

## **Mode d'emploi**

# **RealStar<sup>®</sup> Chagas PCR Kit 1.0**

04/2022 FR



# RealStar<sup>®</sup>

## Chagas 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)

LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

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)



611013



96



04 2022



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

## Sommaire

<b>1.</b>	<b>Usage prévu.....</b>	<b>6</b>
<b>2.</b>	<b>Composants du kit.....</b>	<b>6</b>
<b>3.</b>	<b>Stockage .....</b>	<b>6</b>
<b>4.</b>	<b>Matériel requis non fourni .....</b>	<b>7</b>
<b>5.</b>	<b>Informations générales.....</b>	<b>8</b>
<b>6.</b>	<b>Description du produit.....</b>	<b>10</b>
6.1	Instruments PCR en temps réel .....	11
<b>7.</b>	<b>Mises en garde et précautions.....</b>	<b>12</b>
<b>8.</b>	<b>Procédure .....</b>	<b>13</b>
8.1	Préparation du prélèvement.....	13
8.2	Préparation du master mix.....	14
8.3	Préparation de la réaction.....	16
<b>9.</b>	<b>Programmation des instruments PCR en temps réel .....</b>	<b>17</b>
9.1	Paramètres.....	17
9.2	Marqueurs de fluorescence (fluorophores) .....	17
9.3	Profil de température et acquisition du fluorophore .....	19
<b>10.</b>	<b>Analyse des données .....</b>	<b>19</b>
10.1	Validation des tests de diagnostic.....	21
10.1.1	Validité des tests de diagnostic (qualitatif) .....	21
10.1.2	Invalidité des tests de diagnostic (qualitatif).....	21
10.2	Interprétation des résultats.....	22
10.2.1	Analyse qualitative .....	22
<b>11.</b>	<b>Evaluation des performances .....</b>	<b>22</b>

11.1	Sensibilité analytique .....	23
11.2	Spécificité analytique .....	24
11.3	Précision .....	25
11.4	Évaluation du diagnostic .....	26
<b>12.</b>	<b>Restrictions .....</b>	<b>27</b>
<b>13.</b>	<b>Contrôle qualité .....</b>	<b>28</b>
<b>14.</b>	<b>Assistance technique .....</b>	<b>28</b>
<b>15.</b>	<b>Bibliographie .....</b>	<b>28</b>
<b>16.</b>	<b>Marques de commerce et clauses de non-responsabilité .....</b>	<b>29</b>
<b>17.</b>	<b>Explications des symboles .....</b>	<b>30</b>

## 1. Usage prévu

Le RealStar® Chagas PCR Kit 1.0 est un test de diagnostic *in vitro* basé sur la technologie de PCR en temps réel pour la détection qualitative de l'ADN spécifique au *Trypanosoma cruzi*.

## 2. Composants du kit

**Tableau 1:** Composants du kit

Couleur du capuchon	Composant	Nombre de fioles	Volume [µl/fiole]
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 = contrôle positif

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

## 3. Stockage

- Le RealStar® Chagas 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 PCR en temps réel approprié (voir le chapitre 6.1 Instruments PCR en temps réel)
- Système ou kit d'extraction d'acide nucléique approprié (voir le chapitre 8.1 Préparation de l'échantillon)
- Centrifugeuse de bureau avec un rotor pour les tubes de réaction de 2 ml
- Centrifugeuse à rotor pour plaques microtitre en cas d'utilisation avec des plateaux de réaction à 96 puits
- Agitateur vortex
- Plateaux de réaction à 96 puits ou tubes de réaction appropriés avec matériau de fermeture (optique) correspondant
- Pipettes (réglables)
- Pointes de pipette 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.*

