

Mode d'emploi

RealStar[®]

Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0

11/2021 FR

RealStar[®]

Malaria Screen & Type 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)

CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

LightCycler® 480 Instrument II (Roche)



351013



2 x 48



11 2021



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

Sommaire

1.	Usage prévu.....	6
2.	Composants du kit.....	6
3.	Stockage	7
4.	Matériel requis non fourni	8
5.	Informations générales.....	9
6.	Description du produit.....	11
6.1	Instruments de PCR en temps réel	14
7.	Mises en garde et précautions.....	15
8.	Procédure	16
8.1	Préparation du prélèvement.....	16
8.2	Préparation du Master Mix.....	18
8.3	Préparation de la réaction.....	19
9.	Programmation des instruments de PCR en temps réel.....	20
9.1	Paramètres.....	20
9.2	Marqueurs de fluorescence (fluorophores)	21
9.3	Profil de température et acquisition du fluorophore	21
10.	Analyse des données	21
10.1	Validation des tests de diagnostic.....	22
10.1.1	Validité des tests de diagnostic (qualitatif)	22
10.1.2	Invalidité des tests de diagnostic (qualitatif).....	22
10.2	Interprétation des résultats.....	23
10.2.1	Analyse qualitative	23
11.	Evaluation des performances	24

11.1	Sensibilité analytique	24
11.2	Spécificité analytique	28
11.3	Précision	29
11.4	Évaluation du diagnostic	31
12.	Restrictions	34
13.	Contrôle qualité	35
14.	Assistance technique	35
15.	Bibliographie	35
16.	Marques de commerce et clauses de non-responsabilité	36
17.	Explications des symboles	37

1. Usage prévu

Le kit RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 est un test de diagnostic *in vitro*, basé sur la technologie de PCR en temps réel, pour la détection qualitative et la différenciation de ADN des espèces pathogènes pour l'homme de *Plasmodium Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium vivax* et *Plasmodium falciparum*.

2. Composants du kit

Le kit contient deux essais PCR différents avec 48 réactions chacun. Il comprend deux Positive Controls (contrôles positifs) différents : un pour le système d'amplification et de détection spécifique au *Plasmodium (P.) knowlesi*, au *P. malariae* et au *P. ovale* et un autre pour le système d'amplification et de détection spécifique au *P. falciparum* et au *P. vivax*.

Tableau 1: Composants du kit

Couleur du capuchon	Composant	Nombre de fioles	Volume [µL/fiole]
Bleu	Master A Pk/Pm/Po ¹⁾	4	60
Bleu clair	Master A Pf/Pv ²⁾	4	60
Violet	Master B Pk/Pm/Po ¹⁾	4	180
Violet clair	Master B Pf/Pv ²⁾	4	180
Vert	Internal Control	1	1 000
Rouge	Positive Control Pk/Pm/Po ¹⁾	1	250
Orange	Positive Control Pf/Pv ²⁾	1	250
Blanc	Water (PCR grade)	1	500

¹⁾ Pk - *Plasmodium knowlesi*, Pm - *Plasmodium malariae*, Po - *Plasmodium ovale*

²⁾ Pf - *Plasmodium falciparum*, Pv - *Plasmodium vivax*

3. Stockage

- Le kit RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 est livré sur de la neige 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 2 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 (voir 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 poudrés (jetables)

REMARQUE



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

Le paludisme est une maladie à transmission vectorielle causée par une infection protozoaire. Les parasites du gène *Plasmodium* sont transmis à leurs hôtes vertébrés pendant l'ingestion de sang par une femelle moustique infectée par le gène *Anopheles*. Le cycle de vie des parasites comprend un changement d'hôte de l'arthropode vers l'hôte vertébré et est plutôt complexe, mais peut être divisé en 3 phases majeures. Ces phases sont fondées sur le stade du moustique parasitaire, le stade du foie humain et le stade du sang humain. Il existe 5 espèces connues de pathogène humain *Plasmodium*, à savoir *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium vivax* et *Plasmodium malariae* [1].

La maladie du paludisme se présente elle-même dans différentes manifestations, en fonction des espèces *Plasmodium* infectantes. En général, les tout premiers symptômes du paludisme ne sont pas du tout spécifiques : fièvre, maux de tête, faiblesse générale de l'organisme, myalgie, frissons, étourdissements, douleur abdominale, diarrhée, nausée et vomissements. *P. falciparum* et *P. knowlesi* peuvent causer un paludisme grave chez les humains [2,3]. *P. falciparum* est responsable d'un taux de létalité > 90 % chaque année, principalement chez les enfants [2].

