

Istruzioni per l'uso

RealStar[®]

Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0

11/2021 IT

RealStar®

Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0

Per uso 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



11 2021



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

Contenuto

1.	Usò previsto	6
2.	Componenti del kit.....	6
3.	Conservazione.....	7
4.	Materiale e dispositivi richiesti e non forniti	8
5.	Informazioni generali	9
6.	Descrizione del prodotto	11
6.1	Strumenti per PCR in tempo reale	13
7.	Avvertenze e precauzioni	14
8.	Procedura	15
8.1	Preparazione del campione	15
8.2	Preparazione della Master Mix.....	16
8.3	Preparazione della reazione	18
9.	Programmazione dello strumento PCR in tempo reale	19
9.1	Impostazioni	19
9.2	Sonde fluorescenti (coloranti)	19
9.3	Profilo termico e acquisizione dei coloranti	20
10.	Analisi dei dati.....	20
10.1	Validità dei test diagnostici	21
10.1.1	Test diagnostico valido (qualitativo)	21
10.1.2	Test diagnostico invalido (qualitativo).....	21
10.2	Interpretazione dei risultati	22
10.2.1	Analisi qualitativa	22
11.	Dati di performance	23

11.1	Sensibilità analitica.....	23
11.2	Specificità analitica.....	27
11.3	Precisione	28
11.4	Valutazione diagnostica	30
12.	Limitazioni	33
13.	Controllo di qualità	34
14.	Assistenza tecnica	34
15.	Letteratura	34
16.	Marchi e brevetti.....	35
17.	Spiegazione dei simboli	36

1. Uso previsto

Il RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 è un test diagnostico *in vitro*, basato sulla tecnologia PCR in tempo reale per il rilevamento qualitativo e la differenziazione del DNA del patogeno umano *Plasmodium* delle specie *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum*.

2. Componenti del kit

Il kit contiene due diversi test PCR con 48 reazioni ciascuno. Il kit include due diversi Controlli Positivi: uno per il sistema specifico di amplificazione e rilevamento di *Plasmodium (P.) knowlesi*, *P. malariae* e *P. ovale* e un altro per il sistema specifico di amplificazione e rilevamento di *P. falciparum* e *P. vivax*.

Tab. 1: Componenti del kit

Colore tappo	Componente	Numero di fiale	Volume [µl/fiala]
Blu	Master A Pk/Pm/Po ¹⁾	4	60
Blu chiaro	Master A Pf/Pv ²⁾	4	60
Viola	Master B Pk/Pm/Po ¹⁾	4	180
Viola chiaro	Master B Pf/Pv ²⁾	4	180
Verde	Internal Control	1	1.000
Rosso	Positive Control Pk/Pm/Po ¹⁾	1	250
Arancione	Positive Control Pf/Pv ²⁾	1	250
Bianco	Water (PCR grade)	1	500

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

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

3. Conservazione

- Il RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 viene spedito in ghiaccio secco. I componenti del kit devono arrivare congelati. Se uno o più componenti non sono congelati al momento della ricezione o se le provette sono state danneggiate durante la spedizione, contattare Altona Diagnostics GmbH per assistenza.
- Tutti i componenti devono essere conservati tra -25 °C e -15 °C dopo l'arrivo.
- Evitare lo scongelamento e il congelamento ripetuti (più di due volte) dei reagenti Master, poiché ciò potrebbe influire sulle prestazioni del test. I reagenti devono essere congelati in aliquote, in caso di utilizzo intermittente.
- La conservazione tra +2 °C e +8 °C non deve superare un periodo di 2 ore.
- Proteggere il Master A e il Master B dalla luce.

4. Materiale e dispositivi richiesti e non forniti

- Strumento PCR in tempo reale appropriato (vedere il capitolo 6.1 Strumenti PCR in tempo reale)
- Sistema o kit di estrazione di acidi nucleici appropriato (vedere il capitolo 8.1 Preparazione del campione)
- Centrifuga da banco con rotore per provette di reazione da 2 ml
- Centrifuga con rotore per piastre per microtitolazione, se si utilizzano piastre di reazione a 96 pozzetti
- Vortex mixer
- Piastre di reazione o provette di reazione appropriate a 96 pozzetti con materiale di chiusura (ottico) corrispondente
- Pipette (regolabili)
- Puntali con filtro (monouso)
- Guanti senza polvere (monouso)

NOTA



Assicurarsi che tutti gli strumenti utilizzati siano stati installati, calibrati, controllati e sottoposti a manutenzione secondo le istruzioni e le raccomandazioni del produttore.

NOTA



Si consiglia di utilizzare il rotore a 72 pozzetti con le appropriate provette di reazione da 0,1 ml, se si utilizza il Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research) o il Rotor-Gene® Q 5/6 plex (QIAGEN).