#### REMARQUE



*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 maladie de Chagas est une parasitose à transmission vectorielle provoquée par le *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Ce parasite protozoaire appartient à l'ordre des Trypanosomatida, qui compte des parasites obligatoires unicellulaires et flagellés. Également appelée trypanosomiase américaine, cette maladie est endémique d'Amérique du Sud et d'Amérique Centrale ; elle toucherait entre 6 et 7 millions de personnes dans le monde [1]. Chez l'espèce humaine, le protozoaire se transmet par contact avec les fèces de Triatominae contaminés, ces derniers se nourrissant de leur hôte endormi pendant la nuit. Les infections peuvent survenir par voie orale [2] ou congénitale [3], ou via des transfusions de sang contaminé ou des transplantations d'organes [4,5]. La maladie de Chagas se développe en deux phases : la phase aiguë et la phase chronique. La phase aiguë dure environ deux mois et est habituellement une maladie fébrile asymptomatique auto-limitée caractérisée par une parasitémie élevée dans le sang circulant. Si des signes ou symptômes apparaissent, ceux-ci seront légers et comprendront, en général : un gonflement localisé au point d'inoculation, de la fièvre, de la fatigue, des éruptions cutanées, un gonflement des paupières (signe de Romaña), des maux de tête, des nausées, des diarrhées ou des vomissements, une inflammation des glandes, un grossissement du foie ou de la rate [6]. Si la phase aiguë n'est pas diagnostiquée ni traitée, l'infection persiste et peut progresser en phase chronique. La phase chronique peut durer toute la vie sans causer de symptômes ni évoluer en manifestation clinique chez 10 à 30 % des patients. Les signes et symptômes de la phase chronique de la maladie de Chagas peuvent apparaître 10 à 20 ans après l'infection initiale, voire même ne jamais se manifester. Dans des cas graves, cependant, les signes et symptômes de la maladie de Chagas peuvent comprendre : rythme cardiaque irrégulier, insuffisance cardiaque congestive, arrêt cardiaque soudain, difficultés de déglutition dues à un grossissement de l'œsophage, douleurs abdominales ou constipation dues à un grossissement du colon [6]. Il n'existe aucune procédure de référence pour diagnostiquer la maladie de Chagas. Lors de la phase aiguë de la maladie, la charge parasitaire dans le sang périphérique est élevée, et la maladie de Chagas peut être diagnostiquée par microscopie de frottis sanguins avec coloration de Giemsa [7]. Au CDC (Center of Disease Control and Prevention, Centre pour le contrôle et la prévention des maladies), la détection moléculaire de l'ADN de

*T. cruzi* s'effectue actuellement à l'aide d'une combinaison de trois essais PCR en temps réel. Le diagnostic moléculaire de la maladie de Chagas est effectué dans des cas de transmission suspectée par transfusion sanguine ou transplantation et pour le Chagas congénital. La détection moléculaire peut également être utile pour la détection précoce de *T. cruzi* transmis via les dons de sang et chez les receveurs de transplantations d'organes de donneurs atteints d'une forme chronique et asymptomatique de la maladie de Chagas [8].

- [1] Organisation mondiale de la Santé (OMS), Chagas disease (American trypanosomiasis), Genève : OMS ; 2010.
- [2] Nobrega AA, García MH, Tatto E, Obara MT, Costa E, Sobel J, et al., Oral transmission of Chagas disease by consumption of acai palm fruit, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2009 ; 15:653-5.
- [3] Gürtler RE, Segura EL, Cohen JE, Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* infection in Argentina. *Emerg Infect Dis.* 2003 ; 9:29-32
- [4] Tropical Disease Research, Organisation mondiale de la Santé. Insect vectors and human health. Report of the scientific working group meeting. Genève. Organisation. 2003 ; 23-5
- [5] Grant IH, Gold J, Wittner M, Tanowitz H, Nathan C, Mayer K, et al. Transfusion-associated acute Chagas disease acquired in the United States. *Ann Intern Med.* 1989 ; 111:849-51.
- [6] Organisation mondiale de la Santé (OMS), Chagas disease (American trypanosomiasis) (02/01/2018) : Fact-Sheets –Chagas disease (American trypanosomiasis). [http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)). Page consultée le 2 octobre 2018.
- [7] Bonomo, R. & Salata, R. (2000). American Trypanosomiasis (Chagas's Disease: *Trypanosoma cruzi*). Dans R. Behrman, R. Kliegman, & H. Jenson, (Eds.), *Nelson Textbook of Pediatrics (Manuel de pédiatrie Nelson)*. 16e édition (p. 1046-1048). Philadelphie : W. B. Saunders.
- [8] Alonso-Padilla J, Gallego M, Schijman AG, Gascon J. (2017). Molecular diagnostics for Chagas disease: up to date and novel methodologies. *Expert Rev Mol Diagn* 17(7) : 699-710.