P. knowlesi subit un court stade érythrocytaire (24 heures) durant lequel il se reproduit rapidement [4]. L'hyperparasitémie en résultant peut entraîner des complications mortelles comme une défaillance de plusieurs organes ou la mort du patient. *P. knowlesi* a souvent été diagnostiqué à tort comme étant le *P. malariae* en raison des similitudes phénotypiques ou comme étant le *P. vivax* sur la base des similitudes génétiques avant le développement d'une spécification de test sur base PCR pour le *P. knowlesi* [5].

Bien que le *P. vivax* soit considéré comme un parasite bénin, il suscite des manifestations cliniques incapacitantes et des complications mortelles comme une grave anémie, une grave thrombocytopénie et des paroxysmes dangereux [6].

Une infection par *P. ovale* est souvent prise à tort pour une infection par *P. vivax* en raison de sa fièvre tierce. Les infections par l'une ou l'autre des espèces de parasites présentent des symptômes similaires et sont traitées de manière similaire, la seule différence résidant dans la gravité potentielle d'une infection par *P. vivax*. Par ailleurs, les infections par *P. ovale* et *P. vivax* sont caractérisées par des rechutes incapacitantes répétées provenant des hypnozoïtes dormants qui persistent dans les hépatocytes même après l'élimination des parasites [1].

Les infections par *P. malariae* sont caractérisées par une faible parasitémie et une évolution légère de la maladie.

Le diagnostic du paludisme par microscopie de frottis sanguins fins ou épais colorés au Giemsa est la méthode de référence absolue [7]. En outre, des tests de diagnostic rapide sont généralement effectués et recommandés par l'Organisation mondiale de la santé (OMS). Cependant, la sensibilité et la spécificité de ces méthodes sont largement limitées et la différenciation des espèces de *Plasmodium* est quasiment impossible avec l'une ou l'autre de ces techniques [8]. Il existe un besoin évident en outils de diagnostic plus sensibles qui seraient rapides, précis et permettraient un typage précis des espèces de *Plasmodium*, pour une gestion et un contrôle efficaces de la maladie. Les techniques moléculaires telles que le PCR en temps réel deviennent de plus en plus populaires, car elles constituent des alternatives plus sensibles, fiables [9,10] et faciles à utiliser à la référence absolue. L'utilisation appropriée de tests de diagnostic sensibles et spécifiques permet d'éviter de recourir inutilement aux médicaments antipaludiques et de contribuer à une gestion adéquate et économique de la maladie.

- [1] Cowman AF, Healer J, Marapana D, Marsh K (2016), Malaria: Biology and Disease. Cell. 167(3):610-624.
- [2] World Health Organization (2015), WHO world malaria report 2015. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- [3] Cox-Singh J, Davis TM, Lee KS, Shamsul SS, Matusop A, Ratnam S, Rahman HA, Conway DJ, Singh B (2008), Plasmodium knowlsei malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. Clin Infect Dis., 46(2):165–71.

- [4] White NJ (2008), Plasmodium knowlesi: the fifth human malaria parasite. Clin Infect Dis., 15;46(2):172-3.
- [5] Divis PC, Shokoples SE, Singh B, and Yanow Stephanie K (2010), A TaqMan real-time PCR assay for the detection and quantitation of Plasmodium knowlesi. Malar J, 9:344.
- [6] Dhanpat K. Kochar, Vishal Saxena, Narvachan Singh, Sanjay K. Kochar, S. Vijay Kumar, and Ashis Das (2005), Plasmodium vivax Malaria. Emerg Infect Dis. 11(1):132-134.
- [7] Warhurst, D. C., and J. E. Williams (1996), Laboratory diagnosis of malaria. J. Clin. Pathol. 49:533-538.
- [8] World Health Organization (2000), WHO/MAL/2000.1091. New perspectives in malaria diagnosis. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- [9] Snounou, G., S. Viriyakosol, W. Jarra, S. Thaithong, and K. N. Brown (1993), Identification of the four human malarial species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. Mol. Biochem. Parasitol. 58:283-292.
- [10] Sethabutr, O., A. E. Brown, S. Panyim, K. C. Kain, K. Webster, and P. Echeverria (1992), Detection of Plasmodium falciparum by polymerase chain reaction in a field study. J. Infect. Dis. 166:145-148.

6. Description du produit

Le kit RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 est un test de diagnostic *in vitro*, basé sur la technologie de PCR en temps réel, pour la détection qualitative et la différenciation de ADN des espèces pathogènes pour l'homme de *Plasmodium Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium vivax* et *Plasmodium falciparum*.

Le kit RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 est constitué de deux tests indépendants, l'un ciblant spécifiquement l'ADN spécifique au *P. ovale*, au *P. malariae* et au *P. knowlesi* et l'autre ciblant l'ADN spécifique au *P. vivax* et au *P. falciparum*.

