

VIASURE

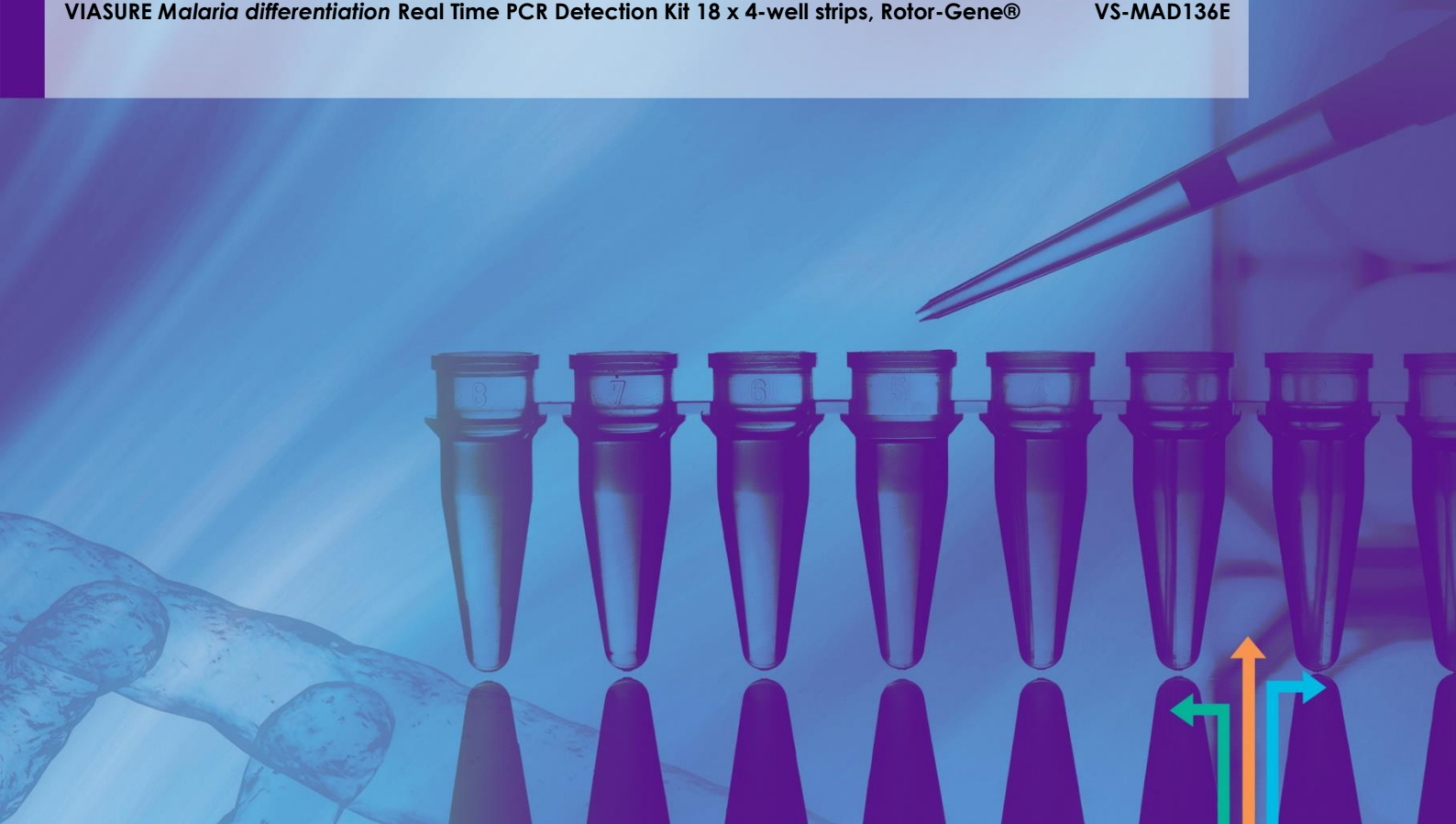
Real Time PCR Detection Kits

by CerTest
BIOTEC

Malaria differentiation

Handbook for the following references/
Manual para las siguientes referencias:

VIASURE <i>Malaria differentiation</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-MAD106LE
VIASURE <i>Malaria differentiation</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-MAD106HE
VIASURE <i>Malaria differentiation</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-MAD112LE
VIASURE <i>Malaria differentiation</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-MAD112HE
VIASURE <i>Malaria differentiation</i> Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-MAD136E



ENGLISH

1. Intended use

VIASURE *Malaria differentiation* Real Time PCR Detection Kit is designed for the specific detection and differentiation of DNA of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* and/or *Plasmodium knowlesi* in whole blood samples from patients with signs and symptoms of malaria infection. This test is intended for use as an aid in the diagnosis of these five *Plasmodium* species responsible for malaria in combination with clinical and epidemiological risk factors. DNA is extracted from specimens, multiplied using Real Time amplification and detected using specific primers and a fluorescent reporter dye probe for *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* and *P. knowlesi*.

2. Summary and Explanation

Malaria is a major threat to public health worldwide in communicable diseases, since its prevalence and mortality exceeds those of any other.

