

Instrucciones de uso

RealStar[®]

Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0

03/2019 ES

RealStar®

Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0

Para utilizar con

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



03 2019



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

Contenido

1.	Uso indicado.....	6
2.	Componentes del kit.....	6
3.	Almacenamiento	7
4.	Material y dispositivos necesarios pero no proporcionados	7
5.	Información general.....	8
6.	Descripción del producto.....	10
6.1	Instrumentos de PCR en tiempo real.....	13
7.	Advertencias y precauciones	13
8.	Procedimiento	15
8.1	Preparación de las muestras	15
8.2	Configuración de Master Mix	16
8.3	Configuración de reacción	18
9.	Programación del instrumentos de PCR en tiempo real.....	19
9.1	Configuración.....	19
9.2	Detectores de fluorescencia (colorantes).....	20
9.3	Perfil de temperatura y detección de fluorescencia	20
10.	Análisis de datos.....	21
10.1	Validez de las series de pruebas diagnósticas	21
10.1.1	Serie válida de pruebas diagnósticas (cualitativa).....	21
10.1.2	Serie no válida de pruebas diagnósticas (cualitativa).....	21
10.2	Interpretación de los resultados	23
10.2.1	Análisis cualitativo.....	23
11.	Evaluación de rendimiento	24

11.1	Sensibilidad analítica	24
11.2	Especificidad analítica.....	28
11.3	Precisión	29
12.	Limitaciones	31
13.	Control de calidad.....	33
14.	Asistencia técnica.....	33
15.	Bibliografía	33
16.	Marcas comerciales y aviso legal.....	34
17.	Explicación de los símbolos	35

1. Uso indicado

El RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 es una prueba de diagnóstico *in vitro* que se basa en tecnología PCR en tiempo real, para la detección y la diferenciación cualitativas de ADN de las especies de *Plasmodium* patógenas para el ser humano de *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium vivax* y *Plasmodium falciparum*.

2. Componentes del kit

El kit contiene dos pruebas de PCR diferentes con 48 reacciones cada una. Incluye dos controles positivos diferentes: uno para el sistema de detección y amplificación específicas para *Plasmodium (P.) knowlesi*, *P. malariae* y *P. ovale* y el otro para el sistema de detección y amplificación específicas para *P. falciparum* y *P. vivax*.

Color tapa	Componente	Número de viales	Volumen [µl/vial]
Azul	Master A Pk/Pm/Po ¹⁾	4	60
Violeta	Master B Pk/Pm/Po ¹⁾	4	180
Azul Claro	Master A Pf/Pv ²⁾	4	60
Violeta Claro	Master B Pf/Pv ²⁾	4	180
Verde	Internal Control	1	1000
Rojo	Positive Control Pk/Pm/Po ¹⁾	1	250
Naranja	Positive Control Pf/Pv ²⁾	1	250
Blanco	Water (PCR grade)	1	500

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

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

3. Almacenamiento

- El RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 se envía en hielo seco. Los componentes del kit deberían llegar congelados. Si uno o más componentes no estuvieran congelados en el momento de la recepción, o si la integridad de los tubos se ha puesto en peligro durante el envío, póngase en contacto con Altona Diagnostics GmbH para obtener ayuda.
- Todos los componentes deben almacenarse entre -25 y -15 °C tras su llegada
- Debe evitarse la descongelación y congelación reiterada de los reactivos Master (más de dos veces), ya que podría repercutir en el rendimiento de la prueba de valoración. Los reactivos deben congelarse en alícuotas si se van a utilizar de manera intermitente.
- El almacenamiento entre +2 y +8 °C no debe superar un período de dos horas.
- Proteja Master A y Master B de la luz.

4. Material y dispositivos necesarios pero no proporcionados

- Instrumento adecuado de PCR en tiempo real (ver capítulo 6.1, Instrumentos de PCR en tiempo real)
- Sistema o kit de extracción de ácido nucleico adecuados (consulte el capítulo 8.1 Preparación de las muestras)
- Centrífuga de escritorio con rotor para tubos de reacción de 2 ml
- Centrífuga con rotor para placas de microtitulación, si se utilizan placas de reacción de 96 pocillos
- Agitador vortex
- Placas de reacción de 96 pocillos adecuadas o tubos de reacción con el material de cierre (óptico) correspondiente
- Pipetas (ajustables)
- Puntas de pipetas con filtros (desechables)
- Guantes sin polvo (desechables)

NOTA

i

Asegúrese de que todos los instrumentos utilizados se instalen, se calibren, se comprueben y se mantengan conforme a las instrucciones y recomendaciones del fabricante.