5. Informazioni generali

La malaria è una malattia trasmessa da vettore causata da un'infezione protozoaria. I parassiti del genere *Plasmodium* vengono trasmessi ai loro ospiti vertebrati durante il pasto di sangue di una zanzara femmina infetta del genere *Anopheles*. Il ciclo vitale dei parassiti comprende un cambiamento di ospite dagli artropodi ai vertebrati ed è abbastanza complesso, ma può essere suddiviso in 3 fasi principali, basate sullo stadio di vita del parassita in zanzara, fegato umano e sangue umano. Sono 5 le specie note di *Plasmodium* patogene per l'uomo, più precisamente *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium vivax* e *Plasmodium malariae* [1].

La malaria si presenta con diverse manifestazioni a seconda della specie infettante di *Plasmodium*. In generale, i sintomi più precoci di malaria sono decisamente aspecifici; febbre, cefalea, debolezza generale, mialgia, brividi, capogiro, dolore addominale, diarrea, nausea e vomito. *P. falciparum* e *P. knowlesi* sono in grado di causare una grave forma di malaria nell'essere umano [2,3]. *P. falciparum* è responsabile di un tasso annuale di letalità superiore al 90 %, soprattutto nei bambini [2].

P. knowlesi passa attraverso una breve fase eritrocitaria (24 ore) durante la quale si riproduce rapidamente [4]. L'iperparassitemia risultante può causare complicazioni potenzialmente fatali come l'insufficienza multiorgano o il decesso del paziente. Fino allo sviluppo di un test basato su PCR specifico per *P. knowlesi*, quest'ultimo spesso veniva erroneamente diagnosticato come *P. malariae* a causa di similitudini fenotipiche o come *P. vivax* sulla base delle similitudini genetiche [5].

Sebbene sia considerato come un parassita benigno, *P. vivax* causa manifestazioni cliniche invalidanti e complicazioni potenzialmente fatali come grave anemia, trombocitopenia e pericolosi parossismi [6].

A causa della sua febbre terzana, l'infezione causata da *P. ovale* viene spesso scambiata per un'infezione da *P. vivax*. Le infezioni causate da questi due parassiti presentano sintomi simili e sono trattate in modo simile; l'unica differenza è la potenziale gravità dell'infezione da *P. vivax*. Inoltre, le infezioni da *P. ovale* e *P. vivax* sono caratterizzate da ripetute recidive debilitanti causate dagli ipnozoiti dormienti che persistono negli epatociti perfino dopo clearance dei parassiti [1].

Le infezioni da *P. malariae* sono caratterizzate da una bassa parassitemia e una malattia dal decorso lieve.

Il gold standard per la diagnosi della malaria è l'analisi al microscopio di strisci ematici sottili o spessi con colorazione di Giemsa [7]. Inoltre, sono comunemente usati i test diagnostici rapidi, raccomandati anche dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS). Tuttavia, la sensibilità e specificità di questi metodi di test sono ampiamente limitate e la differenziazione delle specie di *Plasmodium* è difficile con entrambe queste tecniche [8]. Per un'efficace gestione e controllo della malattia vi è un'ovvia necessità di strumenti di diagnosi più sensibili che siano anche rapidi, accurati e che permettano una tipizzazione accurata delle specie di *Plasmodium*. Le tecniche molecolari come la PCR in tempo reale stanno diventando sempre più comuni perché sono alternative più sensibili, affidabili [9,10] e facili da usare rispetto al gold standard. Test diagnostici sensibili e specifici utilizzati in modo corretto possono evitare l'utilizzo superfluo di farmaci antimalarici e contribuire a una gestione appropriata e costo-efficace della malattia.

- [1] Cowman AF, Healer J, Marapana D, Marsh K (2016), Malaria: Biology and Disease. Cell. 167(3):610-624.
- [2] World Health Organization (2015), WHO world malaria report 2015. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- [3] Cox-Singh J, Davis TM, Lee KS, Shamsul SS, Matusop A, Ratnam S, Rahman HA, Conway DJ, Singh B (2008), Plasmodium knowlesi 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 e 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 e Ashis Das (2005), *Plasmodium vivax* Malaria. *Emerg Infect Dis*. 11(1):132-134.
- [7] Warhurst, D. C. e J. E. Williams (1996), Laboratory diagnosis of malaria. *J. Clin. Pathol*. 49:533-538.
- [8] World Health Organization (2000), WHO/MAL/2000.1091. New perspectives in malaria diagnosis. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- [9] Snounou, G., S. Viriyakosol, W. Jarra, S. Thaithong e 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 e P. Echeverria (1992), Detection of *Plasmodium falciparum* by polymerase chain reaction in a field study. *J. Infect. Dis*. 166:145-148.

6. Descrizione del prodotto

Il RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 è un test diagnostico *in vitro*, basato sulla tecnologia PCR in tempo reale per il rilevamento qualitativo e a differenziazione del DNA del patogeno umano *Plasmodium* delle specie *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum*.

Il RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 è costituito da due test indipendenti, uno che mira a DNA specifico di *P. ovale*, *P. malariae* e *P. knowlesi* e un altro che mira a DNA specifico di *P. vivax* e *P. falciparum*.

