminé	Indéterminé
PCPDNA18S-09	<i>P. jirovecii</i> (Type A1)	Détecté	Matériel pédagogique	37,11	149
				36,91	326

Tableau 10 (continued)

PCPDNA18S-10	<i>P. jirovecii</i> (j888023)	Fréquemment détecté	Authentique	31,75	6547
				33,27	3565

Les 9 échantillons positifs ont tous été correctement détectés par le Pneumocystis ELITE MGB Kit en association avec l'instrument ELITE InGenius.

L'inclusivité du test, en ce qui concerne l'efficacité de détection de différents isolats de Pneumocystis, a également été évaluée en analysant des échantillons cliniques positifs de LBA/AB et d'expectorations qui ont été testés à l'aide d'une méthode de DIV de référence portant le marquage CE.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant.

Tableau 11

Échantillons	N	positifs	négatifs	non valides
LBA/AB positif pour PJ	15	15	0	0
Expectorations positives pour PJ	8	8	0	0

Les 23 échantillons cliniques positifs se sont tous avérés positifs à l'aide du Pneumocystis ELITE MGB Kit en association avec l'instrument ELITE InGenius.

11.4 Marqueurs potentiellement interférents : réactivité croisée

La réactivité croisée potentielle avec d'autres organismes non souhaitables du produit Pneumocystis ELITE MGB Kit a été évaluée par une analyse *in silico* des séquences disponibles dans la base de données de nucléotides ENA de l'EBI. L'analyse a montré une absence d'homologie significative avec d'autres organismes non souhaitables (autres organismes, incluant d'autres champignons).

L'absence de réactivité croisée avec d'autres organismes potentiellement interférents qui peuvent être présents dans des échantillons cliniques de LBA/AB a également été vérifiée en analysant un panel de matériels de référence certifiés (ATCC) à un titre élevé.

Les résultats finaux sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau 12 Marqueurs exerçant une réactivité croisée potentielle

Organisme	Souche	Résultat
<i>Aspergillus fumigatus</i>	118	Aucune réactivité croisée
<i>Candida albicans</i>	3147	Aucune réactivité croisée
<i>Staphylococcus aureus</i>	Rosenbach	Aucune réactivité croisée
<i>Escherichia coli</i>	H10407	Aucune réactivité croisée
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Aucune réactivité croisée
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	Aucune réactivité croisée
<i>Haemophilus influenzae</i>	Rd	Aucune réactivité croisée
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6	Aucune réactivité croisée
<i>Legionella pneumophila</i>	Philadelphia-1	Aucune réactivité croisée
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	FH	Aucune réactivité croisée
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	AR-39	Aucune réactivité croisée

Tableau 12 Marqueurs exerçant une réactivité croisée potentielle (continued)

<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	-	Aucune réactivité croisée
CMV	AD-169	Aucune réactivité croisée
Entérovirus	Entérovirus 71	Aucune réactivité croisée
Adénovirus	Adénoïde 6	Aucune réactivité croisée
Virus de la grippe A	A/PR/8/34	Aucune réactivité croisée
Virus de la grippe B	B/Florida/4/2006	Aucune réactivité croisée
RSV	A2	Aucune réactivité croisée

Tous les organismes exerçant une réactivité croisée potentielle ont généré un résultat négatif pour la cible lorsqu'ils ont été testés à l'aide du Pneumocystis ELiTe MGB Kit.

11.5 Marqueurs potentiellement interférents : inhibition

L'absence d'interférence avec l'amplification de la cible par d'autres organismes qui peuvent être présents dans des échantillons cliniques de LBA/AB a été vérifiée en testant le panel de matériels certifiés. L'ADN ou l'ARN génomique de différents organismes exerçant une réactivité croisée potentielle (ATCC) a été dopé avec de l'ADN plasmidique contenant l'amplicon du gène mtLSU à une faible concentration (environ 10 copies/réaction).