Les deux tests comprennent un système d'amplification hétérologue [Internal Control (contrôle interne)] pour identifier une éventuelle inhibition de la PCR et confirmer l'intégrité des réactifs.

La technologie PCR en temps réel utilise la réaction en chaîne par polymérase (PCR) pour l'amplification de séquences cibles spécifiques et de sondes spécifiques aux cibles pour la détection de l'ADN amplifié. Les sondes sont marquées avec un marqueur fluorescent (reporter) et un désactivateur (quencher).

Master mix Pk/Pm/Po : La sonde spécifique à l'ADN du *P. knowlesi* est marquée avec le fluorophore ROX™, la sonde spécifique à l'ADN du *P. malariae* est marquée avec le fluorophore FAM™, et la sonde spécifique à l'ADN du *P. ovale* est marquée avec le fluorophore Cy5.

Master mix Pf/Pv : La sonde spécifique à l'ADN du *P. falciparum* est marquée avec le fluorophore FAM™ et la sonde spécifique à l'ADN du *P. vivax* est marquée avec le fluorophore Cy5.

La sonde spécifique à l'Internal Control (contrôle interne, IC) est marquée avec le fluorophore JOE™.

L'utilisation de sondes associées à des colorations identifiables permet une détection parallèle de l'ADN spécifique au *P. knowlesi*, au *P. malariae*, au *P. ovale*, au *P. falciparum* et au *P. vivax*, ainsi que la détection de l'Internal Control (contrôle interne) des canaux de détecteur correspondants dans l'instrument PCR en temps réel.

Le test est constitué de deux processus dans un seul tube :

- Amplification par PCR de l'ADN et de l'Internal Control (contrôle interne) cibles
- Détection simultanée d'amplicons PCR par des sondes marquées par fluorescence

Le kit RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 est constitué de :

- Master A Pk/Pm/Po¹⁾
- Master A Pf/Pv²⁾
- Master B Pk/Pm/Po¹⁾
- Master B Pf/Pv²⁾
- Internal Control
- Positive Control Pk/Pm/Po¹⁾
- Positive Control Pf/Pv²⁾
- Water (PCR grade)

Internal Control (IC) = Contrôle interne

Positive Control = Contrôle positif

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

¹⁾ Pk - *Plasmodium knowlesi*, Pm - *Plasmodium malariae*, Po - *Plasmodium ovale*

²⁾ Pf - *Plasmodium falciparum*, Pv - *Plasmodium vivax*

Le Master A et le Master B Pk/Pm/Po contiennent tous les composants (tampon PCR, ADN-polymérase, sel de magnésium, amorces et sondes) nécessaires à l'amplification par PCR et à la détection de l'ADN spécifique au *P. knowlesi*, au *P. malariae* et au *P. ovale* et de l'Internal Control (contrôle interne) en une seule réaction.

Le Master A et le Master B Pk/Pm/Po contiennent tous les composants (tampon PCR, ADN-polymérase, sel de magnésium, amorces et sondes) nécessaires à l'amplification par PCR et à la détection de l'ADN spécifique au *P. falciparum* et *P. vivax* et de l'Internal Control (contrôle interne) en une seule réaction.

6.1 Instruments de PCR en temps réel

Le kit RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 a été développé et validé afin d'être utilisé avec les instruments 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)
- CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

7. Mises en garde et précautions

Lire attentivement le mode d'emploi avant d'utiliser le produit.

- Avant la première 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*.
- Les échantillons doivent toujours être traités comme étant infectieux et / ou présentant un danger biologique conformément aux procédures de sécurité de votre 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. Portez toujours des gants jetables dans chacune des zones de travail et changez-en avant de pénétrer 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.
- Eliminer les échantillons et les déchets de l'essai conformément aux règles de sécurité locales.

8. Procédure

8.1 Préparation du prélèvement

L'ADN extrait est le matériau de départ pour le kit RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0.

La qualité de l'ADN extrait a un impact considérable sur les performances du système de test tout entier. Il est recommandé de vérifier que le système utilisé pour l'extraction des acides nucléiques est compatible avec la technologie de PCR en temps réel. Les kits et systèmes suivants sont adaptés à 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 Screen & Type PCR Kit 1.0 doit être validée par l'utilisateur.

En cas d'utilisation d'une procédure de préparation de l'échantillon dans une colonne d'élution comprenant des tampons de lavage contenant de l'éthanol, il est fortement recommandé d'effectuer une étape de centrifugation supplémentaire pendant 1 minute à environ 17 000 x g (~ 13 000 tr/min) à l'aide d'un nouveau tube de collecte avant l'élution des acides nucléiques,

ATTENTION



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. L'éthanol est un fort inhibiteur de la PCR en temps réel.

