

Mode d'emploi

RealStar[®] Malaria PCR Kit 1.0

08/2018 FR

RealStar[®]

Malaria PCR Kit 1.0

Pour utilisation avec

Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)
ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)
Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
LightCycler® 480 Instrument II (Roche)



341013



96



08 2018



altona Diagnostics GmbH • Mörkenstr. 12 • D-22767 Hamburg

Sommaire

1.	Usage prévu.....	6
2.	Composants du kit.....	6
3.	Conservation	6
4.	Matériel requis non fourni	7
5.	Informations générales.....	8
6.	Description du produit.....	9
6.1	Instruments de PCR en temps réel	10
7.	Mises en garde et précautions.....	10
8.	Mode d'emploi	12
8.1	Préparation du prélèvement.....	12
8.2	Préparation du Mastermix	13
8.3	Préparation de la réaction	15
9.	Programmation des instruments de PCR en temps réel.....	15
9.1	Paramètres.....	16
9.2	Marqueurs de fluorescence (fluorophores)	16
9.3	Profil de température et acquisition du fluorophore	16
10.	Analyse des données	17
10.1	Validation des tests de diagnostic	17
10.1.1	Validité des tests de diagnostic (qualitatif)	17
10.1.2	Invalidité des tests de diagnostic (qualitatif).....	17
10.2	Interprétation des résultats.....	18
10.2.1	Analyse qualitative	18
11.	Evaluation des performances	18

11.1	Sensibilité analytique	18
11.2	Spécificité analytique	19
11.3	Précision	21
11.4	Diagnostic Evaluation	22
12.	Limites.....	23
13.	Contrôle qualité.....	23
14.	Assistance technique	24
15.	Bibliographie	24
16.	Marques déposées et responsabilité	24
17.	Explications des symboles	26

1. Usage prévu

Le kit RealStar® Malaria PCR Kit 1.0 est un test de diagnostic *in vitro*, basé sur la technologie de PCR en temps réel, pour la détection de l'ADN spécifique du *Plasmodium* spp., comprenant les cinq espèces pathogènes humaines *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* et *Plasmodium knowlesi*.

2. Composants du kit

Couleur du bouchon	Composants	Nombre de tubes	Volume [µL/tube]
Bleu	Master A	8	60
Violet	Master B	8	180
Vert	Internal Control	1	1000
Rouge	Positive Control	1	250
Blanc	Water (PCR grade)	1	500

Internal Control = Contrôle interne

Positive Control (PC) = Contrôle positif

Water (PCR grade) = Eau ultra-pure pour biologie moléculaire

3. Conservation

- Le kit RealStar® Malaria PCR Kit 1.0 est expédié sous glace carbonique. Les composants du kit doivent arriver congelés. Si un ou plusieurs composants ne sont pas congelés à réception, ou si l'un des tubes a été endommagé pendant le transport, merci de contacter altona Diagnostics GmbH pour assistance.
- Tous les composants doivent être conservés entre -25°C et -15°C dès leur livraison.
- Il convient d'éviter des cycles répétés de congélation-décongélation (plus de deux) car cela peut affecter les performances du test. Les réactifs doivent être congelés en aliquots en cas d'utilisation occasionnelle.

- La conservation entre +2°C et +8°C ne doit pas excéder une période de deux heures.
- Le Master A et le Master B doivent être conservés à l'abri de la lumière.

4. Matériel requis non fourni

- Instrument adapté à la PCR en temps réel (Chapitre 6.1 Instruments de PCR en temps réel)
- Système ou kit approprié à l'extraction des acides nucléiques (voir chapitre 8.1 Préparation du prélèvement)
- Centrifugeuse de paillasse avec rotor pour des tubes réactionnels de 2 mL
- Centrifugeuse avec rotor pour microplaques, si des plaques de 96 puits sont utilisées
- Vortex
- Plaques de 96 puits ou tubes réactionnels avec le matériel de fermeture correspondant (optique)
- Pipettes (réglables)
- Cônes avec filtres (jetables)
- Gants non talqués (jetables)

NOTE



Merci de vous assurer que les instruments ont été installés, calibrés, vérifiés et entretenus selon les instructions et les recommandations du fabricant.

NOTE



Il est fortement recommandé d'utiliser le rotor de 72 puits avec les tubes réactionnels de 0,1 ml correspondants, si le Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research) ou le Rotor-Gene® Q 5/6 plex (QIAGEN) est utilisé.

