

Instrucciones de uso

RealStar[®]

Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0

03/2022 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 2022



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	8
5.	Información general.....	9
6.	Descripción del producto.....	11
6.1	Instrumentos de PCR en tiempo real.....	14
7.	Advertencias y precauciones	14
8.	Procedimiento	16
8.1	Preparación de las muestras	16
8.2	Preparación del Master Mix	17
8.3	Preparación de la reacción	20
9.	Programación de los instrumentos de PCR en tiempo real.....	20
9.1	Configuración	21
9.2	Detectores de fluorescencia (colorantes).....	21
9.3	Perfil de temperatura y detección de fluorescencia	22
10.	Análisis de datos.....	22
10.1	Validez de las series de pruebas diagnósticas	23
10.1.1	Serie válida de pruebas diagnósticas (cualitativa).....	23
10.1.2	Serie no válida de pruebas diagnósticas (cualitativa).....	23
10.2	Interpretación de los resultados	24
10.2.1	Análisis cualitativo.....	24
11.	Evaluación de rendimiento	26

11.1	Sensibilidad analítica	26
11.2	Especificidad analítica.....	30
11.3	Precisión	31
11.4	Evaluación del diagnóstico	33
12.	Limitaciones	36
13.	Control de calidad.....	37
14.	Asistencia técnica.....	37
15.	Bibliografía	37
16.	Marcas comerciales y aviso legal.....	38
17.	Explicación de los símbolos	39

1. Uso indicado

El Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 de RealStar® es una prueba de diagnóstico *in vitro* que se basa en tecnología PCR en tiempo real, para la detección cualitativa y la diferenciación 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 ensayos de PCR diferentes con 48 reacciones cada uno. Incluye dos controles positivos diferentes: uno para el sistema de amplificación y detección específico de *Plasmodium (P.) knowlesi*, *P. malariae* y *P. ovale* y otro para el sistema de amplificación y detección específico de *P. falciparum* y *P. vivax*.

Tabla 1: Componentes del kit

Color de la tapa	Componente	Número de viales	Volumen [µl/vial]
Azul	Master A Pk/Pm/Po ¹⁾	4	60
Azul claro	Master A Pf/Pv ²⁾	4	60
Violeta	Master B Pk/Pm/Po ¹⁾	4	180
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*

Internal Control = control interno

Positive Control = control positivo

Water (PCR grade) = agua indicada para PCR

3. Almacenamiento

- El kit 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 °C 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 del producto. Los reactivos deben congelarse en alícuotas si se van a utilizar de manera intermitente.
- El almacenamiento entre +2 °C y +8 °C no debe superar un período de 2 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 (consulte el 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 mesa 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 filtro (desechables)
- Guantes sin talco (desechables)

NOTA



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



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 estos 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 3 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 5 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. En general, los síntomas más tempranos 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* de forma precisa, con el objetivo de conseguir un manejo 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 diagnósticas sensibles y específicas puede evitar una utilización innecesaria de fármacos antipalúdicos y contribuyen a una gestión de la enfermedad apropiada y rentable.

- [1] Cowman AF, Healer J, Marapana D, Marsh K (2016), Malaria: Biology and Disease. Cell. 167(3):610-624.
- [2] Organización Mundial de la Salud (2015), WHO world malaria report 2015. Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Suiza.
- [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 y Ashis Das (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., S. Viriyakosol, W. Jarra, S. Thaithong y 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, y P. Echeverria (1992), Detection of Plasmodium falciparum by polymerase chain reaction in a field study. J. Infect. Dis. 166:145-148.

6. Descripción del producto

El Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 de RealStar® es una prueba de diagnóstico *in vitro* que se basa en tecnología PCR en tiempo real, para la detección cualitativa y la diferenciación 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 kit RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 está compuesto por dos ensayos independientes, uno para ADN específico de *P. ovale*, *P. malariae* y *P. knowlesi*, y otro para ADN específico de *P. vivax* y *P. falciparum*.

Ambos ensayos 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.

La tecnología de PCR en tiempo real 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 ADN de *P. knowlesi* está marcada con el fluoróforo ROX™, la sonda específica para ADN de *P. malariae* está marcada con el fluoróforo FAM™, y la sonda específica para ADN de *P. ovale* está marcada con el fluoróforo Cy5.

Master Mix Pf/Pv: la sonda específica para ADN de *P. falciparum* está marcada con el fluoróforo FAM™, mientras que la sonda específica para ADN de *P. vivax* está marcada con el fluoróforo Cy5.