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 Master Mix

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

Le kit RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 contient un Internal Control (contrôle interne, IC) 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 l'IC est utilisé pour contrôler l'inhibition de la PCR, mais pas pour contrôler la procédure de préparation des échantillons, préparez chaque master mix (master mix Pk/Pm/Po et master mix Pf/PV) selon le schéma de pipetage suivant :

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 master mix	21 µl	252 µl

- ▶ Si l'IC est utilisé comme contrôle de préparation de l'échantillon, et d'inhibition de la PCR, l'IC 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, l'IC ne doit **jamais** être ajouté directement à l'échantillon de prélèvement. L'IC doit toujours être ajouté au mélange échantillon/Lysis Buffer (tampon de lyse). Le volume de l'IC 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 l'IC par échantillon doivent être ajoutés au mélange échantillon/Lysis Buffer (tampon de lyse).

- ▶ Si l'IC est ajouté durant la procédure de préparation des échantillons, préparez chaque master mix (master mix Pk/Pm/Po et master mix Pf/PV) 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 master mix	20 µl	240 µl

ATTENTION



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

ATTENTION



Quelle que soit la méthode ou le système utilisé pour l'extraction des acides nucléiques, ne jamais ajouter l'Internal Control (contrôle interne) directement à l'échantillon.

8.3 Préparation de la réaction

- ▶ Pipetez 20 µl du master mix Pk/Pm/Po ou du master mix Pf/Pv dans chaque puits d'un plateau de réaction optique à 96 puits approprié ou d'un tube de réaction optique approprié.
- ▶ Ajouter 10 µL d'échantillon (éluat issu de l'extraction des acides nucléiques) ou 10 µL des contrôles (contrôles positifs ou négatifs).

Configuration des réactions	
Master Mix	20 µl
Échantillon ou contrôle	10 µl
Volume total	30 µl

- ▶ Assurez-vous qu'au moins un Positive Control (contrôle positif) [Positive Control (contrôle positif) Pk/Pm/Po pour le master mix Pk/Pm/Po et Positive Control (contrôle positif) Pf/Pv pour le master mix Pf/Pv] et au moins un Negative Control (contrôle négatif) sont utilisés par master mix et par run.
- ▶ Homogénéiser avec soin les échantillons et les contrôles avec le Master Mix par pipetage.
- ▶ Couvrir la plaque 96 puits avec un film adhésif transparent approprié et les tubes réactionnels à l'aide de bouchons appropriés.
- ▶ Centrifugez le plateau de réaction à 96 puits dans une centrifugeuse équipée d'un rotor pour microplaques pendant 30 secondes à environ 1 000 x g (~ 3 000 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 Screen & Type 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

- ▶ Définissez les paramètres suivants :

Paramètres	
Volume de réaction	30 µl
Taux de rampe	Par défaut
Référence passive	Aucun

9.2 Marqueurs de fluorescence (fluorophores)

- Définir les marqueurs de fluorescence (fluorophores) :

Cible	master mix	Nom du détecteur	Rapporteur	Extincteur
ADN spécifique au <i>P. knowlesi</i>	Pk/Pm/Po	<i>P. knowlesi</i>	ROX™	(Aucun)
ADN spécifique au <i>P. malariae</i>		<i>P. malariae</i>	FAM™	(Aucun)
ADN spécifique au <i>P. ovale</i>		<i>P. ovale</i>	Cy5	(Aucun)
ADN spécifique au <i>P. falciparum</i>	Pf/Pv	<i>P. falciparum</i>	FAM™	(Aucun)
ADN spécifique au <i>P. vivax</i>		<i>P. vivax</i>	Cy5	(Aucun)
Internal Control (contrôle interne)	Pk/Pm/Po et Pf/Pv	IC	JOE™	(Aucun)

9.3 Profil de température et acquisition du fluorophore

- Définissez le profil de température et l'acquisition de la coloration :

	Étape	Répétitions de cycles	Acquisition	Température [°C]	Durée [min:s]
Dénaturation	Attente	1	-	95	02:00
Amplification	Cyclage	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 Screen & Type 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 :

ID du contrôle	Canal de détection			
	ROX™	FAM™	Cy5	JOE™
Positive Control (contrôle positif) <i>P. knowlesi</i> , <i>P. malariae</i> , <i>P. ovale</i>	+	+	+	+/- *
Positive Control (contrôle positif) <i>P. falciparum</i> , <i>P. vivax</i>	-	+	+	+/- *
Negative Control (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 diagnostic **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