Entrambi i test includono un sistema di amplificazione eterologa (controllo interno) per identificare la possibile inibizione della PCR e confermare l'integrità dei reagenti.

La tecnologia PCR in tempo reale utilizza la reazione a catena della polimerasi (PCR) per l'amplificazione di sequenze target specifiche e sonde target specifiche per la rilevazione del DNA amplificato. Le sonde sono etichettate con coloranti fluorescenti.

Master Mix Pk/Pm/Po: La sonda specifica per il DNA di *P. knowlesi* è etichettata con il fluoroforo ROX™, la sonda specifica per il DNA di *P. malariae* è etichettata con il fluoroforo FAM™, e la sonda specifica per il DNA di *P. ovale* è etichettata con il fluoroforo Cy5.

Master Mix Pf/Pv: La sonda specifica per il DNA di *P. falciparum* è etichettata con il fluoroforo FAM™, e la sonda specifica per il DNA di *P. vivax* è etichettata con il fluoroforo Cy5.

La sonda specifica per il controllo interno (IC) è marcata con il fluoroforo JOE™.

L'uso di sonde collegate a coloranti distinguibili consente il rilevamento in parallelo del DNA specifico di *P. knowlesi*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. falciparum* e *P. vivax*, nonché il rilevamento del controllo interno nei corrispondenti canali di rilevamento dello strumento PCR in tempo reale.

Il test consiste in due processi in un'unica provetta:

- Amplificazione per PCR del DNA target e del controllo interno
- Rilevamento simultaneo di ampliconi di PCR mediante sonde marcate con colorante fluorescente

Il RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 è composto da:

- Master A Pk/Pm/Po¹⁾
- Master A Pf/Pv²⁾
- Master B Pk/Pm/Po¹⁾
- Master B Pf/Pv²⁾
- Internal Control
- Positive Control Pk/Pm/Po¹⁾

- Positive Control Pf/Pv²⁾
- Water (PCR grade)

Internal Control = Controllo interno

Positive Control = Controllo positivo

Water (PCR grade) = Acqua (testata per PCR)

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

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

I set Master A e Master B Pk/Pm/Po contengono tutti i componenti (tampone per PCR, DNA polimerasi, sali di magnesio, primer e sonde) per consentire l'amplificazione mediata da PCR e il rilevamento di DNA specifico di *P. knowlesi*, *P. malariae* e *P. ovale* e del controllo interno in una singola reazione.

I set Master A e Master B Pf/Pv contengono tutti i componenti (tampone per PCR, DNA polimerasi, sali di magnesio, primer e sonde) per consentire l'amplificazione mediata da PCR e il rilevamento di DNA specifico di *P. falciparum* e *P. vivax* e del controllo interno in una singola reazione.

6.1 Strumenti per PCR in tempo reale

Il kit RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 è stato sviluppato e validato per essere utilizzato con i seguenti strumenti di PCR in tempo reale:

- 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. Avvertenze e precauzioni

Leggere attentamente le istruzioni per l'uso prima di utilizzare il prodotto.

- Prima del primo utilizzo, controllare il prodotto e i suoi componenti per:
 - Integrità
 - Completezza rispetto a numero, tipo e riempimento (vedere il capitolo 2. Componenti del kit)
 - Etichette corrette
 - Congelamento all'arrivo
- L'utilizzo di questo prodotto è limitato al personale appositamente istruito e addestrato nelle tecniche di PCR in tempo reale e procedure diagnostiche *in vitro*.
- I campioni devono essere sempre trattati come infettivi e/o pericolosi secondo le procedure di laboratorio sicure.
- Indossare guanti protettivi monouso senza polvere, un camice da laboratorio e una protezione per gli occhi durante la manipolazione dei campioni.
- Evitare la contaminazione microbica e nucleasica (DNasi/RNasi) dei campioni e dei componenti del kit.
- Utilizzare sempre puntali per pipette monouso privi di DNasi/RNasi.
- Indossare sempre guanti protettivi usa e getta senza polvere quando si maneggiano i componenti del kit.
- Utilizzare aree di lavoro separate e isolate per (i) preparazione del campione, (ii) impostazione della reazione e (iii) attività di amplificazione/rilevazione. Il flusso di lavoro in laboratorio dovrebbe procedere in modo unidirezionale. Indossare sempre guanti monouso in ogni area e cambiarli prima di entrare in un'altra area.
- Dedicare materiali di consumo e attrezzature alle aree di lavoro separate e non spostarle da un'area all'altra.
- Conservare il materiale positivo e/o potenzialmente positivo separato da tutti gli altri componenti del kit.

- Non aprire le provette/piastre di reazione dopo l'amplificazione, per evitare contaminazione con ampliconi.
- Controlli aggiuntivi possono essere testati secondo le linee guida o i requisiti delle normative locali, statali e/o federali o delle organizzazioni di accreditamento.
- Non sterilizzare in autoclave le provette dopo la PCR, poiché ciò non distrugge gli acidi nucleici amplificati e rischierà di contaminare l'area di laboratorio.
- Non utilizzare componenti del kit che hanno superato la data di scadenza.
- Eliminare i rifiuti dei campioni e del test in base alle normative di sicurezza locali.