Les résultats finaux sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau 13 Marqueurs potentiellement interférents

Organisme	Souche	Résultat
<i>Aspergillus fumigatus</i>	118	Aucune interférence
<i>Candida albicans</i>	3147	Aucune interférence
<i>Staphylococcus aureus</i>	Rosenbach	Aucune interférence
<i>Escherichia coli</i>	H10407	Aucune interférence
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Aucune interférence
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	Aucune interférence
<i>Haemophilus influenzae</i>	Rd	Aucune interférence
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R6	Aucune interférence
<i>Legionella pneumophila</i>	Philadelphia-1	Aucune interférence
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	FH	Aucune interférence
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	AR-39	Aucune interférence
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	-	Aucune interférence
CMV	AD-169	Aucune interférence
Entérovirus	Entérovirus 71	Aucune interférence
Adénovirus	Adénoïde 6	Aucune interférence
Virus de la grippe A	A/PR/8/34	Aucune interférence

Tableau 13 Marqueurs potentiellement interférents (continued)

Virus de la grippe B	B/Florida/4/2006	Aucune interférence
RSV	A2	Aucune interférence

Tous les organismes potentiellement interférents n'avaient aucune influence sur l'amplification de la cible lorsqu'ils ont été testés à l'aide du Pneumocystis ELITE MGB Kit.

11.6 Substances potentiellement interférentes

L'effet de substances potentiellement interférentes a été évalué avec des échantillons contenant des substances endogènes : sang total, mucine, antibiotiques, stéroïdes, antihistaminiques.

Les échantillons de LBA/AB ont été dopés avec un matériel de référence de PJ (Qnostics) à une concentration de 3 x la LoD et avec les substances potentiellement interférentes.

Les valeurs Ct de la cible et du contrôle interne (échantillons de référence et de test) ont été utilisées pour calculer le pourcentage du coefficient de variation (% CV) afin d'évaluer l'éventuelle interférence.

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau 14 Substances potentiellement interférentes

Échantillon	Pos./Rép.	% CV Ct de PJ	% CV Ct de l'IC
Sang total à 5 %	3/3	1,41	0,94
Mucine à 1 %	3/3	0,29	0,91
Chlorhydrate d'ambroxol à 6 µg/mL	3/3	0,60	0,53
Sulfaméthoxazole à 160 µg/mL + triméthoprim à 32 µg/mL	3/3	1,35	0,54
Ampicilline à 200 µg/mL	3/3	1,72	0,60
Béclométhasone à 40 ng/mL	3/3	1,28	0,71
Ébastine à 4 µg/mL	3/3	0,64	0,81

Comme attendu, tous les échantillons se sont révélés positifs pour la cible d'intérêt. Le pourcentage % CV des valeurs Ct était inférieur à 2 %. Aucune des substances testées aux concentrations indiquées n'a interféré avec la détection de la cible à l'aide du Pneumocystis ELITE MGB Kit.

11.7 Répétabilité

La répétabilité du test a été évaluée sur les instruments **ELITE InGenius** et **ELITE BeGenius** en analysant un panel d'échantillons de LBA/AB, incluant un échantillon négatif et deux échantillons dopés avec de l'ADN de PJ.

Les résultats sont présentés dans les tableaux ci-dessous.

Tableau 15 Répétabilité intra-session avec le ELITE InGenius

Description	N	PJ			
		Ct moyen	EC	% CV	Concordance (%)
Négatif	8	N.A.	N.A.	N.A.	100 %
3 x la LoD	8	37,08	0,42	1,13	100 %
10 x la LoD	8	35,04	0,48	1,37	100 %

Tableau 16 Répétabilité inter-sessions avec le ELITE InGenius

Échantillon	N	PJ			
		Ct moyen	EC	% CV	Concordance (%)
Négatif	16	N.A.	N.A.	N.A.	100 %
3 x la LoD	16	37,23	0,72	1,93	100 %
10 x la LoD	16	35,28	0,46	1,30	100 %

Tableau 17 Répétabilité intra-session avec le ELITE BeGenius

Échantillon	N	PJ			
		Ct moyen	EC	% CV	Concordance (%)
Négatif	8	N.A.	N.A.	N.A.	100 %
3 x la LoD	8	37,45	0,32	0,86	100 %
10 x la LoD	8	35,37	0,44	1,25	100 %

Tableau 18 Répétabilité inter-sessions avec le ELITE BeGenius

Échantillon	N	PJ			
		Ct moyen	EC	% CV	Concordance (%)
Négatif	16	N.A.	N.A.	N.A.	100 %
3 x la LoD	16	37,98	1,05	2,76	100 %
10 x la LoD	16	35,79	0,63	1,76	100 %

Dans le test de répétabilité, le Pneumocystis 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) inférieure à 5 %.