Malaria is a treatable infectious disease transmitted by vectors and caused by the asexual form of eukaryotic parasites of the genus *Plasmodium*. It is an apicomplex of the *Hematozoa* class, family *Plasmodiidae*. The parasites are transmitted to people by the bites of infected mosquitoes of the genus *Anopheles*.

It is known that there are five species that are capable of infecting humans: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* and *Plasmodium knowlesi*, the latter infected only primates, but has been responsible for cases of infection in humans in Malaysia and Borneo. The two most frequent species are *P. vivax* and *P. falciparum*. *P. falciparum* infection is the most common cause of severe malaria, is responsible for the majority of deaths from malaria and can cause other complications such as anemia and in children of pregnant women with malaria, can cause low birth weight. The classic symptomatology of malaria is a triad: fever, chills and sweating, and sometimes with other nonspecific symptoms such as headache and pain in other parts of the body, without associated complications. In a few cases severe malaria is present with neurological complications or life-threatening complications.

The most severe cases (malaria tropica), usually caused by the most aggressive species, *P. falciparum*, usually include high fever, chills, diarrhea, headache and in a few hours can evolve into a severe condition with hepatic, renal, and coagulation disorders, pulmonary and cerebral edema, encephalopathy, coma and death. Even mild cases can quickly evolve into a deadly form, so early diagnosis and treatment are essential. The incubation time takes 7 days or more after the first exposure.

The genetic diversity gives *Plasmodium* the ability to evade the immune response of the host and produce variants resistant to drugs and vaccines, being this largely responsible for the successful survival of the parasite in the evolutionary history, as well as the failure of the measures used with the aim of eradicating it.

Since it was first described in 1880, the diagnosis of this disease has been made by observing the different forms of the parasite in the microscopic examination of peripheral blood smears stained with various dyes. Today, this technique is still the reference method. However, the laboriousness that requires the training of a good



microscopist and the difficulty of observing low parasitemias has led to the development of new, simpler but more sensitive and specific techniques. Diagnosing malaria in time can be vital for the patient, since the appearance of complications is closely related to the delay in the initiation of treatment.

In addition, molecular diagnostic tests can detect amounts of *Plasmodium* when the parasitaemia is below the minimum level of detection in the examination of the blood sample.

3. Principle of the procedure

VIASURE *Malaria differentiation* Real Time PCR Detection Kit is designed for the diagnosis of *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* and *P. knowlesi* in whole blood samples. After DNA isolation, the identification of *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* and *P. knowlesi* is performed by the amplification of a conserved region of the 18S rRNA gene using specific primers and a fluorescent-labeled probe.

VIASURE *Malaria differentiation* Real Time PCR Detection Kit is based on the 5' exonuclease activity of DNA polymerase. During DNA amplification, this enzyme cleaves the probe bounded to the complementary DNA sequence, separating the quencher dye from the reporter. This reaction generates an increase in the fluorescent signal which is proportional to the quantity of target template. This fluorescence can be measured on Real Time PCR platforms.

VIASURE *Malaria differentiation* Real Time PCR Detection Kit contains in each well all the components necessary for real time PCR assay (specific primers/probes, dNTPS, buffer, polymerase) in a stabilized format. The assay can use an Extraction Control (EC) which can be introduced into each sample at the lysis buffer stage of the extraction process. This control can be used to monitor the extraction process and/or discard the inhibition of the polymerase activity. Each kit includes two kind of strips and each one corresponds to one different assay. The first strip contains the multiplex reaction mix for the detection of *P. malariae*, *P. knowlesi* and *P. ovale* (*P. malariae*, *P. knowlesi* & *P. ovale* 4/8-well strips). *P. malariae* is amplified and detected in FAM channel, *P. knowlesi* is amplified and detected in ROX channel, *P. ovale* is amplified and detected in Cy5 channel and the Extraction Control (EC) in HEX, VIC or JOE channel (depending on the equipment used select the proper detection channel, see Annex 2). The second strip contains the multiplex reaction mix for the detection of *P. falciparum* and *P. vivax* (*P. falciparum* + *P. vivax* 4/8-well strips). *P. falciparum* is amplified and detected in FAM channel, *P. vivax* is amplified and detected in ROX channel and the Extraction Control (EC) in HEX, VIC or JOE channel (depending on the equipment used select the proper detection channel, see Annex 2).

4. Reagents provided

VIASURE *Malaria differentiation* Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Tables 1 and 2. Based on the commercial presentation and the Real Time PCR platform used, the stabilized PCR reaction mix could be placed inside different wells and could be marketed on multiple formats. Table 1 includes materials and reagents to be used with 8-well strips compatible devices (See Annex 1). Table 2 includes materials and reagents for use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments for 4-well strips.