## 6. Description du produit

Le RealStar® Chagas PCR Kit 1.0 est un test de diagnostic *in vitro* basé sur la technologie de PCR en temps réel pour la détection qualitative de l'ADN spécifique au *Trypanosoma cruzi*.

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

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).

Les sondes spécifiques à l'ADN du *T. cruzi* sont marquées avec le fluorophore FAM™. La sonde spécifique à l'Internal Control (contrôle interne, IC) est marquée avec le fluorophore JOE™.

L'utilisation de sondes associées à des fluorophores différents permet la détection en parallèle de l'ADN spécifique du *T. cruzi* et de l'Internal Control (contrôle interne) dans les canaux correspondants de l'instrument PCR en temps réel.

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

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

Le RealStar® Chagas PCR Kit 1.0 est constitué de :

- Master A
- Master B
- Internal Control
- Positive Control
- Water (PCR grade)

Internal Control = contrôle interne

Positive Control = contrôle positif

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

Master A et Master B contiennent tous les composants (tampon de PCR, polymérase d'ADN, sel de magnésium, amorces et sondes) pour permettre la l'amplification assistée de la PCR et la détection d'ADN spécifique au *T. cruzi*, et l'Internal Control (contrôle interne) au sein d'une même configuration de réaction.

### 6.1 Instruments PCR en temps réel

Le RealStar® Chagas 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)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)
- 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)

## 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 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.
- Éliminer 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 RealStar® Chagas 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)
- 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 le RealStar® Chagas 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 RealStar® Chagas 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 comme un contrôle d'inhibition de la PCR, mais non comme contrôle de préparation de l'échantillon, le master mix 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
<b>Volume de master mix</b>	<b>21 µl</b>	<b>252 µl</b>

- ▶ 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 a été ajouté pendant la phase de préparation de l'échantillon, le master mix 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
<b>Volume de master mix</b>	<b>20 µl</b>	<b>240 µl</b>

**ATTENTION**

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

**ATTENTION**

*Quelle que soit la méthode ou le système utilisé pour l'extraction des acides nucléiques, ne jamais ajouter l'IC directement à l'échantillon.*

**8.3 Préparation de la réaction**

- ▶ Pipeter 20 µl de master mix 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 (contrôle positif ou négatif).

Configuration des réactions	
Master mix	20 µl
Échantillon ou contrôle	10 µl
<b>Volume total</b>	<b>30 µl</b>

- ▶ 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 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 1000 x g (~ 3000 tr/min).

## 9. Programmation des instruments PCR en temps réel

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

Pour des instructions sur la programmation relative à l'utilisation du RealStar® Chagas PCR Kit 1.0 avec un instrument 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	Nom du détecteur	Rapporteur	Extincteur
ADN spécifique au <i>T. cruzi</i>	<i>T. cruzi</i>	FAM™	(Aucun)
Internal Control (contrôle interne, IC)	IC	JOE™	(Aucun)

Selon l'instrument PCR en temps réel, le canal de fluorescence pour détecter le fluorophore JOE™ n'est pas appelé « JOE™ », mais « VIC™ » ou « Yellow », par exemple. Pour obtenir des informations sur le canal de fluorescence à sélectionner pour la détection de l'Internal Control (contrôle interne) inclus dans le RealStar® Chagas PCR Kit 1.0, veuillez consulter le tableau 2.