11.8 Reproductibilité

La reproductibilité du test a été évaluée sur les instruments **ELITE InGenius** et **ELITE BeGenius** en analysant un panel d'échantillons de LBA/AB, incluant un échantillon négatif et deux échantillons dopés avec de l'ADN de PJ.

Un résumé de la reproductibilité inter-instruments est présenté dans les tableaux.

Tableau 19 Reproductibilité inter-instruments avec le ELITE InGenius

Échantillon	N	PJ			
		Ct moyen	EC	% CV	Concordance (%)
Négatif	8	N.A.	N.A.	N.A.	100 %
3 x la LoD	8	36,63	0,63	1,72	100 %
10 x la LoD	8	34,42	0,48	1,39	100 %

Tableau 20 Reproductibilité inter-instruments avec le ELITE BeGenius

Échantillon	N	PJ			
		Ct moyen	EC	% CV	Concordance (%)
Négatif	8	N.A.	N.A.	N.A.	100 %
3 x la LoD	8	37,26	0,41	1,11	100 %
10 x la LoD	8	34,92	0,40	1,16	100 %

Tableau 21 Reproductibilité inter-lots avec le ELITE InGenius

Échantillon	N	PJ			
		Ct moyen	EC	% CV	Concordance (%)
Négatif	8	N.A.	N.A.	N.A.	100 %
3 x la LoD	8	36,99	0,48	1,29	100 %
10 x la LoD	8	35,03	0,44	1,25	100 %

Tableau 22 Reproductibilité inter-lots avec le ELITE BeGenius

Échantillon	N	PJ			
		Ct moyen	EC	% CV	Concordance (%)
Négatif	8	N.A.	N.A.	N.A.	100 %
3 x la LoD	8	37,59	0,38	1,02	100 %
10 x la LoD	8	35,70	0,59	1,65	100 %

Dans le test de reproductibilité, le Pneumocystis 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) inférieure à 5 %.

11.9 Spécificité diagnostique : confirmation des échantillons négatifs

La spécificité diagnostique du test, en tant que confirmation des échantillons cliniques négatifs, a été évaluée en association avec le **ELITE InGenius** en analysant des échantillons de LBA/AB et d'expectorations qui étaient négatifs pour l'ADN de PJ (testés avec un produit d'amplification en temps réel de DIV portant le marquage CE). 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.

Échantillons	N	Positifs	Négatifs	Spécificité diagnostique (%)
LBA/AB négatif pour PJ	58	2	56	96,6
Expectorations négatives pour PJ	35	1	34	97,10

Tous les échantillons étaient valides pour l'analyse.

La valeur seuil Ct du Contrôle interne (Ct de l'IC) est définie à 34 avec le **ELITE InGenius** et à 35 avec le **ELITE BeGenius** pour les échantillons de LBA/AB.

La valeur seuil Ct du Contrôle interne (Ct de l'IC) est définie à 37 pour les échantillons d'expectorations lorsqu'ils sont testés avec les **ELITE InGenius** et **ELITE BeGenius**.

11.10 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 LBA/AB et d'expectorations qui étaient positifs pour l'ADN de PJ (testés avec un kit de PCR en temps réel de DIV portant le marquage CE) ou avaient été dopés avec un matériel de référence de PJ. 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.

Échantillons	N	Positifs	Négatifs	Sensibilité diagnostique (%)
LBA/AB positif pour PJ	13	13	0	100
LBA/AB dopé avec PJ	30	30	0	100
Nombre total d'échantillons de LBA/AB	43	43	0	100
Expectorations positives pour PJ	8	8	0	100
Expectorations dopées avec PJ	30	24	6	80
Nombre total d'échantillons d'expectorations	38	32	6	84,2

NOTE!

Les données complètes et les résultats des tests effectués pour évaluer les caractéristiques de performance du produit avec les matrices et l'instrument sont présentés dans la Fiche technique du produit « PJ ELITE MGB Kit », FTP150ING.