Tableau 2: Analyse qualitative à l'aide du master mix Pk/Pm/Po

Canal de détection				Master Mix	Interprétation des résultats
ROX™	FAM™	Cy5	JOE™		
+	+	+	+*	Pk/Pm/ Po	ADN spécifique au <i>P. knowlesi</i> , au <i>P. malariae</i> et au <i>P. ovale</i> détecté.
+	-	-	+*		ADN spécifique au <i>P. knowlesi</i> détecté.
-	+	-	+*		ADN spécifique au <i>P. malariae</i> détecté.
-	-	+	+*		ADN spécifique au <i>P. ovale</i> détecté.
+	+	-	+*		ADN spécifique au <i>P. knowlesi</i> au <i>P. malariae</i> détecté.
+	-	+	+*		ADN spécifique au <i>P. knowlesi</i> , au <i>P. ovale</i> détecté.
-	+	+	+*		ADN spécifique au <i>P. malariae</i> et au <i>P. ovale</i> détecté.
-	-	-	+		Aucun ADN spécifique au <i>P. knowlesi</i> , au <i>P. malariae</i> ou au <i>P. ovale</i> détecté.
-	-	-	-		Inhibition de la PCR ou défaillance des réactifs. Répétez les tests à partir de l'échantillon de départ ou prélevez et testez un nouvel échantillon.

Tableau 3: Analyse qualitative à l'aide du master mix Pf/Pv

Canal de détection				Master Mix	Interprétation des résultats
ROX™	FAM™	Cy5	JOE™		
S.O.	+	+	+	Pf/Pv	ADN spécifique au <i>P. falciparum</i> et au <i>P. vivax</i> détecté.
	+	-	+		ADN spécifique au <i>P. falciparum</i> détecté.
	-	+	+		ADN spécifique au <i>P. vivax</i> détecté.
	-	-	+		Aucun ADN spécifique au <i>P. falciparum</i> ou au <i>P. vivax</i> détecté.
	-	-	-		Inhibition de la PCR ou défaillance des réactifs. Répétez les tests à partir de l'échantillon de départ ou prélevez et testez un nouvel échantillon.

* La détection de l'Internal Control (contrôle interne) dans le canal de détection JOE™ n'est pas obligatoire pour les résultats positifs dans le canal de détection Cy5, FAM™ ou le canal de détection ROX™. Une charge élevée d'ADN spécifique au *Plasmodium* spp. dans l'échantillon peut entraîner une réduction ou une absence du signal de l'Internal Control (contrôle interne).

11. Evaluation des performances

L'évaluation de la performance du kit RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 a été réalisée à l'aide de produits PCR quantifiés et d'ADN génomique d'*Plasmodium* species.

11.1 Sensibilité analytique

La sensibilité analytique du kit RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 est définie comme la concentration (copies/μl d'éluat) des molécules d'ADN spécifiques au *Plasmodium* pouvant être détectée avec un taux de positivité de 95 %. La sensibilité analytique a été déterminée par l'analyse d'une série de dilutions de produits PCR spécifiques au *Plasmodium* (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* et *P. knowlesi*).

Tableau 4: Résultats de PCR utilisés pour calculer la sensibilité analytique concernant la détection de l'ADN spécifique au *P. falciparum*

Conc. d'entrée [copies/μl]	Nombre de répliques	Nombre de positifs	Taux de réussite [%]
316,228	24	24	100
100,000	24	24	100
31,622	24	24	100
10,000	24	24	100
3,161	24	24	100
1,000	24	24	100
0,316	24	18	75
0,100	24	14	58
0,032	23	7	30
0,000	23	0	0

Tableau 5: Résultats de PCR utilisés pour calculer la sensibilité analytique concernant la détection de l'ADN spécifique au *P. vivax*

Conc. d'entrée [copies/μl]	Nombre de répliques	Nombre de positifs	Taux de réussite [%]
316,228	24	24	100
100,000	24	24	100
31,622	24	24	100
10,000	24	24	100
3,161	24	24	100
1,000	24	24	100
0,316	24	19	79
0,100	24	5	21
0,032	24	3	13
0,000	24	0	0

Tableau 6: Résultats de PCR utilisés pour calculer la sensibilité analytique concernant la détection de l'ADN spécifique au *P. ovale*

Conc. d'entrée [copies/μl]	Nombre de répliques	Nombre de positifs	Taux de réussite [%]
316,228	24	24	100
100,000	24	24	100
31,622	24	24	100
10,000	24	24	100
3,161	24	24	100
1,000	24	21	88
0,316	24	15	63
0,100	24	4	17
0,032	24	1	4
0,000	24	0	0