8. Procedura

8.1 Preparazione del campione

L'DNA estratto è il materiale di partenza per il kit RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0.

La qualità dell'DNA estratto ha un profondo impatto sulle prestazioni dell'intero saggio. È necessario garantire che il sistema utilizzato per l'estrazione dell'acido nucleico sia compatibile con la tecnologia PCR in tempo reale. I seguenti kit e sistemi sono indicati per l'estrazione dell'acido 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)

Potrebbero anche essere appropriati sistemi e kit di estrazione alternativi. L'idoneità della procedura di estrazione dell'acido nucleico per l'uso con il kit RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 deve essere convalidata dall'utente.

Se si utilizza una procedura di preparazione del campione basata su colonna di centrifugazione che include tamponi di lavaggio contenenti etanolo, si consiglia di effettuare un'ulteriore fase di centrifugazione per 1 minuto a circa 17.000 x g (~ 13.000 rpm), usando una nuova provetta di raccolta, prima dell'eluizione dell'acido nucleico.

ATTENZIONE



Se il sistema di preparazione dei campioni utilizza tamponi di lavaggio contenenti etanolo, assicurarsi di eliminare eventuali tracce di etanolo prima dell'eluizione dell'acido nucleico. L'etanolo è un forte inibitore della PCR in tempo reale.

ATTENZIONE



L'uso dell'RNA carrier è fondamentale per l'efficienza di estrazione e la stabilità dell'acido nucleico estratto.

Per ricevere ulteriori informazioni e assistenza tecnica riguardanti pre-trattamento e preparazione dei campioni contattare il nostro servizio di assistenza tecnica (vedere il capitolo 14. Assistenza tecnica).

8.2 Preparazione della Master Mix

Tutti i reagenti e i campioni devono essere completamente scongelati, miscelati (mediante pipettaggio o passaggio delicato su un agitatore vortex) e centrifugati brevemente prima dell'uso.

Il kit RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 contiene un controllo interno (IC) eterologo, che può essere utilizzato come controllo di inibizione della PCR o come controllo della procedura di preparazione del campione (estrazione dell'acido nucleico) e come controllo di inibizione della PCR.

- ▶ Se l'IC viene utilizzato come controllo di inibizione della PCR, ma non come controllo della procedura di preparazione del campione, impostare ogni Master Mix (Master Mix Pk/Pm/Po e Master Mix Pf/Pv) secondo il seguente schema:

Numero di reazioni (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Controllo interno	1 µl	12 µl
Volume Master Mix	21 µl	252 µl

- ▶ Se l'IC viene utilizzato come controllo per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR, aggiungere l'IC durante la procedura di estrazione dell'acido nucleico.
- ▶ Indipendentemente dal metodo/sistema utilizzato per l'estrazione dell'acido nucleico, l'IC **non deve** essere aggiunto direttamente al campione. L'IC deve essere sempre aggiunto alla miscela campione/tampone di lisi. Il volume dell'IC da aggiungere dipende sempre e soltanto dal volume di eluizione. Rappresenta il 10% del volume di eluizione. Ad esempio, se l'acido nucleico deve essere eluito in 60 µl di tampone di eluizione o acqua, devono essere aggiunti 6 µl di IC per campione nella miscela campione/tampone di lisi.
- ▶ Se l'IC è stato aggiunto durante la procedura di preparazione del campione, preparare ogni Master Mix (Master Mix Pk/Pm/Po e Master Mix Pf/PV) secondo il seguente schema di pipettatura:

Numero di reazioni (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Volume Master Mix	20 µl	240 µl

ATTENZIONE

Se l'Internal Control (controllo interno) è stato aggiunto durante la procedura di preparazione del campione, almeno il controllo negativo deve includere l'Internal Control (controllo interno).

ATTENZIONE

Indipendentemente dal metodo/sistema utilizzato per l'estrazione dell'acido nucleico, non aggiungere mai l'Internal Control (controllo interno) direttamente al campione.

8.3 Preparazione della reazione

- ▶ Pipettare 20 µl di Master Mix in ciascuno dei pozzetti richiesti di un'appropriata piastra di reazione ottica a 96 pozzetti o di un'appropriata provetta di reazione ottica.
- ▶ Aggiungere 10 µl di campione (eluato dall'estrazione dell'acido nucleico) o 10 µl del controllo (controllo positivo o negativo).

Preparazione della reazione	
Master Mix	20 µl
Campione o controllo	10 µl
Volume totale	30 µl

- ▶ Assicurarsi che sia usato almeno un Controllo Positivo (Controllo Positivo Pk/Pm/Po per Master Mix Pk/Pm/Po e Controllo Positivo Pf/Pv per Master Mix Pf/Pv) e almeno un Controllo Negativo per Master Mix e test.
- ▶ Miscelare accuratamente i campioni e i controlli con la Master Mix pipettando su e giù.
- ▶ Chiudere la piastra di reazione a 96 pozzetti con tappi o pellicola adesiva ottica adeguati e le provette di reazione con tappi appropriati.
- ▶ Centrifugare la piastra di reazione a 96 pozzetti in una centrifuga con rotore per piastra di microtitolazione per 30 secondi a circa 1.000 x g (~ 3.000 rpm).