NOTA

i

Se recomienda encarecidamente utilizar el rotor de 72 pocillos con los tubos de reacción de 0,1 ml adecuados, si se utiliza el Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research) o el Rotor-Gene® Q 5/6 plex (QIAGEN).

5. Información general

El paludismo es una enfermedad transmitida por vectores, causada por una infección protozoaria. Los parásitos del género *Plasmodium* se transmiten a sus huéspedes vertebrados al ingerir esta la sangre de un mosquito hembra infectado del género *Anopheles*. El ciclo de vida de los parásitos abarca un cambio de huésped del artrópodo al huésped vertebrado y es bastante complejo, pero puede dividirse en tres fases principales. Estas fases se basan en la etapa del parásito en el mosquito, la etapa en el hígado humano y la etapa en la sangre humana. Hay cinco especies patógenas de *Plasmodium* conocidas en el ser humano, que son *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium vivax* y *Plasmodium malariae* [1].

La enfermedad del paludismo se presenta en diferentes manifestaciones, en función de la especie de *Plasmodium* causante de la infección. Por lo general, los primeros síntomas del paludismo son muy poco específicos: fiebre, dolor de cabeza, debilidad corporal general, mialgia, escalofríos, mareos, dolor abdominal, diarrea, náuseas y vómitos. *P. falciparum* y *P. knowlesi* son capaces de provocar paludismo grave en humanos [2,3]. *P. falciparum* es responsable de una tasa de mortalidad anual de más del 90 %, principalmente en niños [2].

P. knowlesi pasa por una breve etapa eritrocítica (24 horas) durante la cual se reproduce rápidamente [4]. La hiperparasitemia resultante puede causar

complicaciones potencialmente letales, como un fallo multiorgánico o el fallecimiento del paciente. *P. knowlesi* solía diagnosticarse erróneamente como *P. malariae*, debido a las similitudes fenotípicas, o como *P. vivax*, por las similitudes genéticas, hasta el desarrollo de un ensayo basado en la PCR específica para *P. knowlesi* [5].

Aunque *P. vivax* se considera un parásito benigno, produce manifestaciones clínicas incapacitantes y complicaciones potencialmente letales como anemia grave, trombocitopenia y paroxismos peligrosos [6].

Una infección por *P. ovale* suele confundirse con una infección por *P. vivax* debido a la fiebre terciana que provoca. Las infecciones por cualquiera de esas dos especies de parásitos muestran síntomas similares y se tratan de manera parecida; la única diferencia es la posible gravedad de una infección por *P. vivax*. Es más, las infecciones por *P. ovale* y *P. vivax* se caracterizan por recaídas debilitantes repetidas debidas a los hipnozoítos latentes que persisten en los hepatocitos incluso después de la eliminación de los parásitos [1].

Las infecciones por *P. malariae* se caracterizan por una baja parasitemia y un cuadro leve de la enfermedad.

El diagnóstico del paludismo mediante la microscopia de frotis de sangre grueso o fino sometido a tinción de Giemsa es el método de referencia [7]. Además, suelen realizarse pruebas de diagnóstico rápido recomendadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Sin embargo, la sensibilidad y la especificidad de estos métodos son bastante limitadas, y la diferenciación de las especies de *Plasmodium* apenas es posible con ninguna de las dos técnicas [8]. Hay una clara necesidad de herramientas de diagnóstico más sensibles que sean rápidas, precisas y que permitan tipificar la especie de *Plasmodium*, con el objetivo de conseguir una gestión y un control efectivos de la enfermedad. Las técnicas moleculares, como la PCR en tiempo real, son cada vez más populares ya que son alternativas más sensibles, fiables [9,10] y fáciles de usar que el método de referencia. El uso correcto de pruebas de diagnóstico sensibles y específicas puede evitar el uso innecesario de fármacos contra el paludismo y contribuir a una gestión de la enfermedad rentable y apropiada.