5. Informations générales

La malaria fait partie des maladies infectieuses les plus importantes dans le monde entier. Environ 250 millions de personnes sont infectées chaque année, dont la plupart des cas sont localisés en Afrique, en Asie et en Amérique du Sud. De 800.000 à 1.2 millions personnes meurent de la malaria par an (source RKI, 2012).

La malaria est une maladie infectieuse à transmission vectorielle, causé par des parasites eucaryotes du genre *Plasmodium*. Les parasites se transmettent entre les personnes par les piqûres de moustiques Anopheles infectés. Les infections peuvent aussi arriver à l'intérieur et autour des aéroports par une importation méconnue de moustiques infectés dans les avions ou les bagages des voyageurs (la malaria des aéroports et des bagages). L'infection par le don du sang est aussi possible.

Il y a cinq espèces pathogènes humaines connues: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* et *Plasmodium knowlesi*. La malaria est une maladie fébrile aiguë. Chez un individu non-immunisé, les symptômes apparaissent entre 7 à 15 jours après l'infection. Les premiers symptômes, la fièvre, le mal de tête, les frissons et les vomissements, peuvent être légers et difficiles à reconnaître. Les symptômes sont souvent diagnostiqués à tort comme un rhume ou une infection gastro-intestinale commune. Si elle n'est pas traitée, la malaria peut évoluer vers une maladie sévère souvent mortelle. Pour *P. vivax* et *P. ovale*, des rechutes cliniques peuvent être observées des semaines ou des mois après la première infection. Ces nouveaux épisodes résultent des formes qui sont latentes dans le foie connues comme des hypnozoïtes. Dans les zones endémiques de malaria, les personnes peuvent développer une immunité partielle, provoquant des infections asymptomatiques.

Le meilleur traitement de la malaria disponible, particulièrement pour les infections à *P. falciparum*, est l'association médicamenteuse à base d'artémisinine (ACT). Un vaccin contre l'espèce pathogène humaine de *Plasmodium* n'est pas disponible..

6. Description du produit

Le kit RealStar® Malaria PCR Kit 1.0 est un test de diagnostic *in vitro*, basé sur la technologie de PCR en temps réel, pour la détection de l'ADN spécifique du *Plasmodium* spp., comprenant les cinq espèces pathogènes humaines *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* et *Plasmodium knowlesi*.

Le kit comprend un système d'amplification hétérologue (contrôle interne) afin d'identifier d'éventuelles inhibitions de la PCR et de confirmer l'intégrité des réactifs du kit.

Le test repose sur la technologie de PCR en temps réel, utilisant une réaction en chaîne par polymérase (PCR) pour l'amplification de séquences cibles spécifiques et de sondes cibles spécifiques pour la détection de l'ADN amplifié. Les sondes sont marquées avec un marqueur fluorescent (reporter) et un désactivateur (quencher).

Les sondes spécifiques de l'ADN du *Plasmodium* spp. sont marquées par le fluorophore FAM™. La sonde spécifique du contrôle interne est marquée par le fluorophore JOE™.

L'utilisation de sondes associées à des fluorophores différents permet la détection en parallèle de l'ADN spécifique du *Plasmodium* spp. et du contrôle interne dans les canaux correspondants de l'instrument de PCR en temps réel.

Le test consiste en deux processus réalisés dans un même tube réactionnel:

- L'amplification par PCR de l'ADN et du contrôle interne
- La détection simultanée des amplicons de PCR par des sondes marquées par un fluorophore

Le kit RealStar® Malaria PCR Kit 1.0 est composé de:

- Deux Masters (Master A et Master B)
- Un contrôle interne

- Contrôle positif
- De l'eau ultra-pure (pour biologie moléculaire)

Les réactifs du Master A et du Master B contiennent tous les composants nécessaires (tampon PCR, ADN Polymérase, sel de magnésium, amorces et sondes) afin de réaliser l'amplification par PCR et la détection de la cible ADN spécifique du *Plasmodium* spp. ainsi que du contrôle interne en une seule étape de réaction.

6.1 Instruments de PCR en temps réel

Le kit RealStar® Malaria PCR Kit 1.0 a été développé et validé pour être utilisé avec les instruments de PCR en temps réel suivants:

- Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
- VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)
- ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
- ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
- Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)
- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

7. Mises en garde et précautions

Lire attentivement le manuel d'utilisation avant d'utiliser le produit.