**Tableau 2:** Canal de détection à sélectionner pour la détection de l'Internal Control (contrôle interne) en fonction de l'instrument PCR en temps réel utilisé

Instrument PCR en temps réel	Canal de détection pour l'Internal Control (contrôle interne)
Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems)	JOE™
Applied Biosystems™ 7500 Fast Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems)	JOE™
CFX96™ Real-Time PCR Detection System / CFX96™ Dx System (Bio-Rad)	VIC™
CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System / CFX96™ Deep Well Dx System (Bio-Rad)	VIC™
LightCycler® 480 Instrument II (Roche)	Ex : 498/533 nm ; Em : 580 nm
Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)	JOE™
Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)	Yellow
Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)	Yellow
VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)	JOE™

### 9.3 Profil de température et acquisition du fluorophore

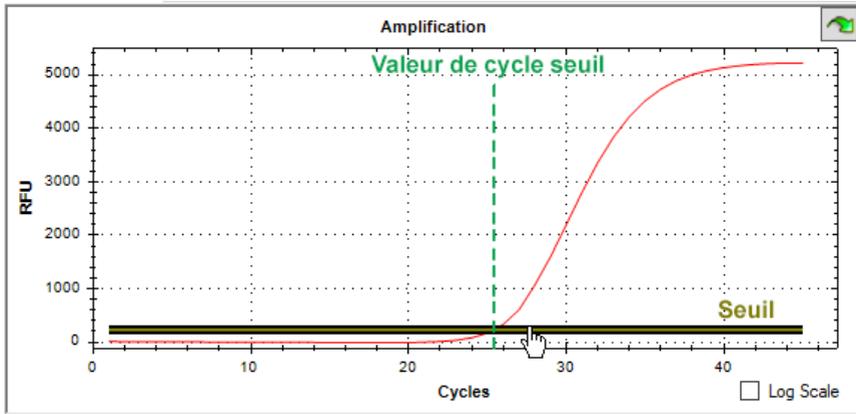
► Définissez le profil de température et l'acquisition de la coloration :

	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 obtenir des informations générales sur l'analyse des données sur des instruments PCR en temps réel, veuillez consulter le manuel d'utilisation de l'instrument respectif.

Pour l'analyse des résultats de PCR en temps réel, un seuil doit être défini pour chaque canal de détection de fluorescence individuellement. Pour cela, faites-le glisser dans la zone exponentielle de la courbe d'amplification, comme indiqué sur la figure 1. Pour plus de détails sur la définition d'un seuil, veuillez consulter le manuel d'utilisation de l'instrument PCR en temps réel respectif. La valeur de cycle seuil (également appelée point de croisement ou cycle de quantification) est le point où le seuil coupe la courbe d'amplification.



**Figure 1:** Définition du seuil pour un canal de détection de fluorescence

Les signaux positifs sont représentés par un nombre de cycles. Chaque valeur numérique supérieure à 0 et inférieure à 45 indique un signal positif. En fonction du thermocycleur, le nombre de cycles sera donné en  $C_t$  (cycle seuil),  $C_p$  (point de croisement) ou  $C_q$  (cycle de quantification). Les résultats positifs présentent généralement une courbe sigmoïde (en forme de « S »). Pour obtenir une description spécifique d'un signal positif, veuillez consulter le manuel d'utilisation de l'instrument PCR en temps réel respectif.

Les signaux négatifs sont représentés par « N/A » (signifiant non disponible), une absence de valeur numérique, une indétermination ou une absence de nombres numériques en général, par exemple. Pour obtenir une description spécifique d'un signal négatif, veuillez consulter le manuel d'utilisation de l'instrument PCR en temps réel respectif.

Pour obtenir des instructions détaillées concernant l'analyse des données générées avec le RealStar® Chagas PCR Kit 1.0 sur différents instruments 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	
	FAM™	JOE™
Positive Control (contrôle positif)	$C_t < 37$	$C_t < 40$ au absence de $C_t^*$
Negative Control (contrôle négatif)	Absence de $C_t$	$C_t < 40$

\* La présence ou l'absence d'un signal dans le canal JOE™ n'est pas pertinente pour la validité du test.