- [1] Cowman, A. F., Healer, J., Marapana, D., Marsh, K. (2016), Malaria: Biology and Disease. Cell. 167(3):610-624.
- [2] Organización Mundial de la Salud (2015), Informe Mundial sobre el Paludismo 2015. Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Suiza.
- [3] Cox-Singh, J., Davis, T. M., Lee, K. S., Shamsul, S. S., Matusop, A., Ratnam, S., Rahman, H. A., Conway, D. J., Singh, B (2008), Plasmodium knowlesi malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. Clin Infect Dis., 46(2):165–71.
- [4] White, N. J. (2008), Plasmodium knowlesi: the fifth human malaria parasite. Clin Infect Dis., 15;46(2):172-3.
- [5] Divis, P. C., Shokoples, S. E., Singh, B. y Yanow Stephanie, K. (2010), A TaqMan real-time PCR assay for the detection and quantitation of Plasmodium knowlesi. Malar J, 9:344.
- [6] Kochar, D. K., Saxena, V., Singh, N., Kochar, S. K., Kumar, S. V. y Das, A. (2005), Plasmodium vivax Malaria. Emerg Infect Dis. 11(1):132-134.
- [7] Warhurst, D. C. y J. E. Williams (1996), Laboratory diagnosis of malaria. J. Clin. Pathol. 49:533-538.
- [8] Organización Mundial de la Salud (2000), WHO/MAL/2000.1091. New perspectives in malaria diagnosis. Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Suiza.
- [9] Snounou, G., Viriyakosol, S., Jarra, W., Thaithong, S. y Brown, K. N. (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., Brown, A. E., Panyim, S., Kain, K. C., Webster, K., y Echeverria, P. (1992), Detection of Plasmodium falciparum by polymerase chain reaction in a field study. J. Infect. Dis. 166:145-148.

6. Descripción del producto

El RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 es una prueba de diagnóstico *in vitro* que se basa en tecnología PCR en tiempo real, para la detección y la diferenciación cualitativas de ADN de las especies de *Plasmodium* patógenas para el ser humano de *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium vivax* y *Plasmodium falciparum*.

El RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 se compone de dos pruebas de valoración independientes, una que fija como objetivo el ADN específico de *P. ovale*, *P. malariae* y *P. knowlesi* y otra que fija como objetivo el específico de *P. vivax* y *P. falciparum* ADN

Ambas pruebas incluyen un sistema de amplificación heterólogo [Internal Control (control interno)] para identificar una posible inhibición de PCR y para confirmar la integridad de los reactivos del kit.

La tecnología de PCR utiliza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación de secuencias de objetivo específicas y sondas específicas de objetivos para la detección del ADN amplificado. Las sondas se marcan con fluoróforos Reporter y Quencher.

Master Mix Pk/Pm/Po: La sonda específica para el ADN de *P. knowlesi* se marca con el fluoróforo ROX™, la sonda específica para el ADN de *P. malariae* se marca con el fluoróforo FAM™ y la sonda específica para el ADN de *P. ovale* se marca con el fluoróforo Cy®5.

Master Mix Pf/Pv: La sonda específica para el ADN de *P. falciparum* se marca con el fluoróforo FAM™ y la sonda específica para el ADN de *P. vivax* se marca con el fluoróforo Cy®5.

La sonda específica para el control interno (IC) se marca con el fluoróforo JOE™.

Utilizar sondas vinculadas a colorantes distinguibles permite la detección paralela del ADN específico de *P. knowlesi*, *P. malariae*, *P. ovale* y *P. falciparum*, *P. vivax*, así

como la detección del Internal Control (control interno) en los canales detectores correspondientes del instrumento PCR en tiempo real.

La prueba para ambas pruebas de valoración consta de dos procesos en una sola prueba de valoración de tubo:

- Amplificación de PCR del ADN objetivo y control interno
- Detección simultánea de amplicones de PCR mediante sondas marcadas con fluoróforos

El RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 se compone de:

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

El set Master A y Master B Pk/Pm/Po contiene todos los componentes (solución amortiguadora de PCR, polimerasa de ADN, sal de magnesio, cebadores y sondas) para permitir la amplificación con mediación de PCR y la detección de ADN específico de *P. knowlesi*, *P. malariae* y *P. ovale*, además del Internal Control (control interno) en una configuración de reacción.

El set Master A y Master B Pf/Pv contiene todos los componentes (solución amortiguadora de PCR, polimerasa de ADN, sal de magnesio, cebadores y sondas) para permitir la amplificación con mediación de PCR y la detección de ADN específico de *P. falciparum* y *P. vivax*, además del Internal Control (control interno) en una configuración de reacción.

6.1 Instrumentos de PCR en tiempo real

El RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 se desarrolló y validó para usarse con los siguientes instrumentos PCR en tiempo real:

- 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. Advertencias y precauciones

Lea las instrucciones de uso detenidamente antes de utilizar el producto.

- Antes del primer uso, compruebe lo siguiente en el producto y sus componentes:
 - Integridad
 - Si está completo en cuanto a número, tipo y relleno (ver capítulo 2. Componentes del kit)
 - Marcado correcto
 - Si está congelado al llegar
- El uso de este producto se encuentra limitado al personal instruido especialmente y formado en las técnicas de PCR en tiempo real y procedimientos de diagnóstico *in vitro*.
- Las muestras deben tratarse siempre como si fueran infecciosas o biopeligrosas conforme a los procedimientos seguros de laboratorio.