- Avant toute utilisation, veuillez vérifier que le produit et ses composants:
 - Ne sont pas endommagés,
 - Sont complets: nombre, type et volume (voir le chapitre 2. Composants du kit)
 - Sont correctement étiquetés,
 - Sont congelés à la réception

- L'utilisation de ce produit est limitée au personnel qualifié et formé aux techniques de PCR en temps réel et aux procédures de diagnostic *in vitro*.
- Manipuler les échantillons comme s'ils étaient infectieux et/ou dangereux, en accord avec les procédures de sécurité en vigueur dans le laboratoire.
- Porter des gants jetables non talqués, une blouse de laboratoire et des lunettes de protection lors de la manipulation des échantillons.
- Éviter les contaminations microbiennes et nucléaires (par ADNase/ARNase) de l'échantillon et des composants du kit.
- Toujours utiliser des pipettes à cônes jetables avec filtre, non contaminées par de l'ADNase et de l'ARNase.
- Toujours porter des gants de protection non talqués lors de la manipulation des composants du kit.
- Utiliser des zones de travail séparées les unes des autres pour les différentes activités de (i) préparation des échantillons, (ii) préparation de la réaction et (iii) les étapes d'amplification/détection. Le sens de travail dans le laboratoire doit être unidirectionnel. Porter des gants dans chaque zone de travail et les changer avant d'entrer dans une zone différente.
- Dédier des fournitures et du matériel pour chaque zone de travail et ne pas les déplacer d'une zone à une autre.
- Conserver le matériel positif et/ou potentiellement positif séparément des autres composants du kit.
- Ne pas ouvrir les tubes/plaques de réaction après l'amplification afin d'éviter toute contamination par les amplicons.
- Des témoins additionnels peuvent devoir être testés selon les directives des organisations locales/gouvernementales ou des organismes d'accréditation.
- Ne pas autoclaver des tubes réactionnels après une PCR, car ceci ne dégrade pas les acides nucléiques amplifiés et risque de contaminer le laboratoire.
- Ne pas utiliser les composants au-delà de leur date de péremption.
- Éliminer les échantillons et les déchets de l'essai conformément aux règles de sécurité locales.

8. Mode d'emploi

8.1 Préparation du prélèvement

L'ADN extrait constitue le matériel de départ pour le kit RealStar® Malaria PCR Kit 1.0.

La qualité de l'ADN extrait a un impact significatif sur la performance de l'ensemble du test. Il est important de s'assurer que le système d'extraction des acides nucléiques utilisé est compatible avec la technologie de PCR en temps réel. Les kits et systèmes suivants sont compatibles pour l'extraction des acides nucléiques:

- QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN)
- QIAamp® DNA Blood Mini Kit (QIAGEN)
- QIASymphony® (QIAGEN)
- NucliSENS® easyMag® (bioMérieux)
- MagNA Pure 96 System (Roche)
- m2000sp (Abbott)
- Maxwell® 16 IVD Instrument (Promega)
- VERSANT® kPCR Molecular System SP (Siemens Healthcare)

D'autres kits ou systèmes d'extraction des acides nucléiques peuvent être appropriés. L'aptitude de la procédure d'extraction des acides nucléiques à utiliser avec RealStar® Malaria PCR Kit 1.0 doit être validé par l'utilisateur.

Si la préparation des échantillons s'effectue sur une colonne comportant des tampons de lavage à l'éthanol, une étape de centrifugation supplémentaire de 10 minutes à environ 17000 x g (~ 13000 tr/min), dans un nouveau tube à essai, est vivement recommandée avant l'élution des acides nucléiques.

ATTENTION

L'éthanol est un fort inhibiteur de la PCR en temps réel. Si votre système de préparation des échantillons utilise des tampons de lavage à l'éthanol, assurez-vous d'éliminer toute trace d'éthanol avant de procéder à l'élution des acides nucléiques.

ATTENTION

L'utilisation d'ARN porteur (carrier) est crucial pour l'efficacité de l'extraction et la stabilité des acides nucléiques extraits.

Pour toute information complémentaire ou assistance technique sur le prétraitement et la préparation des échantillons, merci de contacter notre support technique (voir chapitre 14. Assistance technique).