9. Programmazione dello strumento PCR in tempo reale

Per informazioni di base sull'impostazione e la programmazione dei diversi strumenti PCR in tempo reale, consultare il manuale utente del rispettivo strumento.

Per istruzioni dettagliate sulla programmazione dell'utilizzo del kit RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 su specifici strumenti PCR in tempo reale, contattare il nostro supporto tecnico (vedere il capitolo 14. Assistenza tecnica).

9.1 Impostazioni

- Definire i seguenti parametri:

Impostazioni	
Volume di reazione	30 µl
Ramp Rate	Default
Passive Reference	Nessuno

9.2 Sonde fluorescenti (coloranti)

- Definire le seguenti sonde fluorescenti (coloranti):

Target	Master Mix	Nome sonda	Reporter	Quencher
DNA specifico di <i>P. knowlesi</i>	Pk/Pm/Po	<i>P. knowlesi</i>	ROX™	(Nessuno)
DNA specifico di <i>P. malariae</i>		<i>P. malariae</i>	FAM™	(Nessuno)
DNA specifico di <i>P. ovale</i>		<i>P. ovale</i>	Cy5	(Nessuno)
DNA specifico di <i>P. falciparum</i>	Pf/Pv	<i>P. falciparum</i>	FAM™	(Nessuno)
DNA specifico di <i>P. vivax</i>		<i>P. vivax</i>	Cy5	(Nessuno)
Controllo interno	Pk/Pm/Po e Pf/Pv	IC	JOE™	(Nessuno)

9.3 Profilo termico e acquisizione dei coloranti

- Impostare il profilo della temperatura e l'acquisizione del colorante:

	Stadio	Ripetizioni del ciclo	Acquisizione	Temperatura [°C]	Tempo [min:sec]
Denaturazione	Hold	1	-	95	02:00
Amplificazione	Cycling	45	-	95	00:15
			si	58	00:45
			-	72	00:15

10. Analisi dei dati

Per informazioni di base sull'analisi dei dati su specifici strumenti PCR in tempo reale, consultare il manuale utente del rispettivo strumento.

Per istruzioni dettagliate sull'analisi dei dati generati con il kit RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 su diversi strumenti PCR in tempo reale, contattare il nostro supporto tecnico (vedere il capitolo 14. Assistenza tecnica).

10.1 Validità dei test diagnostici

10.1.1 Test diagnostico valido (qualitativo)

Un test diagnostico **qualitativo** è **valido** se sono soddisfatte le seguenti condizioni di controllo:

Controllo	Canale			
	ROX™	FAM™	Cy5	JOE™
Controllo positivo <i>P. knowlesi</i> , <i>P. malariae</i> , <i>P. ovale</i>	+	+	+	+/-*
Controllo positivo <i>P. falciparum</i> , <i>P. vivax</i>	-	+	+	+/-*
Controllo negativo	-	-	-	+

* La presenza o l'assenza di un segnale nel canale JOE™ non è rilevante per la validità dell'esecuzione del test.

10.1.2 Test diagnostico invalido (qualitativo)

Un test diagnostico **qualitativo non è valido**, (i) se l'esecuzione non è stata completata o (ii) se una delle condizioni di controllo per un test diagnostico **valido** non è soddisfatta.

In caso di test diagnostici **non validi** ripetere i test utilizzando gli acidi nucleici purificati rimanenti o ricominciare dai campioni originali.

10.2 Interpretazione dei risultati

10.2.1 Analisi qualitativa

Tab. 2: Analisi quantitativa usando Master Mix Pk/Pm/Po

Canale				Master Mix	Interpretazione dei risultati
ROX™	FAM™	Cy5	JOE™		
+	+	+	+	Pk/Pm/ Po	Rilevato DNA specifico di <i>P. knowlesi</i> , <i>P. malariae</i> e <i>P. ovale</i> .
+	-	-	+		Rilevato DNA specifico di <i>P. knowlesi</i>
-	+	-	+		Rilevato DNA specifico di <i>P. malariae</i>
-	-	+	+		Rilevato DNA specifico di <i>P. ovale</i>
+	+	-	+		Rilevato DNA specifico di <i>P. knowlesi</i> e <i>P. malariae</i> .
+	-	+	+		Rilevato DNA specifico di <i>P. knowlesi</i> e <i>P. ovale</i> .
-	+	+	+		Rilevato DNA specifico di <i>P. malariae</i> e <i>P. ovale</i> .
-	-	-	+		Non rilevato DNA specifico di <i>P. knowlesi</i> né di <i>P. malariae</i> né di <i>P. ovale</i> .
-	-	-	-		Inibizione della PCR o guasto del reagente. Ripetere i test dal campione originale o raccogliere e testare un nuovo campione.