- Utilice guantes protectores desechables sin polvo, bata de laboratorio y protección ocular cuando manipule muestras.
- Evite la contaminación microbiana y con nucleasas (DNasa/RNasa) de la muestra y de los componentes del kit.
- Utilice siempre puntas de pipetas desechables libres de DNasa/RNasa con barreras de aerosol.
- Utilice siempre guantes protectores desechables sin polvo cuando manipule los componentes del kit.
- Utilice áreas de trabajo separadas y segregadas para (i) la preparación de las muestras, (ii) la configuración de reacción y (iii) las actividades de amplificación/detección. El flujo de trabajo en el laboratorio debe realizarse de manera unidireccional. Utilice siempre guantes desechables en cada área y cámbieselos antes de acceder a un área distinta.
- Utilice suministros y equipamiento en cada área de trabajo separada y no los mueva de un área a otra.
- Almacene el material positivo o presuntamente positivo separadamente de todos los demás componentes del kit.
- No abra los tubos o placas de reacción después de la amplificación, para evitar la contaminación con amplicones.
- Pueden realizarse pruebas a controles adicionales de acuerdo con las pautas o requisitos de las leyes locales, estatales o federales, o de organizaciones de acreditación.
- No esterilice en el autoclave los tubos de reacción después del PCR, ya que no degradará el ácido nucleico amplificado y conllevará el riesgo de contaminar la zona del laboratorio.
- No utilice componentes del kit cuya fecha de caducidad haya vencido.
- Descarte muestras y residuos de productos conforme a las regulaciones locales de seguridad.

8. Procedimiento

8.1 Preparación de las muestras

La calidad del ADN extraído tiene una repercusión fundamental en el rendimiento de todo el sistema de pruebas. Se recomienda garantizar que el sistema utilizado para la extracción de ácidos nucleicos sea compatible con la tecnología de PCR en tiempo real. Los siguientes kits y sistemas son adecuados para la extracción de ácido nucleico:

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

También pueden resultar adecuados sistemas alternativos de extracción de ácido nucleico. La idoneidad del procedimiento de extracción de ácido nucleico para su uso con el RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 debe validarla el usuario.

Si utiliza un procedimiento de preparación de muestras basado en centrifugación (spin column, en inglés) que incluya soluciones amortiguadoras de lavado que contengan etanol, se recomienda encarecidamente seguir un paso de centrifugación adicional durante 10 minutos a aproximadamente 17 000 x g (~13 000 rpm), utilizando un tubo de recogida nuevo, antes de la elución del ácido nucleico.

PRECAUCIÓN



Si su sistema de preparación de pruebas utiliza soluciones amortiguadoras de lavado que contengan etanol, asegúrese de eliminar cualquier resto de etanol antes de la elución del ácido nucleico. El etanol es un potente inhibidor en PCR en tiempo real.

PRECAUCIÓN



El uso de ARN portador es crucial para la eficiencia de la extracción y para la estabilidad del ácido nucleico extraído.

Si necesita más información o asistencia técnica en relación con el pretratamiento y la preparación de las muestras, póngase en contacto con nuestro Soporte técnico (consulte el capítulo 14. Asistencia técnica).

8.2 Configuración de Master Mix

Todos los reactivos y muestras deben descongelarse del todo, mezclarse (pipeteando o aplicando un vortex suave) y centrifugarse brevemente antes de su uso.

El RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 contiene un control interno (IC) heterólogo, que puede utilizarse como control de inhibición de PCR o para controlar el procedimiento de preparación de muestras (extracción de ácido nucleico) y como control de inhibición de PCR.

- ▶ Si se utiliza el IC como control de inhibición de PCR, pero no como control para el procedimiento de preparación de las muestras, configure cada Master Mix (Master Mix Pk/Pm/Po y Master Mix Pf/PV) de acuerdo con el siguiente esquema de pipeteo:

Número de reacciones (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Internal Control (control interno)	1 µl	12 µl
Master Mix de volumen	21 µl	252 µl