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

Utilizar sondas conectadas a colorantes distinguibles permite la detección paralela del ADN específico de *P. knowlesi*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. falciparum* y *P. vivax*, y, así como la detección del Internal Control (control interno) en los canales detectores correspondientes del instrumento de PCR en tiempo real.

La prueba consta de dos procesos en un solo ensayo 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 kit RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 se compone 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)

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

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

Internal Control = control interno

Positive Control = control positivo

Water (PCR grade) = agua indicada para PCR

El set de 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 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 de 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 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 kit RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 se ha desarrollado y validado para usarse con los siguientes instrumentos de 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 detenidamente las Instrucciones de uso antes de usar el producto.

- Antes del primer uso, compruebe el producto y sus componentes en cuanto a:
 - Integridad
 - Si el número, el tipo y el relleno están completos (véase el capítulo 2. Componentes del kit)
 - Etiquetado correcto
 - Si ha llegado congelado
- El uso de este producto se limita a personal especialmente instruido y formado en las técnicas de PCR en tiempo real y en procedimientos de diagnóstico *in vitro*.
- Las muestras siempre se deben tratar como infecciosas y/o con peligro biológico de conformidad con los procedimientos de laboratorio seguros.

- Lleve guantes protectores desechables sin polvo, una bata de laboratorio y protección ocular al manipular las muestras.
- Evite la contaminación microbiana y por nucleasa (ADNasa/ARNasa) de las muestras y de los componentes del kit.
- Use siempre puntas de pipeta desechables libres de ADNasa/ARNasa con barreras para aerosol.
- Lleve siempre guantes protectores desechables sin polvo al manipular componentes del kit.
- Use zonas de trabajo separadas y segregadas para (i) la preparación de muestras, (ii) la configuración de la reacción y (iii) las actividades de amplificación/detección. El flujo de trabajo en el laboratorio debe realizarse de forma unidireccional. Lleve siempre guantes desechables en cada zona y cámbielos antes de entrar en una zona diferente.
- Dedique los suministros y el equipo a zonas de trabajo separadas y no los mueva de una zona a otra.
- Almacene el material positivo y/o potencialmente positivo separado de todos los demás componentes del kit.
- No abra las placas o los tubos de reacción después de la amplificación para evitar la contaminación con amplicones.
- Se pueden hacer pruebas de controles adicionales de conformidad con las directrices o los requisitos de las normativas locales, estatales y/o federales o de las organizaciones acreditadoras.
- No esterilice en autoclave los tubos de reacción después del PCR, ya que esto no degradará el ácido nucleico amplificado y se corre el riesgo de contaminar la zona de laboratorio.
- No use componentes del kit cuya fecha de caducidad haya expirado.
- Deseche la muestra y los residuos del ensayo de acuerdo con las normativas de seguridad locales.

8. Procedimiento

8.1 Preparación de las muestras

El ADN extraído es el material de partida para el kit RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0.

La calidad del ADN extraído afecta de forma significativa al rendimiento de todo el sistema del test. Se recomienda comprobar que el sistema utilizado para la extracción de ácido nucleico 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)
- QIASymphony® (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 kit RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 debe validarla el usuario.

Si se usa un procedimiento de preparación de la muestra basado en columna de centrifugación que incluya tampones de lavado con etanol, se recomienda encarecidamente realizar un paso de centrifugación adicional durante 1 minuto a aprox. 17 000 x g (~13 000 rpm) utilizando un nuevo tubo colector, antes de la elución del ácido nucleico.

PRECAUCIÓN



Si su sistema de preparación de pruebas utiliza tampones 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 de la 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 Preparación del 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 kit 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 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 del IC por muestra a la mezcla de espécimen/Lysis Buffer (tampón de lisis).

- ▶ Si se añadió el IC durante el procedimiento de preparación de muestras, configure cada Master Mix (Master Mix Pk/Pm/Po y Master Mix Pf/PV) conforme al 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 Preparación de la reacción

- ▶ Pipeta 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 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 se usa al menos un control positivo (control positivo Pk/Pm/Po para Master Mix Pk/Pm/Po y control positivo Pf/Pv para Master Mix Pf/Pv) y al menos un control negativo por Master Mix y 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 centrífuga con un rotor de placa de microtitulación durante 30 segundos a aproximadamente 1000 x g (~3000 rpm).