Reagent/Material	Description	Colour	Amount
<i>P. malariae</i> , <i>P. knowlesi</i> & <i>P. ovale</i> 8-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs and stabilizers in stabilized format	White	3/6 x 8-well strip
<i>P. falciparum</i> + <i>P. vivax</i> 8-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs and stabilizers in stabilized format	White	3/6 x 8-well strip
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
<i>Malaria differentiation</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	1 vial
Extraction Control	Non-infectious nucleic acid lyophilized	Green	1 vial
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing wells during thermal cycling	Transparent	6/12 X 8-cap strip

Table 1. Reagents and materials provided in VIASURE *Malaria differentiation* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-MAD106LE, VS-MAD106HE, VS-MAD112LE and VS-MAD112HE.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
<i>P. malariae</i> , <i>P. knowlesi</i> & <i>P. ovale</i> 4-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs and stabilizers in stabilized format	Transparent	9x 4-well strip
<i>P. falciparum</i> + <i>P. vivax</i> 4-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs and stabilizers in stabilized format	Transparent	9x 4-well strip
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
<i>Malaria differentiation</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	1 vial
Extraction Control	Non-infectious nucleic acid lyophilized	Green	1 vial
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL
4-cap strips	Optical caps for sealing wells during thermal cycling	Transparent	18 x 4-cap strip

Table 2. Reagents and materials provided in VIASURE *Malaria differentiation* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-MAD136E. For use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments and compatible accessories with strips of 4 tubes 0.1 ml (72-Well Rotor and Locking Ring 72-Well Rotor).

5. Reagents and equipment to be supplied by the user

The following list includes the materials that are required for use but not included in the VIASURE *Malaria differentiation* Real Time PCR Detection Kit.

- Real Time PCR instrument (thermocycler).
- DNA extraction kit.
- Centrifuge for 1.5 mL tubes and PCR-well strips (if available).
- Vortexer.
- Micropipettes (0.5-20 µL, 20-200 µL).



- Filter tips.
- Powder-free disposable gloves.
- Loading block (for use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments).

VIASURE *Malaria differentiation* Real Time PCR Detection Kit has been validated on the following equipments: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, DNA-Technology DTlite Real-Time PCR System, Rotor-Gene® Q (Qiagen), SmartCycler® (Cepheid), Roche Molecular Diagnostics Cobas z480 Analyzer, VIASURE 48 Real Time PCR System and VIASURE 96 Real Time PCR System. When using the Applied Biosystems 7500 Fast with strips it is recommend to place a plate holder to reduce the risk of crushed tube (Ref. PN 4388506).

To check thermocycler compatibility, see Annex 1, to check most common detection channels see Annex 2 and to check optical measurement exposure setting see Annex 3.

6. Transport and storage conditions

- The kits can be shipped and stored at 2-40°C until the expiration date which is stated on the label.
- Once the positive control has been re-suspended, store it at -20°C. We recommend to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles. Positive control has been validated as still being stable after 6 freeze-thaw cycles.
- Keep components away from sunlight.

7. Precautions for users

- The product is indented for use by professional users only, such as laboratory or health professionals and technicians, trained in molecular biological techniques.
- Do not use past expiration date.
- Do not use reagents if the protective pouches are open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if desiccant is not present or broken inside reagent pouches.
- Do not remove desiccant from reagent pouches once is open.
- Close protective pouches of reagents promptly with the zip seal after each use (if available, Ref. VS-MAD136E). Remove any excess air in the pouches prior to sealing.
- Do not use reagents if the foil has been broken or damaged.
- Do not mix reagents from different envelopes and / or kits and / or lots and / or another supplier.
- Protect reagents against from humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- For reference VS-MAD136E (compatible with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments) use the loading block to pipette reagents and samples into each tube and to help with fitting caps properly and avoid cross contamination.
- Design a unidirectional workflow. It should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Area. Do not return samples, equipment and reagents to the area in which the previous step was performed.



- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposable gloves, goggles and mask. Do not eat, drink or smoke in the working area. Once you finish the test wash your hands.
- Specimens must be treated as potentially infectious, as well as all the reagents and materials that have been exposed to the samples and they must be handled according to the national safety regulations. Take necessary precautions during the collection, storage, treatment and disposal of samples.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.
- Make sure to use a well for the detection of *P. malariae*, *P. knowlesi* and *P. ovale* and another well for *P. falciparum* and *P. vivax* assay. Be careful not to mix them throughout the process.
- Consult safety data sheets, upon request.
- Consult each Real Time PCR instrument's reference manual for additional warnings, precautions and procedures.

8. Test procedure

8.1. Lyophilized extraction control

Recommendation is to open and manipulate the Extraction Control (EC) in pre-PCR laboratory area away from the lyophilized positive control. Reconstitute the lyophilized Extraction Control (green vial) adding 500 µL of Water RNase/DNase free (white vial) supplied and vortex thoroughly.

Once the Extraction Control has been re-suspended, store it at -20°C. Recommendation is to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

Note: The Water RNase/DNase free vial must be utilized first to reconstitute the lyophilized Extraction Control in pre-PCR laboratory area, and subsequently, it can be used for reconstitute the lyophilized *Malaria differentiation* Positive Control in an area away from the other components.

8.2. DNA extraction

Perform the sample preparation following the manual system protocol or according to the recommendations appearing in the instructions for use of extraction kit used.