Tableau 7: Résultats de PCR utilisés pour calculer la sensibilité analytique concernant la détection de l'ADN spécifique au *P. malariae*

Conc. d'entrée [copies/μl]	Nombre de répliques	Nombre de positifs	Taux de réussite [%]
316,228	24	24	100
100,000	24	24	100
31,622	24	24	100
10,000	24	24	100
3,161	24	24	100
1,000	24	24	100
0,316	24	23	96
0,100	24	9	38
0,032	24	2	8
0,000	24	0	0

Tableau 8: Résultats de PCR utilisés pour calculer la sensibilité analytique concernant la détection de l'ADN spécifique au *P. knowlesi*

Conc. d'entrée [copies/μl]	Nombre de répliques	Nombre de positifs	Taux de réussite [%]
316,228	24	24	100
100,000	24	24	100
31,622	24	24	100
10,000	24	24	100
3,161	24	24	100
1,000	24	21	88
0,316	24	8	33
0,100	24	5	21
0,032	24	2	8
0,000	24	0	0

La sensibilité analytique du kit RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 a été déterminée à l'aide d'une analyse probit :

- Pour la détection de l'ADN spécifique au *P. falciparum*, la sensibilité analytique est de 0,80 copies/μl d'éluat [intervalle de confiance (CI) à 95 % : 0,44 à 2,45 copies/μl]
- Pour la détection de l'ADN spécifique au *P. vivax*, la sensibilité analytique est de 0,73 copies/μl d'éluat [intervalle de confiance (CI) à 95 % : 0,46 à 1,62 copies/μl]
- Pour la détection de l'ADN spécifique au *P. ovale*, la sensibilité analytique est de 1,46 copies/μl d'éluat [intervalle de confiance (CI) à 95 % : 0,89 à 3,28 copies/μl]
- Pour la détection de l'ADN spécifique au *P. malariae*, la sensibilité analytique est de 0,36 copies/μl d'éluat [intervalle de confiance (CI) à 95 % : 0,24 à 0,74 copies/μl]

- Pour la détection de l'ADN spécifique au *P. knowlesi*, la sensibilité analytique est de 2,35 copies/µl d'éluat [intervalle de confiance (CI) à 95 % : 1,37 à 5,55 copies/µl]

11.2 Spécificité analytique

La spécificité analytique du kit RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 a été évaluée en testant un panel d'ARN/ADN génomiques extraits de pathogènes liés au *Plasmodium* et d'autres pathogènes provoquant des symptômes similaires au *Plasmodium*.

Le kit RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 ne présente pas de réactivité croisée avec les pathogènes suivants :

- Virus du Chikungunya
- Virus de la dengue
- Virus de la grippe A
- Virus de la grippe B
- Virus du Nil occidental
- *Babesia microti*
- *Leishmania donovani*
- *Leishmania infantum*
- *Leishmania major*
- *Toxoplasma gondii*
- *Trypanosoma brucei*
- *Trypanosoma cruzi*

Afin de démontrer que le kit RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 est capable de détecter et de différencier correctement l'ADN du *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. knowlesi*, *P. malariae* et *P. ovale*, l'ADN génomique des cinq espèces de *Plasmodium* a été testé à l'aide d'un CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (système de détection) (Bio-Rad) pour l'analyse PCR en temps réel. Chaque échantillon a été testé positif pour l'ADN spécifique à son espèce de *Plasmodium* respective, mais négatif pour les quatre autres espèces de *Plasmodium*.

11.3 Précision

La précision du kit RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 a été déterminée selon sa variabilité intra-essai (variabilité au sein d'une même expérience), sa variabilité inter-essai (variabilité entre différentes expériences) et sa variabilité inter-lot (variabilité entre différents lots de production). La variabilité totale a été déterminée en combinant ces 3 analyses.

Les données de variabilité sont exprimées par l'écart-type et le coefficient de variation. Les données reposent sur les valeurs du cycle seuil (C_t). Au moins 6 répliques par échantillon ont été analysés pour la variabilité intra-essai, l'inter-essai et la variabilité inter-lot.