8.2 Préparation du Mastermix

Tous les réactifs doivent être complètement décongelés, homogénéisés (par pipetage ou léger vortexage) et brièvement centrifugés avant utilisation.

Le kit RealStar® Malaria PCR Kit 1.0 contient un contrôle interne hétérologue pouvant être utilisé soit comme contrôle d'inhibition de la PCR soit comme contrôle de la préparation de l'échantillon (extraction des acides nucléiques) et de l'inhibition de la PCR.

- Si le contrôle interne est utilisé comme un contrôle d'inhibition de la PCR, mais non comme contrôle de préparation de l'échantillon, le Mastermix doit être préparé comme décrit par le schéma de pipetage ci-dessous:

Nombre de réactions (rxns)	1	12
Master A	5 µL	60 µL
Master B	15 µL	180 µL
Internal Control (contrôle interne)	1 µL	12 µL
Volume de Mastermix	21 µL	252 µL

- ▶ Si le contrôle interne est utilisé comme contrôle de préparation de l'échantillon, et d'inhibition de la PCR, le contrôle interne doit être ajouté au moment de la procédure d'extraction des acides nucléiques.
- ▶ Quelque soit la méthode ou le système utilisé pour l'extraction des acides nucléiques, le contrôle interne ne doit **jamais** être ajouté directement à l'échantillon. Le contrôle interne doit toujours être ajouté au mélange échantillon/ tampon de lyse. Le volume du contrôle interne à ajouter dépend toujours et uniquement du volume d'élution, dont il représente 10%. Par exemple si les acides nucléiques doivent être élués dans 60 µL de tampon d'élution ou d'eau, 6 µL de contrôle interne par échantillon doivent être ajoutés au mélange échantillon/tampon de lyse.
- ▶ Si le contrôle interne a été ajouté pendant la phase de préparation de l'échantillon, le Mastermix doit être préparé selon le schéma de pipetage suivant:

Nombre de réactions (rxns)	1	12
Master A	5 µL	60 µL
Master B	15 µL	180 µL
Volume de Mastermix	20 µL	240 µL

ATTENTION

Si le contrôle interne a été ajouté pendant la phase de préparation de l'échantillon, au moins le contrôle négatif doit inclure le contrôle interne.

ATTENTION

Ne jamais ajouter le contrôle interne directement à l'échantillon.

8.3 Préparation de la réaction

- ▶ Pipeter 20 µL de Mastermix dans chacun des puits nécessaires de la plaque 96 puits ou d'un tube à essai permettant les réactions optiques.
- ▶ Ajouter 10 µL d'échantillon (éluat issu de l'extraction des acides nucléiques) ou 10 µL des contrôles (contrôles positifs ou négatifs).

Préparation de la réaction	
Mastermix	20 µL
Echantillon ou contrôle	10 µL
Volume total	30 µL

- ▶ S'assurer qu'au moins un contrôle positif et un contrôle négatif sont utilisés par essai.
- ▶ Homogénéiser avec soin les échantillons et les contrôles avec le Mastermix par pipetage.
- ▶ Couvrir la plaque 96 puits avec un film adhésif transparent approprié et les tubes réactionnels à l'aide de bouchons appropriés.
- ▶ Centrifuger les plaques de 96 puits à l'aide d'un rotor à microplaques pendant 30 secondes à environ 1000 x g (~ 3000 tr/min).

9. Programmation des instruments de PCR en temps réel

Pour obtenir des informations générales sur la préparation et la programmation des différents instruments de PCR en temps réel, veuillez consulter les manuels d'utilisation des instruments respectifs.

Pour des instructions sur la programmation relative à l'utilisation du kit RealStar® Malaria PCR Kit 1.0 avec un instrument de PCR en temps réel spécifique, merci de contacter notre support technique (voir chapitre 14. Assistance technique).

9.1 Paramètres

- Définir les paramètres suivants:

Paramètres	
Volume de réaction	30 µL
Vitesse de la rampe	par défaut
Référence passive	ROX™

9.2 Marqueurs de fluorescence (fluorophores)

- Définir les marqueurs de fluorescence (fluorophores):

Cible	Nom du marqueur	Fluorophore (Reporter)	Désactivateur (Quencher)
ADN spécifique du <i>Plasmodium</i> spp.	<i>Plasmodium</i> spp.	FAM™	(aucun)
Internal Control (contrôle interne)	IC	JOE™	(aucun)

9.3 Profil de température et acquisition du fluorophore

- Définir le profil de température et l'acquisition du fluorophore:

	Mode d'analyse	Nombre de cycles	Acquisition	Température [°C]	Durée [min:sec]
Dénaturation	Stationnaire	1	-	95	10:00
Amplification	Cyclique	45	-	95	00:15
			oui	58	00:45
			-	72	00:15

10. Analyse des données

Pour des informations de base concernant l'analyse des données sur un instrument de PCR en temps réel spécifique, merci de se référer au manuel de l'instrument concerné.