If the Extraction Control is used to monitor nucleic acid isolation and as PCR inhibition control, add 5 µl of the EC to the specimen and/or lysis buffer mixture. (clinical specimen, as well as, positive control and/or negative control). Close each tube and vortex for 10 seconds.

If the Extraction Control is used only as a PCR inhibition control, 1µl of the EC should be added to the reconstituted Reaction-Mix.

For DNA extraction from whole blood samples you can use your manual or automatic routine optimized system. Also, you can use any commercially available DNA extraction kit and follow the manufacturer's instructions. We have validated the following extraction kits:

- Viasure RNA-DNA Extraction kit (VIASURE), recommended.



- Invisorb® Spin Universal Kit (Strattec).
- MagDEA Dx SV kit, using the magLEAD® 6gC instrument (Precision System Science Co.).
- MagCore® Viral Nucleic Acid Extraction kit (Low PCR inhibition), using the MagCore® HF16 automated Nucleic Acid Extractor System (RBC Bioscience).

8.3. Lyophilized positive control

Malaria differentiation Positive Control contains high copies of the template, the recommendation is to open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components. Reconstitute the lyophilized *Malaria differentiation* Positive Control (red vial) by adding 200 µL of the supplied Water RNase/DNase free (white vial) and vortex thoroughly.

Once the positive control has been re-suspended, store it at -20°C. We recommend to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

8.4. PCR protocol

Determine and separate the number of required reactions including samples and controls. One positive and negative control must be included in each run for each assay. Peel off protective aluminium seal from plates or strips.

- 1) Reconstitute the number of wells you need.

Add 15 µL of Rehydration Buffer (blue vial) into each well.

- 2) Adding samples and controls.

Add 5 µL of Negative Control (violet vial) in the reserved wells for negative control.

Add 5 µL of DNA sample in different wells.

Add 5 µL of reconstituted *Malaria differentiation* Positive Control (red vial) in the reserved wells for positive control.

If the EC is only used as PCR inhibition control, add 1 µL of the EC (green vial) to the negative control/sample/positive control wells.

It is recommended to briefly centrifuge the 8-well strips or 96-well plate, or gently tap each strip onto a hard surface to ensure that all the liquids are at the bottom of the tubes (for Qiagen/Corbett Rotor-Gene® kits).

Load the plate or the strips in the thermocycler.

- 3) Set up the thermocycler (to check compatibility see Annex 1).

Program the thermocycler following the conditions listed below and start the run:



Cycles	Step	Time	Temperature
1	Polymerase activation	2 min	95°C
45	Denaturation	10 seg	95°C
	Annealing/Extension (Data collection*)	50 seg	60°C

Table 3. PCR protocol

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM (*P. malariae* and *P. falciparum*), ROX (*P. knowlesi* and *P. vivax*), Cy5 (*P. ovale*) and HEX, JOE or VIC channels (Extraction Control (EC)). Depending on the equipment used select the proper detection channel (see Annex 2). In the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System and Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System check that the passive reference option for ROX is none. In the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System select Ramp Speed Standard in Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

9. Result interpretation

The use of positive and negative controls in each run, validate the reaction by checking the absence of signal in the negative control well and the presence of signal for *Malaria differentiation* in the positive control well. Check Extraction Control (EC) signal to verify the extraction procedure and correct functioning of the amplification mix. The analysis of the samples is done by the software itself of the used real time PCR equipment according to manufacturer's instructions.

Interpretation of results for *P. malariae*, *P. knowlesi* & *P. ovale* 4/8-well strips:

<i>P. malariae</i> (FAM)	<i>P. knowlesi</i> (ROX)	<i>P. ovale</i> (Cy5)	Extraction control (HEX)	Negative Control	Positive Control	Interpretation
+	+	+	+/-	-	+	<i>P. malariae</i> , <i>P. knowlesi</i> and <i>P. ovale</i> Positive
-	-	-	+	-	+	<i>P. malariae</i> , <i>P. knowlesi</i> and <i>P. ovale</i> Negative
+	-	-	+/-	-	+	<i>P. malariae</i> Positive, <i>P. knowlesi</i> and <i>P. ovale</i> Negative
+	+	-	+/-	-	+	<i>P. malariae</i> and <i>P. knowlesi</i> Positive, and <i>P. ovale</i> Negative
+	-	+	+/-	-	+	<i>P. malariae</i> and <i>P. ovale</i> Positive, and <i>P. knowlesi</i> Negative
-	+	-	+/-	-	+	<i>P. knowlesi</i> Positive, <i>P. malariae</i> and <i>P. ovale</i> Negative
-	+	+	+/-	-	+	<i>P. knowlesi</i> and <i>P. ovale</i> Positive, <i>P. malariae</i> Negative
-	-	+	+/-	-	+	<i>P. ovale</i> Positive, <i>P. malariae</i> and <i>P. knowlesi</i> Negative
-	-	-	-	-	+	Experiment fail
+	+	+	+	+	-	Experiment fail