- ▶ Si se utiliza el IC como control para el procedimiento de preparación de muestras y como control de inhibición de PCR, añada el IC durante el procedimiento de extracción de ácido nucleico.
- ▶ Sin importar qué método o sistema se utilice para la extracción de ácido nucleico, el IC **no debe** añadirse directamente al espécimen. El IC debe añadirse siempre a la mezcla de espécimen/Lysis Buffer (tampón de lisis). El volumen del IC que debe añadirse dependerá siempre y únicamente del volumen de la elución. Representa el 10 % del volumen de la elución. Por ejemplo, si se va a eluir el ácido nucleico en 60 µl de Elution Buffer (tampón de elución) o agua, deberán añadirse 6 µl de IC por muestra a la mezcla de espécimen/Lysis Buffer (tampón de lisis).
- ▶ Si se añadió IC durante el procedimiento de preparación de las muestras, configure cada Master Mix (Master Mix Pk/Pm/Po y Master Mix Pf/Pv) de acuerdo con el siguiente esquema de pipeteo:

Número de reacciones (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Master Mix de volumen	20 µl	240 µl

PRECAUCIÓN

Si se añadió el IC [Internal Control (control interno)] durante el procedimiento de preparación de las muestras, al menos el control negativo debe incluir el IC.

PRECAUCIÓN

Sin importar qué método o sistema se utilice para la extracción de ácido nucleico, no añada nunca el IC directamente al espécimen.

8.3 Configuración de reacción

- ▶ Pipetee 20 µl de la Master Mix Pk/Pm/Po o la Master Mix Pf/Pv en cada pocillo necesario de una placa de reacción óptica adecuada de 96 pocillos o un tubo de reacción óptica adecuado.
- ▶ Añada 10 µl de la muestra (eluido de la extracción de ácido nucleico) o 10 µl de los controles (control positivo o negativo).

Configuración de reacción	
Master Mix	20 µl
Muestra o control	10 µl
Volumen total	30 µl

- ▶ Asegúrese de que al menos se utilicen un control positivo (control positivo de Pk/Pm/Po para Master Mix Pk/Pm/Po y control positivo de Pf/Pv para Master Mix Pf/Pv) y al menos un control negativo por Master Mix y por serie.
- ▶ Mezcle a fondo las mezclas y los controles con la Master Mix pipeteando hacia arriba y hacia abajo.
- ▶ Cierre la placa de reacción de 96 pocillos con las tapas adecuadas o una película adhesiva óptica y los tubos de reacción con las tapas adecuadas.
- ▶ Centrifugue la placa de 96 pocillos en una centrifuga con un rotor de placa de microtítulos durante 30 segundos a aproximadamente 1000 x g (~3000 rpm).

9. Programación del instrumentos de PCR en tiempo real

Para ver información básica en relación con la configuración y la programación de los diferentes instrumentos de PCR en tiempo real, consulte el manual de usuario del instrumento en cuestión.

Para ver instrucciones de programación detalladas sobre el uso del RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 en instrumentos PCR específicos en tiempo real, póngase en contacto con nuestro Soporte técnico (consulte el capítulo 14. Asistencia técnica).

9.1 Configuración

- Defina la siguiente configuración:

Configuración	
Volumen de reacción	30 µl
Índice de aumento	Predeterminado
Referencia pasiva	Ninguno

9.2 Detectores de fluorescencia (colorantes)

► Defina los detectores de fluorescencia (colorantes):

Objetivo	Master Mix	Nombre de detector	Reporter	Quencher
Específico de <i>P. knowlesi</i> ADN	Pk/Pm/Po	<i>P. knowlesi</i>	ROX™	(Ninguno)
Específico de <i>P. malariae</i> ADN		<i>P. malariae</i>	FAM™	(Ninguno)
Específico de <i>P. ovale</i> ADN		<i>P. ovale</i>	Cy®5	(Ninguno)
Específico de <i>P. falciparum</i> ADN	Pf/Pv	<i>P. falciparum</i>	FAM™	(Ninguno)
Específico de <i>P. vivax</i> ADN		<i>P. vivax</i>	Cy®5	(Ninguno)
Internal Control (control interno)	Pk/Pm/Po y Pf/Pv	IC	JOE™	(Ninguno)

9.3 Perfil de temperatura y detección de fluorescencia

► Defina el perfil de temperatura y la detección de fluorescencia:

	Modo de análisis	Ciclo Repeticiones	Obtención	Temperatura [°C]	Tiempo [min:s]
Desnaturalización	Retención	1	-	95	2:00
Amplificación	Ciclo	45	-	95	0:15
			sí	58	0:45
			-	72	0:15

10. Análisis de datos

Para ver información básica en relación con el análisis de datos en instrumentos específicos de PCR en tiempo real, consulte el manual de usuario del instrumento en cuestión.

Para ver instrucciones detalladas sobre el análisis de los datos generados con el RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 en diferentes instrumentos PCR en tiempo real, póngase en contacto con nuestro Soporte técnico (consulte el capítulo 14. Asistencia técnica).