Pour des informations détaillées concernant l'analyse des données générées avec le kit RealStar® Malaria PCR Kit 1.0 sur différents instruments de PCR en temps réel, merci de contacter notre support technique (voir chapitre 14. Assistance technique).

10.1 Validation des tests de diagnostic

10.1.1 Validité des tests de diagnostic (qualitatif)

Un test de diagnostic **qualitatif** est **valide**, si les valeurs suivantes des contrôles sont obtenues:

Nom du Contrôle	Canal de détection	
	FAM™	JOE™
Contrôle positif	+	+/-*
Contrôle négatif	-	+

* La présence ou l'absence d'un signal dans le canal JOE™ n'est pas pertinente pour la validité de l'essai

10.1.2 Invalidité des tests de diagnostic (qualitatif)

Un test de diagnostic **qualitatif** est **invalide**, (i) si l'essai n'est pas complet ou (ii) si l'ensemble des conditions de contrôle pour un test de diagnostics **valide** n'est pas obtenu.

En cas d'**invalidité** du test de diagnostic, répéter le test avec les acides nucléiques purifiés restants ou recommencer depuis l'échantillon de départ.

10.2 Interprétation des résultats

10.2.1 Analyse qualitative

Canal de détection		Interprétation des résultats
FAM™	JOE™	
+	+*	ADN spécifique du <i>Plasmodium</i> spp. détecté.
-	+	ADN spécifique du <i>Plasmodium</i> spp. non détecté. L'échantillon ne contient pas de quantités détectables d'ADN du <i>Plasmodium</i> spp..
-	-	Inhibition de la PCR ou défaillance des réactifs. Répéter le test à partir de l'échantillon d'origine ou bien prélever et tester un nouvel échantillon.

* La détection du contrôle interne dans le canal de détection JOE™ n'est pas requise pour des résultats positifs dans le canal de détection FAM™. De fortes charges en ADN spécifique du *Plasmodium* spp. dans l'échantillon peuvent conduire à des signaux absents ou très faibles pour le contrôle interne.

11. Evaluation des performances

L'évaluation des performances du kit RealStar® Malaria PCR Kit 1.0 a été effectuée en utilisant le "1^{er} Standard International de l'OMS pour les techniques d'amplification des acides nucléiques du *Plasmodium falciparum*(code NIBSC: 04/176)".

11.1 Sensibilité analytique

La sensibilité analytique (limite de détection: LoD) du kit RealStar® Malaria PCR Kit 1.0 est définie comme étant la concentration (UI/μL d'éluat) de molécules d'ADN spécifique du *Plasmodium* spp. pouvant être détectées avec un taux de positivité à 95%. La sensibilité analytique a été déterminée en analysant des dilutions en série du 1^{er} Standard International de l'OMS pour les techniques d'amplification des acides nucléiques du *Plasmodium falciparum*.

Tableau 1: Résultats de PCR utilisés pour le calcul de la sensibilité analytique concernant la détection de l'ADN spécifique du *Plasmodium* spp.

[C] initiale [UI/μL]	Nombre de répétitions	Nombre de Positifs	Taux de réussite [%]
10,000	12	12	100
3,160	12	12	100
1,000	12	12	100
0,316	12	8	67
0,100	12	4	33
0,032	12	4	33
0,010	12	1	8
0,003	12	0	0

La sensibilité analytique du kit RealStar® Malaria PCR Kit 1.0 a été déterminée par analyse Probit.

- Pour la détection de l'ADN spécifique du *Plasmodium* spp., la sensibilité analytique est de 1,27 UI/μL [95% intervalle de confiance (CI) : 0,57 - 5,42 UI/μL]

11.2 Spécificité analytique

La spécificité analytique du kit RealStar® Malaria PCR Kit 1.0 est assurée par une sélection minutieuse des oligonucléotides (amorces et sondes). Les séquences de ces derniers ont été comparées aux séquences publiques disponibles afin de s'assurer que toutes les souches intéressantes du *Plasmodium* spp. seront détectées.