Tab. 3: Analisi quantitativa usando Master Mix Pf/Pv

Canale				Master Mix	Interpretazione dei risultati
ROX™	FAM™	Cy5	JOE™		
N/A	+	+	+*	Pf/Pv	Rilevato DNA specifico di <i>P. falciparum</i> e <i>P. vivax</i> .
	+	-	+*		Rilevato DNA specifico di <i>P. falciparum</i> .
	-	+	+*		Rilevato DNA specifico di <i>P. vivax</i> .
	-	-	+		Non rilevato DNA specifico di <i>P. falciparum</i> né di <i>P. vivax</i> .
	-	-	-		Inibizione della PCR o guasto del reagente. Ripetere i test dal campione originale o raccogliere e testare un nuovo campione.

* Il rilevamento del controllo interno nel canale di rilevamento JOE™ non è necessario per i risultati positivi nel canale di rilevamento Cy5, FAM™ o ROX™. Un'elevata carica di DNA di *Plasmodium* spp. nel campione può portare a un segnale del controllo interno ridotto o assente.

11. Dati di performance

La valutazione della performance del RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 è stata effettuata utilizzando prodotti PCR quantificati e DNA genomico di Specie *Plasmodium*.

11.1 Sensibilità analitica

La sensibilità analitica del RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 è definita come la concentrazione (copie/μl dell'eluato) di molecole di DNA specifiche di *Plasmodium* che possono essere rilevate con un tasso di positività del 95%. La sensibilità analitica è stata determinata con l'analisi delle serie di diluizione dei prodotti PCR specifici di *Plasmodium* (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* e *P. knowlesi*).

Tab. 4: Risultati della PCR utilizzati per il calcolo della sensibilità analitica rispetto al rilevamento del DNA specifico di *P. falciparum*

Conc. input [copie/μl]	Numero di replicati	Numero di positivi	Hit Rate [%]
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

Tab. 5: Risultati della PCR utilizzati per il calcolo della sensibilità analitica rispetto al rilevamento del DNA specifico di *P. vivax*

Conc. input [copie/μl]	Numero di replicati	Numero di positivi	Hit Rate [%]
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

Tab. 6: Risultati della PCR utilizzati per il calcolo della sensibilità analitica rispetto al rilevamento del DNA specifico di *ova1e*

Conc. input [copie/μl]	Numero di replicati	Numero di positivi	Hit Rate [%]
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

Tab. 7: Risultati della PCR utilizzati per il calcolo della sensibilità analitica rispetto al rilevamento del DNA specifico di *P. malariae*

Conc. input [copie/μl]	Numero di replicati	Numero di positivi	Hit Rate [%]
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

Tab. 8: Risultati della PCR utilizzati per il calcolo della sensibilità analitica rispetto al rilevamento del DNA specifico di *P. knowlesi*

Conc. input [copie/μl]	Numero di replicati	Numero di positivi	Hit Rate [%]
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 sensibilità analitica del kit RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 è stata determinata dall'analisi probit:

- Per il rilevamento del DNA specifico di *P. falciparum*, la sensibilità analitica è di 0,80 copie/μl di eluato [Intervallo di confidenza del 95% (IC): da 0,44 a 2,45 copie/μl]
- Per il rilevamento del DNA specifico di *P. vivax*, la sensibilità analitica è di 0,73 copie/μl di eluato [Intervallo di confidenza del 95% (IC): da 0,46 a 1,62 copie/μl]
- Per il rilevamento di DNA specifico di *P. ovale*, la sensibilità analitica è di 1,46 copie/μl di eluato [Intervallo di confidenza del 95% (IC): da 0,89 a 3,28 copie/μl]
- Per il rilevamento del DNA specifico di *P. malariae*, la sensibilità analitica è di 0,36 copie/μl di eluato [Intervallo di confidenza del 95% (IC): da 0,24 a 0,74 copie/μl]

- Per il rilevamento del DNA specifico di *P. knowlesi*, la sensibilità analitica è di 2,35 copie/μl di eluato [Intervallo di confidenza del 95% (IC): da 1,37 a 5,55 copie/μl]

11.2 Specificità analitica

La specificità analitica del RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 è stata valutata analizzando un pannello di RNA/DNA genomico estratto da patogeni correlati a *Plasmodium* e ad altri patogeni che causano sintomi simili al *Plasmodium*.

Il RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 non ha reagito in modo incrociato con nessuno dei seguenti patogeni:

- Virus Chikungunya
- Virus Dengue
- Influenzavirus A
- Influenzavirus B
- West Nile virus
- *Babesia microti*
- *Leishmania donovani*
- *Leishmania infantum*
- *Leishmania major*
- *Toxoplasma gondii*
- *Trypanosoma brucei*
- *Trypanosoma cruzi*

Per dimostrare che il RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 è in grado di rilevare e differenziare correttamente il DNA di *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. knowlesi*, *P. malariae* e *P. ovale*, il DNA genomico delle cinque specie di *Plasmodium* è stato testato usando un sistema di rilevamento CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) per l'analisi PCR in tempo reale. Ogni campione è risultato positivo per il DNA specifico delle rispettive specie di *Plasmodium* ma negativo per le altre quattro specie di *Plasmodium*.