Tableau 9: Données de précision pour la détection d'ADN spécifique au *P. ovale*, *P. malariae* et *P. knowlesi*

<i>P. ovale</i> , <i>P. malariae</i> et <i>P. knowlesi</i>		Cycle seuil moyen (C_t)	Écart-type	Coefficient de variation [%]
Variabilité intra-essai	<i>P. malariae</i>	31,88	0,24	0,76
	<i>P. ovale</i>	30,29	0,12	0,40
	<i>P. knowlesi</i>	30,39	0,14	0,46
Variabilité inter-essai	<i>P. malariae</i>	31,89	0,18	0,58
	<i>P. ovale</i>	30,30	0,10	0,32
	<i>P. knowlesi</i>	30,53	0,14	0,45
Variabilité inter-lot	<i>P. malariae</i>	31,95	0,11	0,35
	<i>P. ovale</i>	30,26	0,11	0,35
	<i>P. knowlesi</i>	30,40	0,11	0,35
Variabilité totale	<i>P. malariae</i>	31,92	0,16	0,51
	<i>P. ovale</i>	30,27	0,10	0,32
	<i>P. knowlesi</i>	30,48	0,15	0,49

Tableau 10: Données de précision pour la détection d'ADN spécifique au *P. falciparum* et *P. vivax*

<i>P. falciparum</i> et <i>P. vivax</i>		Cycle seuil moyen (C _t)	Écart-type	Coefficient de variation [%]
Variabilité intra-essai	<i>P. falciparum</i>	31,72	0,11	0,35
	<i>P. vivax</i>	31,71	0,26	0,82
Variabilité inter-essai	<i>P. falciparum</i>	31,38	0,37	0,14
	<i>P. vivax</i>	31,57	0,24	0,77
Variabilité inter-lot	<i>P. falciparum</i>	31,42	0,33	1,04
	<i>P. vivax</i>	31,09	0,40	1,27
Variabilité totale	<i>P. falciparum</i>	31,29	0,33	1,04
	<i>P. vivax</i>	31,30	0,46	1,46

Tableau 11: Données de précision pour la détection de l'Internal Control (contrôle interne) à l'aide du master mix Pk/Pm/Po

Internal Control (contrôle interne)	Cycle seuil (C _t)	Écart-type	Coefficient de variation (%)
Variabilité intra-essai	25,88	0,07	0,29
Variabilité inter-essai	25,64	0,27	1,05
Variabilité inter-lot	25,89	0,06	0,23
Variation totale	25,72	0,25	0,97

Tableau 12: Données de précision pour la détection de l'Internal Control (contrôle interne) à l'aide du master mix Pf/Pv

Internal Control (contrôle interne)	Cycle seuil (C _t)	Écart-type	Coefficient de variation (%)
Variabilité intra-essai	26,73	0,13	0,47
Variabilité inter-essai	26,90	0,21	0,76
Variabilité inter-lot	26,96	0,13	0,49
Variation totale	26,89	0,17	0,63

11.4 Évaluation du diagnostic

Le kit RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 a été évalué dans le cadre d'une étude comparative avec l'essai PCR conventionnel interne [sur la base de Rubio *et al.* (2002) et Ta *et al.* (2014)]. Rétrospectivement, 105 échantillons de sang total ont été testés :

- 75 échantillons de sang total provenant de patients précédemment testés positifs pour le pathogène humain *Plasmodium* spp.
- 15 échantillons de sang total provenant de patients précédemment testés négatifs pour le pathogène humain *Plasmodium* spp.
- 15 échantillons de sang total provenant de patients précédemment testés positifs pour d'autres parasites que le pathogène humain *Plasmodium* spp. causant des maladies avec des symptômes similaires au paludisme

Le kit RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 et l'essai PCR conventionnel interne [sur la base de Rubio *et al.* (2002) et Ta *et al.* (2014)] ont été utilisés conjointement au kit QIAamp® DNA Blood Mini QIAcube® Kit (QIAGEN) et au QIAcube® (QIAGEN).

Pour l'analyse qualitative, tous les échantillons dont le résultat était non valide pour un test ou les deux ont été exclus.

Les résultats des 105 échantillons restants figurent dans le Tableau 13.

Tableau 13: Résultats de l'évaluation de la sensibilité et la spécificité du diagnostic pour le *Plasmodium* spp. dans des échantillons de sang total

		Essai PCR conventionnel interne [sur la base de Rubio <i>et al.</i> (2002) et Ta <i>et al.</i> (2014)]	
		POSITIF	NÉGATIF
RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0	POSITIF	74	0
	NÉGATIF	1	30

La sensibilité et la spécificité du diagnostic obtenues à l'aide du kit RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 par rapport à l'essai PCR conventionnel interne [sur la base de Rubio *et al.* (2002) et Ta *et al.* (2014)] étaient de 98,67 % (intervalle de confiance : 92,79 % à 99,97 %) et 100 % (intervalle de confiance : 88,43 % à 100 %), respectivement.

Les résultats de l'évaluation du typage pour *Plasmodium* spp. dans les échantillons de sang total figurent dans le tableau 14.