Plus de 100 échantillons différents de sang total de *Plasmodium* négatifs ont été analysés avec le kit RealStar® Malaria PCR Kit 1.0, après l'extraction d'ADN en utilisant le kit QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen). Aucun d'entre eux ont montrés un signal positif à *Plasmodium* (FAM™), mais ils ont tous eu un signal valide pour le contrôle interne (JOE™).

Additionnellement, la spécificité du kit RealStar® Malaria PCR Kit 1.0 a été évalué en testant différentes espèces de *Plasmodium* spp., pour cela un panel d'ADN/ARN génomique a été extrait à partir d'autres espèces de *Plasmodium*, d'autres pathogènes transmissibles par le sang et de pathogènes causant des symptômes similaires.

Le kit RealStar® Malaria PCR Kit 1.0 n'a présenté aucune réaction croisée avec l'un des pathogènes spécifiés ci-dessous:

- Virus BK
- Cytomégalovirus
- Virus de la dengue
- Virus d'Epstein-Barr
- Virus de l'hépatite A
- Virus de l'hépatite B
- Virus de l'hépatite C
- Virus de l'hépatite E
- Virus de l'herpès simplex 1
- Virus de l'herpès simplex 2
- Herpèsvirus humain 6A
- Herpèsvirus humain 6B
- Herpèsvirus humain 7
- Herpèsvirus humain 8
- Virus de l'immunodéficience humaine 1
- Parvovirus B19 humain
- Grippe A
- Grippe B
- JC virus
- Virus de la varicelle et du zona
- Virus du Nil occidental

- *Leishmania donovani*
- *Leishmania infantum*
- *Leishmania major*
- *Toxoplasma gondii*
- *Trypanosoma cruzi*

11.3 Précision

Les données de précision du kit RealStar® Malaria PCR Kit 1.0 ont été déterminées comme étant la variabilité intra-essai (variabilité au sein d'une expérience), la variabilité inter-essai (variabilité entre différentes expériences) et la variabilité interlot (variabilité entre différents lots de production). La variabilité totale a été calculée en combinant les trois analyses.

La variabilité des données est exprimée en terme d'écart type et de coefficient de variation spécifique de ADN du *Plasmodium* spp. et basé sur les valeurs du cycle de seuil (C_t) en termes de contrôle interne. Au moins six réplicats par échantillon ont été analysés pour la variabilité intra-essai, l'inter-essai et la variabilité inter-lots.

Tableau 2: Données de précision pour l'ADN spécifique du *Plasmodium* spp.

<i>Plasmodium</i> spp.	Valeurs C_t moyennes	Ecart type	Coefficient de variation [%]
Variabilité intra-essai	29,05	0,18	0,63
Variabilité inter-essai	30,77	0,16	0,51
Variabilité inter-lot	29,14	0,64	2,21
Variabilité totale	29,65	0,27	0,92

Tableau 3: Données de précision pour le Contrôle interne

Contrôle interne	Valeurs C _t moyennes	Ecart type	Coefficient de variation [%]
Variabilité intra-essai	23,45	0,14	0,61
Variabilité inter-essai	25,87	0,33	1,26
Variabilité inter-lot	23,46	0,14	0,62
Variabilité totale	24,26	0,11	0,43

11.4 Diagnostic Evaluation

Le kit RealStar® Malaria PCR Kit 1.0 a été évalué dans une étude prospective versus la microscopie sur “frottis épais”, le gold standard pour le diagnostics de la Malaria. 118 échantillons, envoyés pour la routine du diagnostics de la malaria, ont été analysés en utilisant la microscopie sur “frottis épais” et en plus, après l’extraction des acides nucléiques (QIAamp® DNA Blood Mini Kit, Qiagen), utilisant le kitRealStar® Malaria PCR Kit 1.0.

Tableau 4: Résultats de l’évaluation de la sensibilité et de la spécificité en du kit RealStar® Malaria PCR Kit 1.0

		RealStar® Malaria PCR Kit 1.0	
		+	-
Reference method	+	17	0
	-	3*	98

* L'ensemble des échantillons discordants ont été identifiés comme Plasmodium spp. pathogène humain positifs par l'analyse de séquence.