Table 4. Sample interpretation

+: Amplification curve

-: No amplification curve



Interpretation of results for *P. falciparum* + *P. vivax* 4/8-well strips:

<i>P. falciparum</i> (FAM)	<i>P. vivax</i> (ROX)	Extraction control (HEX)	Negative Control	Positive Control	Interpretation
+	+	+/-	-	+	<i>P. falciparum</i> and <i>P. vivax</i> Positives
-	-	+	-	+	<i>P. falciparum</i> and <i>P. vivax</i> Negative
+	-	+/-	-	+	<i>P. falciparum</i> Positive and <i>P. vivax</i> Negative
-	+	+/-	-	+	<i>P. vivax</i> Positive and <i>P. falciparum</i> Negative
-	-	-	-	+	Experiment fail
+	+	+	+	-	Experiment fail

Table 5. Sample interpretation

+: Amplification curve

-: No amplification curve

A sample is considered positive if the Ct value obtained is less than 40 and the Extraction control shows or not an amplification signal. Sometimes, the detection of Extraction control is not necessary because a high copy number of target can cause preferential amplification of target-specific nucleic acids.

A sample is considered negative, if the sample shows no amplification signal in the detection system but the Extraction Control is positive. A failure in the extraction procedure and/or an inhibition of the PCR reaction can be excluded by the amplification of Extraction Control.

Figure 1. Correct run of negative and positive control run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System. (*P. malariae*, *P. knowlesi* & *P. ovale*).

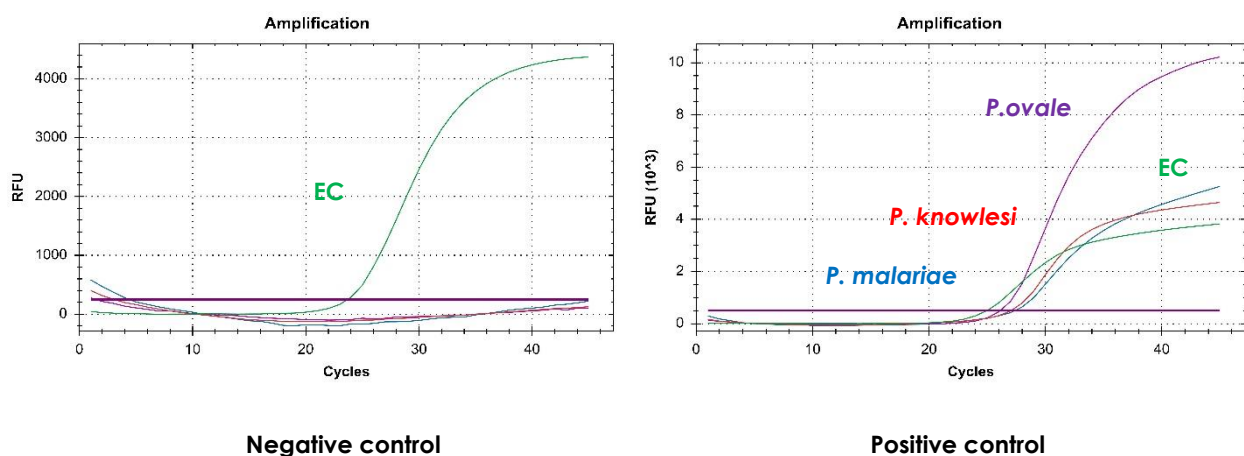
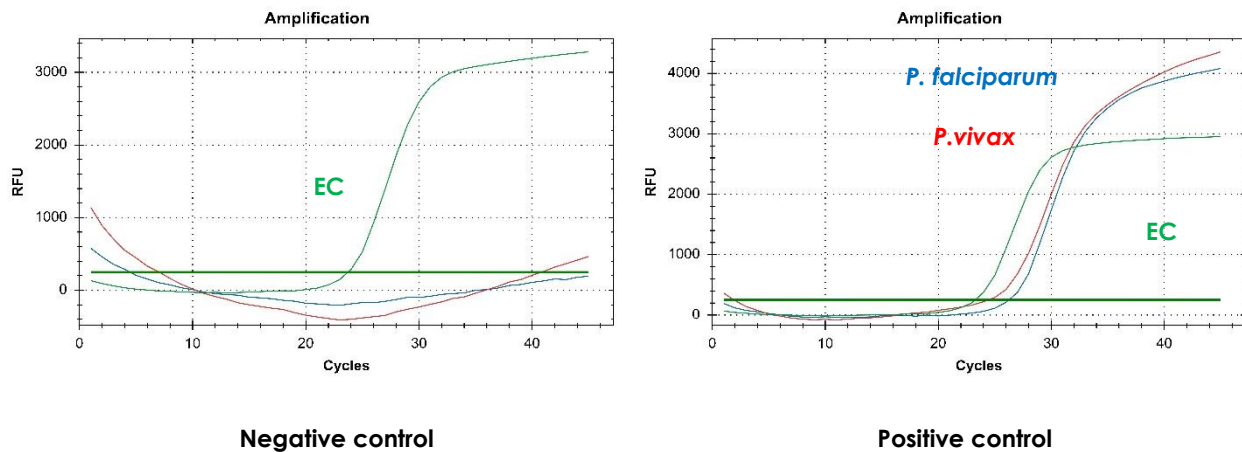


Figure 2. Correct run of negative and positive control run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System. (*P. falciparum* + *P. vivax*).