11.3 Precisione

La precisione del RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 è stata determinata come variabilità intra-dosaggio (variabilità all'interno di un esperimento), variabilità inter-dosaggio (variabilità tra esperimenti diversi) e variabilità inter-lotto (variabilità tra lotti di produzione diversi). La variabilità totale è stata calcolata combinando le 3 analisi.

I dati di variabilità sono espressi in termini di deviazione standard e coefficiente di variazione. I dati sono basati sui valori del ciclo soglia (C_t). Almeno 6 replicati per campione sono stati analizzati per la variabilità intra-dosaggio, inter-dosaggio e inter-lotto.

Tab. 9: Dati di precisione per il rilevamento di DNA specifico di *P. ovale*, *P. malariae* e *P. knowlesi*

<i>P. ovale</i> , <i>P. malariae</i> e <i>P. knowlesi</i>		Ciclo soglia medio (C_t)	Deviazione standard	Coefficiente di variazione (%)
Variabilità intra-dosaggio	<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
Variabilità inter-dosaggio	<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
Variabilità inter-lotto	<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
Variabilità totale	<i>P. malariae</i>	31,92	0,16	0,51
	<i>P. ovale</i>	30,27	0,10	0,32
	<i>P. knowlesi</i>	30,48	0,15	0,49

Tab. 10: Dati di precisione per il rilevamento di DNA specifico di *P. falciparum* e *P. vivax*

<i>P. falciparum</i> e <i>P. vivax</i>		Ciclo soglia medio (C_t)	Deviazione standard	Coefficiente di variazione (%)
Variabilità intra-dosaggio	<i>P. falciparum</i>	31,72	0,11	0,35
	<i>P. vivax</i>	31,71	0,26	0,82
Variabilità inter-dosaggio	<i>P. falciparum</i>	31,38	0,37	0,14
	<i>P. vivax</i>	31,57	0,24	0,77
Variabilità inter-lotto	<i>P. falciparum</i>	31,42	0,33	1,04
	<i>P. vivax</i>	31,09	0,40	1,27
Variabilità totale	<i>P. falciparum</i>	31,29	0,33	1,04
	<i>P. vivax</i>	31,30	0,46	1,46

Tab. 11: Dati di precisione per il rilevamento del Controllo interno usando il Master Mix per Pk/Pm/Po

Controllo interno	Ciclo soglia (C_t)	Deviazione standard	Coefficiente di variazione (%)
Variabilità intra-dosaggio	25,88	0,07	0,29
Variabilità inter-dosaggio	25,64	0,27	1,05
Variabilità inter-lotto	25,89	0,06	0,23
Varianza totale	25,72	0,25	0,97

Tab. 12: Dati di precisione per il rilevamento del Controllo interno usando il Master Mix per Pf/Pv

Controllo interno	Ciclo soglia (C_t)	Deviazione standard	Coefficiente di variazione (%)
Variabilità intra-dosaggio	26,73	0,13	0,47
Variabilità inter-dosaggio	26,90	0,21	0,76
Variabilità inter-lotto	26,96	0,13	0,49
Varianza totale	26,89	0,17	0,63

11.4 Valutazione diagnostica

Il RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 è stato valutato in uno studio comparativo con PCR convenzionale interna [sulla base di Rubio *et al.* (2002) e Ta *et al.* (2014)]. Sono stati analizzati retrospettivamente 105 campioni singoli di sangue intero:

- 75 campioni di sangue intero da pazienti già risultati positivi per il patogeno umano *Plasmodium* spp.
- 15 campioni di sangue intero da singoli pazienti già risultati negativi per il patogeno umano *Plasmodium* spp.
- 15 campioni di sangue intero da singoli pazienti già risultati positivi per altri parassiti diversi dal patogeno umano *Plasmodium* spp. e che causano patologie con sintomi simili a quelli della malaria

Il RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 e la PRC convenzionale interna [sulla base di Rubio *et al.* (2002) e Ta *et al.* (2014)] sono stati usati in combinazione con il kit QIAamp® DNA Blood Mini QIAcube® Kit (QIAGEN) e il QIAcube® (QIAGEN).

Per l'analisi qualitativa sono stati esclusi tutti i campioni con un risultato non valido per uno o entrambi i saggi.

I risultati dei 105 campioni restanti vengono mostrati nella Tabella 13.