12. Limites

- Une stricte conformité aux instructions d'utilisation est nécessaire afin d'obtenir les meilleurs résultats.
- L'utilisation de ce produit est limitée au personnel qualifié et formé aux techniques de PCR en temps réel et aux procédures de diagnostic *in vitro*.
- Le respect des bonnes pratiques de laboratoire est essentiel pour garantir le bon fonctionnement de ce test. Une attention particulière doit être apportée à la préparation des échantillons afin de préserver la pureté des composants du kit. Tous les réactifs doivent faire l'objet d'une surveillance étroite afin d'éviter des impuretés et des contaminations. Tout réactif suspect doit être éliminé.
- Il est nécessaire de respecter les procédures de prélèvement, de transport, de conservation et de traitement des échantillons afin d'assurer les performances optimales du test.
- Ce test n'est pas destiné à être utilisé directement sur l'échantillon. Des méthodes appropriées d'extraction des acides nucléiques doivent être employées avant son utilisation.
- La présence d'inhibiteurs de PCR (p.ex. héparine) peuvent induire une des résultats faussement positifs ou invalides.
- De potentielles mutations dans les zones cibles du génome du *Plasmodium* spp. couvertes par les amorces et/ou sondes utilisées dans ce kit peuvent induire une détection erronée de la présence du pathogène.
- Le RealStar® Malaria PCR Kit 1.0 est un test de diagnostic. En conséquence, ses résultats doivent être interprétés en prenant en considération l'ensemble des symptômes cliniques et des résultats obtenus en laboratoire.

13. Contrôle qualité

Conformément au système de management de la qualité d'Altona Diagnostics GmbH, certifié ISO EN 13485, chaque lot du RealStar® Malaria PCR Kit 1.0 est testé selon des spécifications prédéfinies afin de garantir une qualité constante des produits.

14. Assistance technique

Pour obtenir une assistance sur nos produits, merci de contacter notre support technique:

e-mail: **support@altona-diagnostics.com**

téléphone: **+49-(0)40-5480676-0**

15. Bibliographie

Versalovic, James, Carroll, Karen C., Funke, Guido, Jorgensen, James H., Landry, Marie Louise and David W. Warnock (ed). Manual of Clinical Microbiology. 10th Edition. ASM Press, 2011.

Cohen, Jonathan, Powderly, William G, and Steven M Opal. Infectious Diseases, Third Edition. Mosby, 2010.

16. Marques déposées et responsabilité

RealStar® (altona Diagnostics); ABI Prism® (Applied Biosystems); ATCC® (American Type Culture Collection); CFX96™ (Bio-Rad); Cy® (GE Healthcare); FAM™, JOE™, ROX™ (Life Technologies); LightCycler® (Roche); SmartCycler® (Cepheid); Maxwell® (Promega); Mx 3005P™ (Stratagene); NucliSENS®, easyMag® (bioMérieux); Rotor-Gene®, QIAamp®, MinElute®, QIASymphony® (QIAGEN); VERSANT® (Siemens Healthcare).

Les noms et marques déposés cités dans ce document, même si non mentionnés comme tels, ne doivent pas être considérés comme non protégés par la loi.

Le kit RealStar® Malaria PCR Kit 1.0 est un kit de diagnostic *in vitro* marqué CE conformément à la Directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs de diagnostic *in vitro*.

Produit non homologué pour la vente par Santé Canada et n'ayant pas fait l'objet d'une notification (510(k)) ou d'une approbation (PMA) de pré-commercialisation par la FDA.

Produit distribué dans certains pays uniquement.

© 2018 altona Diagnostics GmbH; tous droits réservés.

17. Explications des symboles

Symbole	Explication
	Dispositif médical de diagnostic <i>In vitro</i>
	Numéro de lot
	Couleur du bouchon
	Référence produit
	Contenu
	Nombre
	Composant
	Code article international
	Lire les instructions d'utilisation
	Contient la quantité suffisante pour réaliser "n" tests (rxns)
	Limites de température
	À utiliser avant
	Fabricant
	Attention
	Note
	Version

Notes:

always a drop ahead.

altona Diagnostics GmbH
Mörkenstr. 12
22767 Hamburg, Germany

phone +49 40 548 0676 0
fax +49 40 548 0676 10
e-mail info@altona-diagnostics.com

www.altona-diagnostics.com