Tableau 14: Résultats de l'évaluation du typage pour *Plasmodium* spp. dans les échantillons de sang total

		Test PCR conventionnel interne [sur la base de Rubio <i>et al.</i> (2002) et Ta <i>et al.</i> (2014)]						
		<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. ovale</i>	<i>P. knowlesi</i>	Négatif	TOTAL
RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0	<i>P. falciparum</i>	15	0	0	0	0	0	15
	<i>P. vivax</i>	0	14	0	0	0	0	14
	<i>P. malariae</i>	0	0	15	0	0	0	15
	<i>P. ovale</i>	0	0	0	15	0	0	15
	<i>P. knowlesi</i>	0	0	0	0	15	0	15
	Négatif	0	1	0	0	0	30	31
	TOTAL	15	15	15	15	15	30	105

Les résultats présentés dans le tableau 14 montrent qu'à l'exception d'un échantillon, les résultats du kit RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 et l'essai de référence étaient à 100 % identiques concernant l'identification du type de *Plasmodium* spp..

12. Restrictions

- Un respect strict du mode d'emploi est nécessaire pour obtenir des résultats optimaux.
- L'utilisation de ce produit est réservée au personnel ayant reçu des instructions et une formation spécifiques en techniques de PCR en temps réel et en procédures de diagnostic *in vitro*.
- Le respect des bonnes pratiques de laboratoire est essentiel au bon fonctionnement de cet essai. Il convient de faire preuve de la plus grande vigilance pour préserver la pureté des composants du kit et des configurations de réaction. Tous les réactifs doivent faire l'objet d'une surveillance étroite pour détecter la présence d'impuretés et toute contamination éventuelle. Tout réactif suspect doit être jeté.
- Les procédures de prélèvement des échantillons, de transport, de stockage et de traitement appropriées doivent être respectées pour un fonctionnement optimal de ce test.
- Cet essai ne doit pas être utilisé directement sur l'échantillon. Des méthodes appropriées d'extraction des acides nucléiques doivent être appliquées avant d'utiliser cet essai.
- La présence d'inhibiteurs de la PCR (p. ex. l'héparine) peut donner une des résultats faussement négatifs ou non valides.
- Les mutations potentielles dans les régions cibles du génome du *Plasmodium* spp. couvertes par les amorces et/ou les sondes utilisées dans le kit peuvent empêcher de détecter la présence des pathogènes.
- Comme pour tout test de diagnostic, les résultats obtenus avec le kit RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 doivent être interprétés en tenant compte des autres constatations cliniques et résultats de laboratoire.

13. Contrôle qualité

Conformément au système de gestion de la qualité de Altona Diagnostics GmbH certifié NF EN ISO 13485, chaque lot du kit RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 est testé sur la base de spécifications prédéterminées afin d'assurer une qualité constante du produit.

14. Assistance technique

Pour bénéficier d'un service après-vente, veuillez contacter notre service d'assistance technique aux coordonnées suivantes :

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 de commerce et clauses de non-responsabilité

RealStar® (altona Diagnostics) ; ABI Prism® (Applied Biosystems) ; CFX96™ (Bio-Rad) ; FAM™, JOE™, ROX™ (Thermo Fisher Scientific) ; LightCycler® (Roche) ; Maxwell® (Promega) ; Mx 3005P™ (Stratagene) ; NucliSENS®, easyMAG® (bioMérieux) ; Rotor-Gene®, QIAamp®, QIAcube®, QIASymphony® (QIAGEN) ; VERSANT® (Siemens Healthcare).

Tous les noms, marques commerciales, etc. utilisés dans le présent document ne doivent pas être considérés comme n'étant pas protégés par la loi, même s'ils ne sont pas indiqués spécifiquement en tant que tels.















Le Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 RealStar® est un kit diagnostic doté du marquage CE conforme à la Directive européenne 98/79/CE relative aux diagnostics *in vitro*.



Ce produit n'est pas homologué par Santé Canada et n'a pas été approuvé par la FDA.

Ce produit n'est pas disponible dans tous les pays.

© 2021 altona Diagnostics GmbH ; tous droits réservés.

17. Explications des symboles

Symbole	Explication
	Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>
	Code du lot
	Couleur du capuchon
	Numéro de catalogue
	Contenu
	Numéro
	Composant
	Code article international
	Consultez le mode d'emploi
	Contenu suffisant pour « n » tests/réactions (rxns)
	Limites de température
	Date de péremption
	Fabricant
	Attention : Attire l'attention sur des instructions ou procédures qui, si elles ne sont pas correctement respectées, peuvent entraîner des blessures corporelles ou nuire au bon fonctionnement du produit. Contactez l'assistance technique d'Altona Diagnostics pour obtenir de l'aide.

Symbole	Explication
	Remarque : Les informations fournies à l'utilisateur sont utiles mais non essentielles à la tâche à accomplir.
	Version

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