9. Programación de los 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 kit RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 en instrumentos de PCR en tiempo real específicos, 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 del detector	Marcador	Amortiguador de la fluorescencia
ADN específico de <i>P. knowlesi</i>	Pk/Pm/Po	<i>P. knowlesi</i>	ROX™	(Ninguno)
ADN específico de <i>P. malariae</i>		<i>P. malariae</i>	FAM™	(Ninguno)
ADN específico de <i>P. ovale</i>		<i>P. ovale</i>	Cy5	(Ninguno)
ADN específico de <i>P. falciparum</i>	Pf/Pv	<i>P. falciparum</i>	FAM™	(Ninguno)
ADN específico de <i>P. vivax</i>		<i>P. vivax</i>	Cy5	(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 adquisición de colorantes:

	Fase	Repeticiones de ciclo	Obtención	Temperatura [°C]	Tiempo [min:seg]
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 kit RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 en diferentes instrumentos de 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	Canal de detección			
	ROX™	FAM™	Cy5	JOE™
Control positivo para <i>P. knowlesi</i> , <i>P. malariae</i> , <i>P. ovale</i>	+	+	+	+/-*
Control positivo para <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 2: Análisis cualitativo usando Master Mix Pk/Pm/Po

Canal de detección				Master Mix	Interpretación del resultado
ROX™	FAM™	Cy5	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> , de <i>P. malariae</i> ni de <i>P. ovale</i> .
-	-	-	-		Inhibición de PCR o fallo de reactivo. Repita el test con la muestra original o recoja y pruebe con una nueva muestra.

Tabla 3: Análisis cualitativo usando Master Mix Pf/Pv

Canal de detección				Master Mix	Interpretación del resultado
ROX™	FAM™	Cy5	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> .
	-	-	-		Inhibición de PCR o fallo de reactivo. Repita el test con la muestra original o recoja y pruebe con una nueva muestra.

* No se requiere la detección del Internal Control (control interno) en el canal de detección de JOE™ para obtener resultados positivos en el canal de detección de Cy5, FAM™ ni ROX™. Una elevada carga de ADN de *Plasmodium* spp. en la muestra puede generar una señal reducida o ausente del Internal Control (control interno).

11. Evaluación de rendimiento

Se realizó una evaluación del rendimiento del kit RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 usando productos de PCR cuantificados y ADN genómico de *Plasmodium* species.

11.1 Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica del kit 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 una serie de dilución de productos de PCR específicos de *Plasmodium* (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, y *P. knowlesi*).

Tabla 4: 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/μl]	Número de repeticiones	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 5: 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 repeticiones	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 6: 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 repeticiones	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 7: 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/μl]	Número de repeticiones	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 8: 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/μl]	Número de repeticiones	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 kit RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 se determinó mediante análisis de probit:

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

11.2 Especificidad analítica

La especificidad analítica del kit 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 *Plasmodium*.

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

- Virus 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*

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

11.3 Precisión

La precisión del kit RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 se determinó como variabilidad intraensayo (variabilidad dentro de un experimento), variabilidad interensayo (variabilidad entre diferentes experimentos) y variabilidad interlote (variabilidad entre diferentes lotes de producción). Se calculó la variabilidad total combinando los 3 análisis.

Los datos de variabilidad se expresan en términos de desviación estándar y coeficiente de variación. Los datos se basan en los valores de ciclo de umbral (C_t). Se analizaron al menos 6 repeticiones por muestra para la variabilidad intraensayo y la variabilidad interensayo e interlote.

Tabla 9: 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 promedio (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 interensayo	<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 10: 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 promedio (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 interensayo	<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 11: Datos de precisión para la detección del Internal Control (control interno) usando Master Mix 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 interensayo	25,64	0,27	1,05
Variabilidad interlote	25,89	0,06	0,23
Varianza total	25,72	0,25	0,97

Tabla 12: Datos de precisión para la detección del Internal Control (control interno) usando Master Mix 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 interensayo	26,90	0,21	0,76
Variabilidad interlote	26,96	0,13	0,49
Varianza total	26,89	0,17	0,63

11.4 Evaluación del diagnóstico

El kit RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 se evaluó en un estudio comparativo con PCR convencional interna [basado en Rubio *et al.* (2002) y Ta *et al.* (2014)]. Retrospectivamente, se analizaron 105 muestras de sangre entera individuales:

- 75 muestras de sangre entera de pacientes que previamente dieron positivo en *Plasmodium* spp. patogénico humano
- 15 muestras de sangre entera de pacientes individuales que previamente dieron negativo en *Plasmodium* spp. patogénico humano
- 15 muestras de sangre entera de pacientes individuales que previamente dieron positivo en otros parásitos distintos de *Plasmodium* spp. patogénico humano que provocan enfermedades con síntomas similares al paludismo

El kit RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 se usó en una PCR convencional interna [basado en Rubio *et al.* (2002) y Ta *et al.* (2014)] en combinación con el kit QIAamp® DNA Blood Mini QIAcube® Kit (QIAGEN) y con QIAcube® (QIAGEN).