12 BIBLIOGRAPHIE

- C. Valero et al. (2016) *Front. Microbiol.* 7:1413
M. Maillet et al. (2014) *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 33(3):331-6
E. A. Lukhtanov et al. (2007) *Nucleic Acids Res.* 35: e30
K. Linnet et al. (2004) *Clin. Chem.* 50: 732 - 740

13 LIMITES DE LA PROCÉDURE

Utiliser ce produit uniquement avec les échantillons cliniques suivants : LBA/AB, expectorations liquéfiées.

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

Ne pas utiliser ce produit avec des échantillons contenant une quantité excessive de mucine : les échantillons dont la viscosité est élevée inhibent les réactions d'amplification des acides nucléiques et peuvent générer des résultats non valides.

Il n'existe actuellement aucune donnée disponible en ce qui concerne les performances du produit avec l'ADN extrait des échantillons cliniques suivants : prélèvements respiratoires à l'écouvillon.

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.

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

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

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 dans la région de l'ADN ciblée par les amorces et les sondes du produit peuvent affecter la détection et la quantification 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.

14 PROBLÈMES ET SOLUTIONS

Tableau 23

Réaction du Q-PCR Standard, courbe d'étalonnage ou réaction du Positive Control non valide	
Causes possibles	Solutions
Erreur de paramétrage de l'instrument.	Vérifier la position du PCR Mix, des Q-PCR Standards et du Positive Control. Vérifier les volumes du PCR Mix, des Q-PCR Standards et du Positive Control.
Dégradation du PCR Mix.	Ne pas utiliser le PCR Mix pendant plus de 7 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 trois sessions d'analyse consécutives (7 heures 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 des Q-PCR Standards ou du Positive Control.	Ne pas utiliser le Q-PCR Standard pendant plus de 4 sessions d'analyse indépendantes (de 2 heures chacune dans la « Extraction Area » [Zone d'extraction] ou dans la Cooler Unit). 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). Utiliser de nouvelles aliquotes des Q-PCR Standards ou du Positive Control.
Erreur de l'instrument.	Contacter le service technique d'ELITechGroup.

Tableau 24

Réaction du Contrôle négatif non valide	
Causes possibles	Solutions
Erreur de paramétrage de l'instrument.	Vérifier la position du PCR Mix et du Negative Control. Vérifier les volumes du PCR Mix et du Negative Control.
Contamination du PCR Mix.	Utiliser une nouvelle aliquote du PCR Mix.
Contamination du Negative Control.	Ne pas utiliser le Negative Control pour plus d'une session d'analyse. Utiliser une nouvelle aliquote d'eau de qualité biologie moléculaire.
Contamination de la zone d'extraction, des racks ou du « Inventory Block » (Gestionnaire de stocks).	Nettoyer les surfaces avec des détergents aqueux, laver les blouses de laboratoire, remplacer les tubes et les embouts utilisés.
Erreur de l'instrument.	Contacter le service technique d'ELITechGroup.

Tableau 25

Réaction de l'échantillon non valide	
Causes possibles	Solutions
Erreur de paramétrage de l'instrument.	Vérifier la position du PCR Mix, du Internal Control et de l'échantillon. Vérifier les volumes du PCR Mix, du Internal Control et de l'échantillon.
Dégradation du PCR Mix.	Ne pas utiliser le PCR Mix pendant plus de 7 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 trois sessions d'analyse consécutives (7 heures 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 Internal Control.
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 26

Courbe de dissociation anormale	
Causes possibles	Solutions
Absence de pic défini. Pic défini mais Tm différente de celles des autres échantillons et de celle des étalons ou du Positive Control.	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 27

Erreur de calcul de la valeur Ct	
Causes possibles	Solutions
Concentration trop élevée de la cible dans l'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 biologie moléculaire, lors d'une session d'analyse « PCR Only » (PCR seulement) ou - répéter l'extraction de l'échantillon avec une dilution à 1:10 dans de l'eau de qualité biologie moléculaire, lors d'une session d'analyse « Extract + PCR » (Extraction + PCR).

Tableau 28

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 pendant les 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.

15 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.

16 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 Pneumocystis 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 **Pneumocystis ELiTe MGB Kit** est un dispositif médical de diagnostic *in vitro* destiné à être utilisé par les professionnels de santé en tant que test quantitatif de PCR en temps réel des acides nucléiques pour la **détection et la quantification de l'ADN de *Pneumocystis jirovecii* (PJ)** dans des échantillons d'ADN extraits d'échantillons cliniques.