### 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

Canal de détection		Interprétation des résultats
FAM™	JOE™	
$C_t < 45^1$	Tout ou absence de $C_t^*$	ADN spécifique au <i>T. cruzi</i> détecté.
Absence de $C_t$	$C_t < 40$	Aucun ADN spécifique au <i>T. cruzi</i> détecté. L'échantillon ne contient pas de quantités détectables d'ADN spécifique au <i>T. cruzi</i> .
Absence de $C_t$	$C_t > 40$ ou absence de $C_t$	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 FAM™. Une charge élevée d'ADN spécifique au *T. cruzi* dans l'échantillon peut entraîner une réduction ou une absence du signal de l'Internal Control (contrôle interne).

<sup>1</sup> Le *Trypanosoma rangeli* est une espèce de *Trypanosoma* non humaine et pathogène dotée de la même prévalence et de la même voie de transmission que le *Trypanosoma cruzi*. En raison de la conception de l'essai, les échantillons positifs au *Trypanosoma rangeli* génèrent un signal positif sur le canal FAM™.

## 11. Evaluation des performances

L'évaluation des performances du RealStar® Chagas PCR Kit 1.0 a été réalisée avec un produit PCR spécifique au *Trypanosoma cruzi*.

## 11.1 Sensibilité analytique

La sensibilité analytique du RealStar® Chagas PCR Kit 1.0 est définie comme la concentration (copies/μl d'éluat) des molécules d'ADN spécifiques au *T. cruzi* pouvant être détectée avec un taux de positivité de 95 %. La sensibilité analytique a été déterminée par l'analyse d'une série de dilutions du produit PCR spécifique au *T. cruzi* contenant la région cible (kDNA) utilisée par le RealStar® Chagas PCR Kit 1.0.

**Tableau 3:** Résultats de PCR utilisés pour le calcul de la sensibilité analytique concernant la détection de l'ADN spécifique au *T. cruzi*

Conc. d'entrée [copies/μl]	Nombre de réplicats	Nombre de positifs	Taux de réussite [%]
31,600	24	24	100,0
10,000	24	24	100,0
5,000	24	24	100,0
3,160	48	46	95,8
2,500	24	23	95,8
1,500	24	9	37,5
1,000	48	2	4,2
0,316	24	0	0,0
0,100	24	0	0,0
0,032	24	0	0,0
0,010	24	0	0,0
0,003	24	0	0,0

La sensibilité analytique du RealStar® Chagas PCR Kit 1.0 a été déterminée à l'aide d'une analyse probit :

- Pour la détection de l'ADN spécifique au *T. cruzi*, la sensibilité analytique est de 2,8 copies/μl d'éluat [intervalle de confiance (CI) à 95 % : 2,5-3,4 copies/μl]

## 11.2 Spécificité analytique

La spécificité analytique du RealStar® Chagas PCR Kit 1.0 est garantie par la sélection minutieuse des oligonucléotides (amorces et sondes). Ceux-ci ont été contrôlés par analyse comparative des séquences par rapport à des séquences publiquement accessibles afin de garantir que tous les génotypes pertinents de *T. cruzi* seront détectés.

La spécificité analytique du RealStar® Chagas PCR Kit 1.0 a été évaluée en testant un panel d'ARN/ADN génomiques extraits de pathogènes liés à *T. cruzi* et d'autres pathogènes provoquant des symptômes similaires à *T. cruzi*.

Le RealStar® Chagas PCR Kit 1.0 ne présente pas de réactivité croisée avec les pathogènes suivants :

- Virus du Chikungunya
- Virus de la dengue
- Virus de l'immunodéficience humaine de type 1
- Virus de la grippe A
- Virus de la grippe B
- Virus du Nil occidental
- *Babesia microti*
- *Leishmania donovani*
- *Leishmania infantum*
- *Leishmania major*
- *Leishmania tropica*
- *Plasmodium falciparum*
- *Plasmodium vivax*
- *Plasmodium ovale*
- *Plasmodium malariae*
- *Plasmodium knowlesi*
- *Toxoplasma gondii*
- *Trypanosoma brucei*

### 11.3 Précision

La précision du RealStar® Chagas 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 sur la base des valeurs de cycle seuil ( $C_T$ ). Au moins 6 réplicats par échantillon ont été analysés pour la variabilité intra-essai, l'inter-essai et la variabilité inter-lot.