10.1 Validez de las series de pruebas diagnósticas

10.1.1 Serie válida de pruebas diagnósticas (cualitativa)

Una serie de pruebas diagnósticas **cualitativa** es **válida** si se cumplen las siguientes condiciones de control:

Id. de control	FAM			
	ROX™	FAM™	Cy ⁵	JOE™
Control positivo <i>P. knowlesi</i> , <i>P. malariae</i> , <i>P. ovale</i>	+	+	+	+/-*
Control positivo <i>P. falciparum</i> , <i>P. vivax</i>	-	+	+	+/-*
Control negativo	-	-	-	+

* La presencia o ausencia de una señal en el canal JOE™ no es relevante para la validez de la serie de pruebas.

10.1.2 Serie no válida de pruebas diagnósticas (cualitativa)

Una serie de pruebas diagnósticas **cualitativa** es **no válida** (i) si la serie no se ha completado o (ii) si no se cumple cualquiera de las condiciones de control para una serie de pruebas diagnósticas **válida**.

En caso de una serie de pruebas diagnósticas **no válida**, repita las pruebas utilizando el resto de ácidos nucleicos purificados o empiece de nuevo con las muestras originales.

10.2 Interpretación de los resultados

10.2.1 Análisis cualitativo

Tabla 1: Análisis cualitativo empleando Master Mix Pk/Pm/Po

Canal de detección				Master Mix	Interpretación del resultado
ROX™	FAM™	Cy®5	JOE™		
+	+	+	+*	Pk/Pm/ Po	Se ha detectado ADN específico de <i>P. knowlesi</i> , <i>P. malariae</i> y <i>P. ovale</i> .
+	-	-	+*		Se ha detectado ADN específico de <i>P. knowlesi</i> .
-	+	-	+*		Se ha detectado ADN específico de <i>P. malariae</i> .
-	-	+	+*		Se ha detectado ADN específico de <i>P. ovale</i> .
+	+	-	+*		Se ha detectado ADN específico de <i>P. knowlesi</i> y <i>P. malariae</i> .
+	-	+	+*		Se ha detectado ADN específico de <i>P. knowlesi</i> y <i>P. ovale</i> .
-	+	+	+*		Se ha detectado ADN específico de <i>P. malariae</i> y <i>P. ovale</i> .
-	-	-	+		No se ha detectado ADN específico de <i>P. knowlesi</i> ni de <i>P. malariae</i> ni de <i>P. ovale</i> .
-	-	-	-		PCR fallo de reactivo o inhibición. Repita las pruebas con la muestra original o recoja y someta a pruebas una nueva muestra.

* La detección del Internal Control (control interno) en el canal de detección JOE™ no es necesaria para resultados positivos en los canales de detección Cy®5, FAM™ ni ROX™. Una carga alta de ADN de *Plasmodium* spp. en la muestra puede provocar señales reducidas o ausentes de Internal Control (control interno).

Tabla 2: Análisis cualitativo empleando Master Mix Pf/Pv

Canal de detección				Master Mix	Interpretación del resultado
ROX™	FAM™	Cy®5	JOE™		
N/A	+	+	+*	Pf/Pv	Se ha detectado ADN específico de <i>P. falciparum</i> y <i>P. vivax</i> .
	+	-	+*		Se ha detectado ADN específico de <i>P. falciparum</i> .
	-	+	+*		Se ha detectado ADN específico de <i>P. vivax</i> .
	-	-	+		No se ha detectado ADN específico de <i>P. falciparum</i> ni de <i>P. vivax</i> .
	-	-	-		PCR Fallo de reactivo o inhibición. Repita las pruebas con la muestra original o recoja y someta a pruebas una nueva muestra.

* La detección del Internal Control (control interno) en el canal de detección JOE™ no es necesaria para resultados positivos en los canales de detección Cy®5, FAM™ ni ROX™. Una carga alta de ADN de *Plasmodium* spp. en la muestra puede provocar señales reducidas o ausentes de Internal Control (control interno).

11. Evaluación de rendimiento

La evaluación de rendimiento del RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 se realizó utilizando productos de PCR cuantificados y ADN genómico de *Plasmodium* species.

11.1 Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica del RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 se define como la concentración (copias/μl del eluido) de moléculas de ADN específico de *Plasmodium* que pueden detectarse con un índice positivo del 95 %. La sensibilidad

analítica se determinó mediante el análisis de series de dilución de productos de PCR específicos de *Plasmodium* (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* y *P. knowlesi*).