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 lavage bronchoalvéolaire (LBA), d'aspirat bronchique (AB) et d'expectorations liquéfiées.

Le produit est destiné à une utilisation diagnostique *in vitro* en tant qu'aide au diagnostic et à la surveillance d'une infection à *Pneumocystis jirovecii*.

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

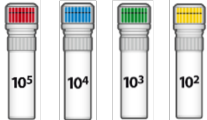
Séquence amplifiée

Séquence	Gène	Fluorophore	Canal
Cible	mtLSU	FAM	PJ
Contrôle interne	séquence artificielle (IC2)	AP525	IC

Matrices validées

- LBA/AB
- Échantillons d'expectorations liquéfiées

Contenu du kit et produits associés

Pneumocystis ELiTe MGB Kit	Pneumocystis ELiTe Standard	Pneumocystis - ELiTe Positive Control
 X 8	 X 2	 X 3
PCR Mix prêt à l'emploi 8 tubes de 280 µL 96 réactions par kit 7 cycles de congélation/décongélation	4 niveaux prêts à l'emploi : 10 ⁵ , 10 ⁴ , 10 ³ , 10 ² 2 jeux de 4 tubes de 200 µL 4 cycles de congélation/décongélation	CP prêt à l'emploi : 3 tubes de 160 µL 12 réactions par kit 4 cycles de congélation/décongélation

Durée de conservation maximale : **24 mois**

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 SP 200 Consumable Set: INT032CS. - ELITE InGenius PCR Cassette : INT035PCR. - ELITE InGenius Waste Box : F2102-000.	- CPE – Internal Control : CTCPE 300 µL Filter Tips Axygen : TF-350-L-R-S. 1000 µL Filter Tips Tecan : 30180118.
--	--

Protocole avec les ELITE InGenius et ELITE BeGenius

Tableau 29

› Volume d'échantillon	200 µL	› Volume de R/MG PCR Mix :	20 µL
› Volume de CPE	10 µL	› Fréquence des contrôles	15 jours
› Volume d'élution total	100 µL	› Fréquence de l'étalonnage	60 jours
› Volume initial de PCR	20 µL	Unité du résultat quantitatif	Copies/mL

Performances de ELITE InGenius et ELITE BeGenius

Matrice	Limite de détection	Plage de linéarité	Sensibilité diagnostique	Spécificité diagnostique
LBA	97 cp/mL	97 – 31 627 777	100 % 43/43*	96,6 % 56/58*
Expectorations	97 cp/mL	97 – 31 627 777	84,2 % 32/38*	97,1 % 34/35*

*échantillons confirmés/échantillons testés

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 :

Échantillon	Exigences de prélèvement	Conditions de transport/conservation			
		+16/+26 °C (température ambiante)	+2/+8 °C	-20 ± 10 °C	-70 ± 15 °C
Lavage bronchoalvéolaire/ aspirat bronchique (LBA/AB)	dans une solution physiologique stérile ou du PBS* stérile		≤ 1 se- maine	≤ 30 jours	≤ 1 an
Expectorations (SP)			≤ 1 se- maine	≤ 30 jours	> 30 jours

*PBS : solution saline tamponnée au phosphate

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 : PJ ELiTe_BAL_200_100 ou PJ ELiTe_SP_200_100 ou	5. Sélectionner la méthode « Extract + PCR » (Extraction + PCR) et la position de l'échantillon : Tube primaire ou Tube d'extraction	6. Charger le PCR Mix et le Contrôle interne dans le « Inventory Block » (Gestionnaire de stocks)
7. Charger : la PCR Cassette (Cassette de PCR), la cartouche d'extraction, le tube d'élution, la cassette à embouts, les racks de tubes d'extraction et les compartiments des échantillons primaires	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, étalons, 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 : PJ ELiTe_PC et PJ 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. 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 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 (PJ ELiTe_Be_BAL_200_100 ou PJ ELiTe_Be_SP_200_100 ou 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'éluat vides. Charger les tubes dans le « Elution Rack » (Rack d'éluat) 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'éluat), 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, étalons, 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'éluat), 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 (EV ELiTe_Be_PC and EV ELiTe_Be_NC or EV ELiTe_Be_STD)	5. Load the complete reaction mixture in the Reagent/Elution Rack and insert it in the 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