Para el análisis cualitativo se excluyeron todas las muestras con un resultado no válido para uno o ambos ensayos.

Los resultados para las 105 muestras restantes figuran en la tabla 13.

Tabla 13: Resultados de la evaluación de la sensibilidad y la especificidad del diagnóstico para *Plasmodium* spp. en muestras de sangre entera

		PCR convencional interna [basado en Rubio <i>et al.</i> (2002) y Ta <i>et al.</i> (2014)]	
		POSITIVO	NEGATIVO
RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0	POSITIVO	74	0
	NEGATIVO	1	30

La sensibilidad y la especificidad de diagnóstico del kit RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 en comparación con la PCR convencional interna [basado en Rubio *et al.* (2002) y Ta *et al.* (2014)] fueron del 98,67 % (intervalo de confianza: 92,79 % a 99,97 %) y del 100,00 % (intervalo de confianza: 88,43 % a 100,00 %), respectivamente.

Los resultados para la evaluación de la tipificación para *Plasmodium* spp. en muestras de sangre entera se muestran en la tabla 14.

Tabla 14: Resultados para la evaluación de la tipificación para *Plasmodium* spp. en muestras de sangre entera

		PCR convencional interna [basado en Rubio <i>et al.</i> (2002) y Ta <i>et al.</i> (2014)]						
		<i>P. falci- parum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. mala- riae</i>	<i>P. ovale</i>	<i>P. knowlesi</i>	Negativo	TOTAL
RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0	<i>P. falci- parum</i>	15	0	0	0	0	0	15
	<i>P. vivax</i>	0	14	0	0	0	0	14
	<i>P. mala- riae</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
	Negativo	0	1	0	0	0	30	31
	TOTAL	15	15	15	15	15	30	105

Los resultados de la tabla 14 muestran que, con la excepción de una muestra, los resultados del kit RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 y el ensayo de referencia fueron 100 % idénticos con respecto a la identificación del tipo de *Plasmodium* spp.

12. Limitaciones

- Se requiere el cumplimiento estricto de las instrucciones de uso para obtener unos resultados óptimos.
- El uso de este producto se limita a personal especialmente instruido y formado en las técnicas de PCR en tiempo real y en procedimientos de diagnóstico *in vitro*.
- Unas buenas prácticas de laboratorio son esenciales para que este ensayo 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 este test tenga un rendimiento óptimo.
- Este ensayo no debe utilizarse directamente en la muestra. Deben emplearse métodos apropiados de extracción del ácido nucleico antes de utilizar este ensayo.
- La presencia de inhibidores de PCR, como p. ej., heparina, puede provocar una falsos negativos o resultados no válidos.
- Las posibles mutaciones dentro de las regiones objetivo del *Plasmodium* spp. cubiertas por los cebadores o las sondas utilizados en el kit pueden provocar una o fallos al detectar la presencia del patógeno.
- Como con cualquier prueba diagnóstica, los resultados del kit 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 EN ISO 13485 de Altona Diagnostics GmbH, cada lote del kit 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:

email: 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. 10ª 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); 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).

Los nombres registrados, las marcas comerciales, etc. usados en este documento, incluso si no están marcados específicamente como tales, no se deben considerar privados de protección legal.











El kit 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 no aprobado ni autorizado por la FDA.

No disponible en todos los países.

© 2022 altona Diagnostics GmbH; todos los derechos reservados.

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» tests/reacciones (rxns)
	Límite de temperatura
	Fecha de vencimiento
	Fabricante
	Precaución: Destaca instrucciones o procedimientos operativos que, si no se siguen correctamente, pueden provocar lesiones personales o afectar al rendimiento del producto. Póngase en contacto con el soporte técnico de Altona Diagnostics si necesita ayuda.

Símbolo	Explicación
	Nota: Se ofrece al usuario información que es útil pero no esencial para la tarea en cuestión.
	Versión

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