The result is considered invalid if there is signal of amplification in negative control or absence of signal in the positive well. We recommend to repeat the assay again.

In case of absence of signal in both, Extraction Control and target in sample wells, we recommend to repeat the assay diluting the sample 1:10 or to repeat the extraction to check for possible problems of nucleic acids purification and/or inhibition.

In case of a doubtful interpretation result, it is recommended to verify the correct performance of each of the steps and review the parameters and the sigmoid shape of the curve. If the situation is not solved, it is recommended to repeat the assay, preferably in duplicate. The results of the test should be evaluated by a health care professional in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.

Differences can be observed in the values of Ct in the extraction controls between the control samples (negative control and positive control) and the clinical samples, due to the extraction process.

For samples at the limit of detection (LOD) or negative with a value of Ct for the extraction control ≥ 35 , it is recommended to filter the sample, or dilute the extracted (1:10 and 1:100) to avoid possible interference and inhibitors in the amplification reaction. It is recommended to review the instructions for using the extraction process used by the user.

10. Limitations of the test

- The results of the test should be evaluated by a health care professional in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.
- Although this assay can be used with other types of samples it has been validated only with DNA extracted from whole blood samples.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper extracted nucleic acid from clinical samples must be extracted. Unsuitable collection, storage and/or transport of specimens may give false negative results.
- Extremely low levels of target below the limit of detection might be detected, but results may not be reproducible.



- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by *Malaria differentiation* Positive Control, either by samples containing high concentrations of target DNA or contamination due to PCR products from previous reactions.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination between Extraction Control and *Malaria differentiation* Positive Control, which contains high copies template, during their reconstitution by adding of Water RNase/DNase free (white vial). Each procedure must take place in established order and in a separate laboratory areas.

11. Quality control

VIASURE *Malaria differentiation* Real Time PCR Detection Kit contains a positive and a negative control that must be included in each run to correctly interpret the results. Also, the extraction control (EC) in each well confirms the correct performance of the technique.

12. Performance characteristics

12.1. Clinical sensitivity and specificity

The clinical performance of VIASURE *Malaria differentiation* Real Time PCR Detection Kit was tested using 119 blood samples from symptomatic patients. These results were compared with those obtained with a molecular detection method (FTD *Malaria differentiation* (Fast Track Diagnostics)).

The results were as follows:

VIASURE <i>Malaria differentiation</i> Real Time PCR Detection Kit	FTD <i>Malaria differentiation</i> (Fast Track Diagnostics)			
		+	-	Total
	+	1	0	1
	-	0	118	118
	Total	1	118	119

Table 6. Comparative results for *P. malariae*.

VIASURE <i>Malaria differentiation</i> Real Time PCR Detection Kit	FTD <i>Malaria differentiation</i> (Fast Track Diagnostics)			
		+	-	Total
	+	2	0	2
	-	0	117	117
	Total	2	117	119

Table 7. Comparative results for *P. ovale*.



VIASURE Malaria differentiation Real Time PCR Detection Kit	FTD Malaria differentiation (Fast Track Diagnostics)			
		+	-	Total
	+	4	0	4
	-	0	115	115
	Total	4	115	119

Table 8. Comparative results for *P. vivax*.

VIASURE Malaria differentiation Real Time PCR Detection Kit	FTD Malaria differentiation (Fast Track Diagnostics)			
		+	-	Total
	+	30	0	30
	-	0	89	89
	Total	30	89	119

Table 9. Comparative results for *P. falciparum*.

Sensitivity, specificity, PPV and NPV values for VIASURE Malaria differentiation Real Time PCR detection kit (CerTest Biotec) compared with FTD Malaria differentiation (Fast Track Diagnostics) are shown in next table:

	<i>P. malariae</i>	<i>P. ovale</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. falciparum</i>
SE (%)	>99	>99	>99	>99
SP (%)	>99	>99	>99	>99
PPV (%)	>99	>99	>99	>99
NPV (%)	>99	>99	>99	>99

Table 10. Sensitivity (SE), Specificity (SP), Positive Predictive Value (PPV) and Negative Predictive Value (NPV) calculated for VIASURE assay and FTD Malaria differentiation (Fast Track Diagnostics) as reference. (CI = Confidence Interval 95%).

The results show a high sensitivity and specificity to detect *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* and *P. malariae* using VIASURE Malaria differentiation Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Analytical sensitivity

VIASURE Malaria differentiation Real Time PCR Detection Kit has a detection limit of ≥ 10 DNA copies per reaction for *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* and *P. knowlesi* (Figure 3, 4, 5, 6 and 7).



Figure 3. Dilution series of *P. malariae* (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Multiplex reaction mix *P. malariae*, *P. knowlesi* & *P. ovale*, channel FAM).