Tabla 3: Resultados de PCR utilizados para el cálculo de la sensibilidad analítica con respecto a la detección de ADN específico de *P. falciparum*

Conc. entrada [copias/ μ l]	Número de replicados	Número de positivos	Índice de éxito [%]
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

Tabla 4: Resultados de PCR utilizados para el cálculo de la sensibilidad analítica con respecto a la detección de ADN específico de *P. vivax*

Conc. entrada [copias/μl]	Número de replicados	Número de positivos	Índice de éxito [%]
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

Tabla 5: Resultados de PCR utilizados para el cálculo de la sensibilidad analítica con respecto a la detección de ADN específico de *P. ovale*

Conc. entrada [copias/μl]	Número de replicados	Número de positivos	Índice de éxito [%]
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

Tabla 6: Resultados de PCR utilizados para el cálculo de la sensibilidad analítica con respecto a la detección de ADN específico de *P. malariae*

Conc. entrada [copias/ μ l]	Número de replicados	Número de positivos	Índice de éxito [%]
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

Tabla 7: Resultados de PCR utilizados para el cálculo de la sensibilidad analítica con respecto a la detección de ADN específico de *P. knowlesi*

Conc. entrada [copias/ μ l]	Número de replicados	Número de positivos	Índice de éxito [%]
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 sensibilidad analítica del RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 se determinó mediante análisis Probit:

- Para la detección de ADN específico de *P. falciparum*, la sensibilidad analítica es de 0,80 copias/μl del eluido [95 % de intervalo de confianza (CI): 0,44 a 2,45 copias/μl]
- Para la detección de ADN específico de *P. vivax*, la sensibilidad analítica es de 0,73 copias/μl del eluido [95 % de intervalo de confianza (CI): 0,46 a 1,62 copias/μl]
- Para la detección de ADN específico de *P. ovale*, la sensibilidad analítica es de 1,46 copias/μl del eluido [95 % de intervalo de confianza (CI): 0,89 a 3,28 copias/μl]
- Para la detección de ADN específico de *P. malariae*, la sensibilidad analítica es de 0,36 copias/μl del eluido [95 % de intervalo de confianza (CI): 0,24 a 0,74 copias/μl]
- Para la detección de ADN específico de *P. knowlesi*, la sensibilidad analítica es de 2,35 copias/μl del eluido [95 % de intervalo de confianza (CI): 1,37 a 5,55 copias/μl]

11.2 Especificidad analítica

La especificidad analítica del RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 se evaluó probando un panel de ARN/ADN genómico extraído de patógenos relacionados con *Plasmodium* y otros patógenos que causan síntomas similares a los de *Plasmodium*.

El RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 no mostró reacciones cruzadas con ninguno de los siguientes patógenos:

- Virus del chikunguña
- Virus del dengue
- Virus de la gripe A
- Virus de la gripe B
- Virus del Nilo Occidental
- *Babesia microti*
- *Leishmania donovani*
- *Leishmania infantum*

- *Leishmania major*
- *Toxoplasma gondii*
- *Trypanosoma brucei*
- *Trypanosoma cruzi*

La especificidad analítica del RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 con respecto a las otras cuatro especies de *Plasmodium* se evaluó analizando ADN genómico.

Para demostrar que el RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 puede detectar y diferenciar correctamente ADN de *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. knowlesi*, *P. malariae* y *P. ovale*, se comprobó ADN genómico de las cinco especies de *Plasmodium* usando un CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (sistema de detección) (Bio-Rad) para el análisis de PCR en tiempo real. Cada muestra dio positivo para el ADN específico de la especie respectiva de *Plasmodium*, pero negativo para las otras cuatro especies de *Plasmodium*.

11.3 Precisión

La precisión para el RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 se determinó como variabilidad de intratest (variabilidad dentro de un experimento), variabilidad de intertest (variabilidad entre diferentes experimentos) y variabilidad interlote (variabilidad entre diferentes lotes de producción). La variabilidad total se calculó combinando los tres análisis.

Los datos de variabilidad se expresan en términos de desviación estándar y coeficiente de variación. Los datos se basan en valores de ciclo de umbral (C_t). Se analizaron al menos seis replicados por muestra para variabilidad intratest, intertest e interlote.