**Tableau 4:** Données de précision pour l'ADN spécifique au *T. cruzi*

<i>T. cruzi</i>	Cycle seuil moyen ( $C_T$ )	Écart-type	Coefficient de variation [%]
Variabilité intra-essai	26,82	0,11	0,40
Variabilité inter-essai	27,14	0,28	1,04
Variabilité inter-lot	26,85	0,09	0,34
Variabilité totale	27,03	0,28	1,04

**Tableau 5:** Données de précision pour la détection de l'Internal Control (contrôle interne)

Internal Control (contrôle interne)	Cycle seuil moyen ( $C_T$ )	Écart-type	Coefficient de variation [%]
Variabilité intra-essai	24,91	0,08	0,31
Variabilité inter-essai	24,99	0,07	0,28
Variabilité inter-lot	24,92	0,07	0,28
Variabilité totale	24,96	0,08	0,32

## 11.4 Évaluation du diagnostic

Le RealStar® Chagas PCR Kit 1.0 a été évalué dans le cadre d'une étude comparative avec l'essai PCR kDNA conventionnel interne [sur la base de Norman *et al.* (2011) et Ramírez *et al.* (2015)]. Rétrospectivement, 55 échantillons de sang total ont été testés.

Le RealStar® Chagas PCR Kit 1.0 et l'essai PCR kDNA conventionnel interne [sur la base de Norman *et al.* (2011) et Ramírez *et al.* (2015)] ont été utilisés conjointement au High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche).

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

Les résultats des 55 échantillons restants figurent dans le tableau 6.

**Tableau 6:** Résultats de l'évaluation de la sensibilité et de la spécificité diagnostiques du RealStar® Chagas PCR Kit 1.0

		Essai PCR kDNA conventionnel interne [sur la base de Norman <i>et al.</i> (2011) et Ramírez <i>et al.</i> (2015)]	
		POSITIF	NÉGATIF
RealStar® Chagas PCR Kit 1.0	POSITIF	27	0
	NÉGATIF	0	28

La sensibilité et la spécificité du diagnostic obtenues à l'aide du RealStar® Chagas PCR Kit 1.0 par rapport à l'essai PCR kDNA conventionnel interne [sur la base de Norman *et al.* (2011) et Ramírez *et al.* (2015)] pour la détection de l'ADN de *Trypanosoma cruzi* chez les patients atteints de la maladie de Chagas aiguë, réactive ou congénitale étaient de 100 % (intervalle de confiance : 87,23 % à 100 %) et 100 % (intervalle de confiance : 87,66 % à 100 %), respectivement.

## 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 *T. cruzi* couvertes par les amorces et/ou les sondes utilisées dans le kit peuvent empêcher de détecter la présence des pathogènes.

- La parasitémie très faible associée à l'infection chronique par *Trypanosoma cruzi* peut entraîner des faux négatifs.
- Comme pour tout test de diagnostic, les résultats obtenus avec le RealStar® Chagas 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 d'Altona Diagnostics GmbH certifié EN ISO 13485, chaque lot du RealStar® Chagas 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 et David W. Warnock (ed). Manual of Clinical Microbiology. 10<sup>e</sup> édition. ASM Press, 2011.

Cohen, Jonathan, Powderly, William G et Steven M Opal. Infectious Diseases. 3<sup>e</sup> édition. Mosby, 2010.

## 16. Marques de commerce et clauses de non-responsabilité

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

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

Produit non homologué auprès de Santé Canada et non autorisé ou approuvé par la FDA.

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

© 2022 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

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

**Remarques :**

**Remarques :**

**Remarques :**



**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](mailto:info@altona-diagnostics.com)

[www.altona-diagnostics.com](http://www.altona-diagnostics.com)