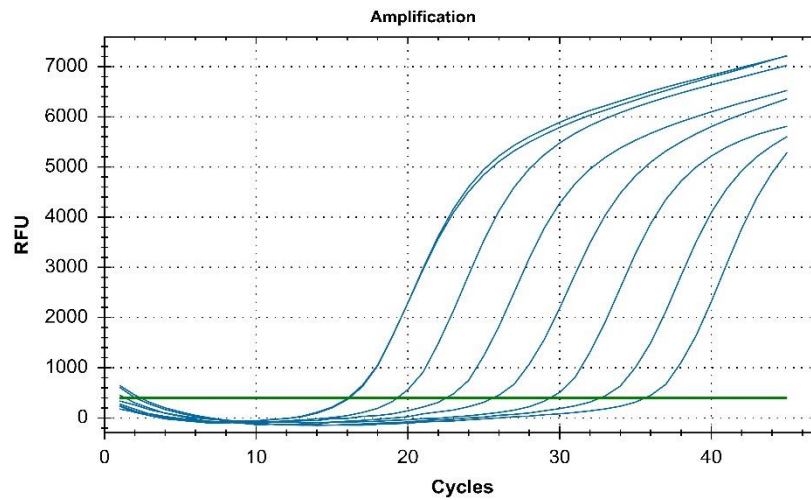


Figure 4. Dilution series of *P. knowlesi* (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Multiplex reaction mix *P. malariae*, *P. knowlesi* & *P. ovale*, channel ROX).

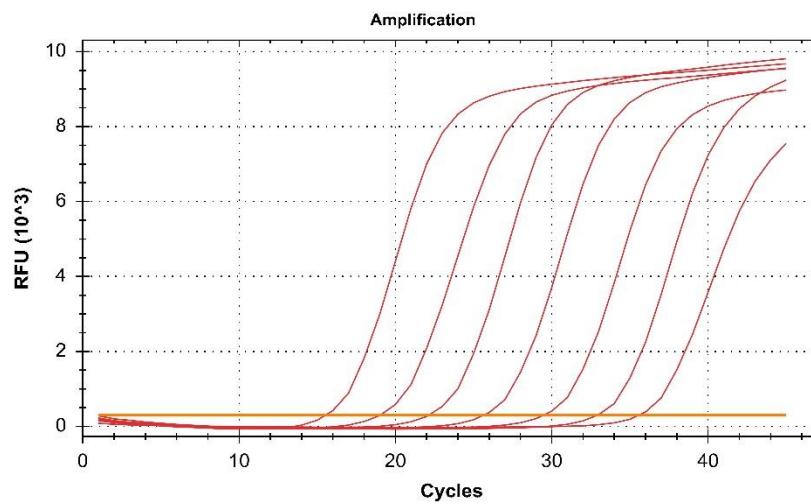


Figure 5. Dilution series of *P. ovale* (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Multiplex reaction mix *P. malariae*, *P. knowlesi* & *P. ovale*, channel Cy5).

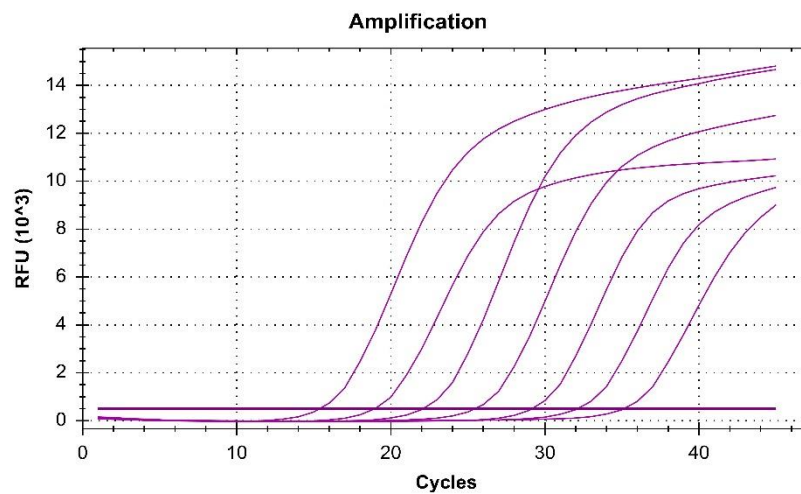


Figure 6. Dilution series of *P. falciparum* (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Multiplex reaction mix *P. falciparum* + *P. vivax*, channel FAM).