Tabla 8: Datos de precisión para la detección de ADN específico de *P. ovale*, *P. malariae* y *P. knowlesi*

<i>P. ovale</i> , <i>P. malariae</i> y <i>P. knowlesi</i>		Ciclo de umbral medio (C _t)	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%)
Variabilidad intraensayo	<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
Variabilidad intertest	<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
Variabilidad interlote	<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
Variabilidad total	<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

Tabla 9: Datos de precisión para la detección de ADN específico de *P. falciparum* y *P. vivax*

<i>P. falciparum</i> y <i>P. vivax</i>		Ciclo de umbral medio (C _t)	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%)
Variabilidad intraensayo	<i>P. falciparum</i>	31,72	0,11	0,35
	<i>P. vivax</i>	31,71	0,26	0,82
Variabilidad intertest	<i>P. falciparum</i>	31,38	0,37	0,14
	<i>P. vivax</i>	31,57	0,24	0,77
Variabilidad interlote	<i>P. falciparum</i>	31,42	0,33	1,04
	<i>P. vivax</i>	31,09	0,40	1,27
Variabilidad total	<i>P. falciparum</i>	31,29	0,33	1,04
	<i>P. vivax</i>	31,30	0,46	1,46

Tabla 10: Datos de precisión para la detección del Internal Control (control interno) usando Pk/Pm/Po

Internal Control (control interno)	Ciclo de umbral (C _t)	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%)
Variabilidad intraensayo	25,88	0,07	0,29
Variabilidad intertest	25,64	0,27	1,05
Variabilidad interlote	25,89	0,06	0,23
Varianza total	25,72	0,25	0,97

Tabla 11: Datos de precisión para la detección del Internal Control (control interno) usando Pf/Pv

Internal Control (control interno)	Ciclo de umbral (C _t)	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%)
Variabilidad intraensayo	26,73	0,13	0,47
Variabilidad intertest	26,90	0,21	0,76
Variabilidad interlote	26,96	0,13	0,49
Varianza total	26,89	0,17	0,63

12. Limitaciones

- Se requiere el cumplimiento estricto de las instrucciones de uso para obtener unos resultados óptimos.
- El uso de este producto se encuentra limitado al personal instruido especialmente y formado en las técnicas de PCR en tiempo real y procedimientos de diagnóstico *in vitro*.
- Unas buenas prácticas de laboratorio son esenciales para que esta prueba de valoración tenga un rendimiento adecuado. Deben extremarse las precauciones para preservar la pureza de los componentes del kit y las configuraciones de reacción. Todos los reactivos deben supervisarse

atentamente para saber si tienen impurezas y contaminación. Los reactivos sospechosos deben descartarse.

- Es necesario realizar procedimientos correctos de recolección, transporte, almacenamiento y procesamiento para que esta prueba tenga un rendimiento óptimo.
- Esta prueba de valoración no debe utilizarse directamente en la muestra. Deben llevarse a cabo métodos adecuados de extracción de ácido nucleico antes de utilizar esta prueba de valoración .
- La presencia de inhibidores de PCR (p. ej., heparina) puede provocar falsos negativos o resultados no válidos.
- Las posibles mutaciones dentro de las regiones objetivo del genoma de *Plasmodium* spp. cubiertas por los cebadores o las sondas utilizados en el kit pueden provocar fallos al detectar la presencia de los patógenos.
- Como con cualquier prueba diagnóstica, los resultados del RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 deben interpretarse teniendo en consideración todos los hallazgos clínicos y de laboratorio.

13. Control de calidad

De acuerdo con el sistema de control de calidad con certificación ISO EN 13485 de Altona Diagnostics GmbH, cada lote del RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 se somete a pruebas con especificaciones predeterminadas para asegurar la calidad consistente del producto.

14. Asistencia técnica

Si necesita ayuda al cliente, póngase en contacto con nuestro Soporte técnico:

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

Teléfono: **+49-(0)40-5480676-0**

15. Bibliografía

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

Cohen, Jonathan, Powderly, William G y Steven M Opal. Infectious Diseases, tercera edición. Mosby, 2010.

16. Marcas comerciales y aviso legal

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).

No debe considerarse que los nombres registrados, las marcas comerciales, etc., utilizados en este documento, incluso aunque no se marquen específicamente como tales, carecen de protección legal.

El RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 es un kit de diagnóstico con marcado CE conforme a la directiva europea de diagnóstico *in vitro* 98/79/EC.

Producto sin licencia de Health Canada y sin autorización ni aprobación de la FDA.

No disponible en todos los países.

© altona Diagnostics GmbH 2019; reservados todos los derechos.

17. Explicación de los símbolos

Símbolo	Explicación
	Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>
	Código de lote
	Color del tapón
	Número de catálogo
	Contenido
	Número
	Componente
	Número mundial de artículo comercial
	Consultar instrucciones de uso
	Contiene suficiente para «n» pruebas/reacciones (rxns)
	Límite de temperatura
	Fecha de vencimiento
	Fabricante
	Precaución
	Nota
	Versión

Notas:

Notas:

Notas:

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