Tab. 13: Risultati della valutazione di sensibilità e specificità diagnostica per *Plasmodium* spp. in campioni di sangue intero

		PCR convenzionale interna [sulla base di Rubio <i>et al.</i> (2002) e Ta <i>et al.</i> (2014)]	
		POSITIVO	NEGATIVO
RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0	POSITIVO	74	0
	NEGATIVO	1	30

Sensibilità e specificità diagnostica del RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 rispetto alla PCR convenzionale interna [sulla base di Rubio *et al.* (2002) e Ta *et al.* (2014)] erano rispettivamente del 98,67% (intervallo di confidenza: da 92,79% a 99,97%) e del 100,00% (intervallo di confidenza: da 88,43% a 100,00%).

I risultati della valutazione della tipizzazione di *Plasmodium* spp. in campioni di sangue intero vengono mostrati nella Tabella 14.

Tab. 14: Risultati della valutazione della tipizzazione di *Plasmodium* spp. in campioni di sangue intero

		PCR convenzionale interna [sulla base di Rubio <i>et al.</i> (2002) e Ta <i>et al.</i> (2014)]						
		<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. ovale</i>	<i>P. knowlesi</i>	Negativo	TOTALE
RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0	<i>P. falciparum</i>	15	0	0	0	0	0	15
	<i>P. vivax</i>	0	14	0	0	0	0	14
	<i>P. malariae</i>	0	0	15	0	0	0	15
	<i>P. ovale</i>	0	0	0	15	0	0	15
	<i>P. knowlesi</i>	0	0	0	0	15	0	15
	Negativo	0	1	0	0	0	30	31
	TOTALE	15	15	15	15	15	30	105

I risultati della Tabella 14 mostrano che con l'eccezione di un campione, i risultati del RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 e il saggio di riferimento erano identici al 100% per quanto riguarda l'identificazione del tipo di *Plasmodium* spp..

12. Limitazioni

- Per risultati ottimali è richiesta la rigorosa osservanza delle istruzioni per l'uso.
- L'utilizzo di questo prodotto è limitato al personale appositamente istruito e addestrato nelle tecniche di PCR in tempo reale e procedure diagnostiche *in vitro*.
- La buona pratica di laboratorio è essenziale per la corretta esecuzione di questo test. È necessario prestare la massima attenzione per preservare la purezza dei componenti del kit e le impostazioni di reazione. Tutti i reagenti devono essere attentamente monitorati per impurità e contaminazione. Eventuali reagenti sospetti devono essere eliminati.
- Per l'esecuzione ottimale di questo test sono necessarie adeguate procedure di raccolta, trasporto, conservazione ed elaborazione dei campioni.
- Questo test non deve essere utilizzato direttamente sul campione. Prima di utilizzare questo test, devono essere condotti appropriati metodi di estrazione dell'acido nucleico.
- La presenza di inibitori della PCR (ad es. eparina) può causare risultati falsi negativi o non validi.
- Le potenziali mutazioni all'interno delle regioni target del genoma di *Plasmodium* spp. coperte dai primer e/o dalle sonde utilizzate nel kit possono causare una il mancato rilevamento della presenza dei patogeni.
- Come con qualsiasi test diagnostico, i risultati del kit RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 devono essere interpretati in considerazione di tutti i risultati clinici e di laboratorio.

13. Controllo di qualità

In conformità con il sistema di gestione della qualità certificato EN ISO 13485 di Altona Diagnostics GmbH, ogni lotto di kit RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 è testato in base a specifiche prestabilite per garantire una qualità costante del prodotto.

14. Assistenza tecnica

Per l'assistenza ai clienti, si prega di contattare il nostro supporto tecnico:

e-mail: support@altona-diagnostics.com

telefono: +49-(0)40-5480676-0

15. Letteratura

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

Cohen, Jonathan, Powderly, William G, and Steven M Opal. Infectious Diseases. Terza edizione. Mosby, 2010.

16. Marchi e brevetti

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).

Nomi registrati, marchi, ecc. utilizzati in questo documento, anche se non specificamente contrassegnati come tali, non devono essere considerati non protetti dalla legge.















Il kit RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 è un kit diagnostico marcato CE secondo la direttiva diagnostica *in vitro* europea 98/79/CE.

Prodotto non concesso in licenza con Health Canada e non approvato o autorizzato dalla FDA.

Non disponibile in tutti i paesi.

© 2021 altona Diagnostics GmbH; tutti i diritti riservati.

17. Spiegazione dei simboli

Simbolo	Spiegazione
	Dispositivo diagnostico <i>in vitro</i>
	Lotto
	Colore del tappo
	Numero di catalogo
	Indice
	Numero
	Componente
	Global Trade Identification Number
	Istruzioni per l'uso
	Contiene sufficienti per "n" test / reazioni (rxns)
	Limite di temperatura
	Da usare entro
	Fornitore
	Attenzione: Evidenzia istruzioni per l'uso o procedure che, se non vengono seguite correttamente, potrebbero causare lesioni personali o influire sulle prestazioni del prodotto. Contattare l'assistenza tecnica di Altona Diagnostics per avere assistenza.

Simbolo	Spiegazione
---------	-------------

Nota: All'utente vengono fornite informazioni utili ma non essenziali per il compito da svolgere.



Versione

Note:

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