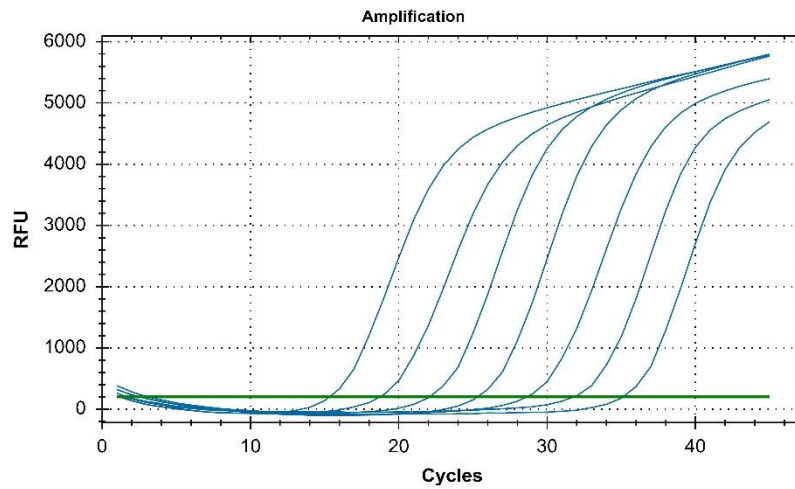
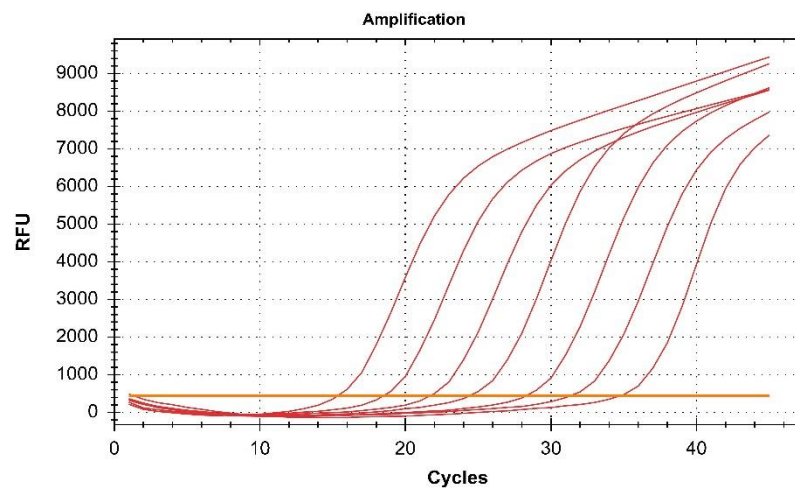


Figure 7. Dilution series of *P. vivax* (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Multiplex reaction mix *P. falciparum* + *P. vivax*, channel ROX).



12.3. Analytical specificity

The specificity of the *Malaria differentiation* assay was confirmed by testing a panel consisting of different microorganisms representing the most common vector-borne pathogens, and other 18S-possessing homologous eukaryotes. No cross-reactivity was detected between almost any of the following microorganisms tested, except the targeted pathogens of each assay.



Cross-reactivity testing					
<i>Anaplasma marginale</i>	-	Chikungunya virus strain S27 Petersfield	-	<i>Theileria annulata</i>	-
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	Chikungunya virus Martinique isolate	-	Tick Borne Encephalitis Virus (TBEV) strain Neudorfl	-
<i>Bartonella henselae</i> strain Houston-1	-	Chikungunya virus strain F24	-	<i>Toxoplasma gondii</i> (Type II)	-
<i>Borrelia hermsii</i>	-	Dengue 1 virus strain Hawaii	-	<i>Treponema phagedenis</i>	-
<i>Borrelia lusitanae</i>	-	Dengue 2 virus strain New Guinea C	-	<i>Trypanosoma cruzi</i>	-
<i>Borrelia valaisiana</i>	-	Dengue 3 virus strain H87	-	Usutu Virus	-
<i>Borrelia azfeli</i> strain P-Ko/1984	-	Dengue 4 virus strain H241	-	West Nile virus strain NY99	-
<i>Borrelia bavariensis</i>	-	Japanese encephalitis	-	West Nile virus Heja	-
<i>Borrelia bisetti</i>	-	Japanese Encephalitis virus Nakayama	-	West Nile virus Ug37	-
<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu stricto strain IRS	-	<i>Leptospira</i>	-	Yellow Fever virus strain 17D	-
<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu stricto strain B31	-	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	-	Yellow Fever Virus French Neurotropic	-
<i>Borrelia garinii</i>	-	<i>Plasmodium falciparum</i> 3D7	-/+	Zika Virus strain 11474/16 (French Polynesia)	-
<i>Borrelia japonica</i>	-	<i>Rickettsia conorii</i> strain Moroccan	-	Zika Virus strain 11468/16(French Polynesia)	-
<i>Borrelia miyamotoi</i>	-	Rift Valley Fever Virus AR21229	-	Zika Virus (African)	-
<i>Borrelia spielmanii</i>	-	Rift Valley Fever Virus MP12	-	Zika virus strain PF13/251013-18 (Asian)	-
<i>Coxiella burnetii</i> strain Nine Mile Q	-	St Louis Encephalitis virus	-	Zika virus strain FB-GWUH-2016	-
Chikungunya virus WHO IS (R91064)	-				

Table 11. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

12.4. Analytical reactivity

The reactivity of VIASURE *Malaria differentiation* Real Time PCR Detection Kit was evaluated against *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* and *Plasmodium knowlesi*, showing positive results.



ANNEX 1

COMPATIBILITY WITH THE MOST COMMON REAL TIME PCR EQUIPMENT

Low profile strips can be used in all PCR thermocyclers equipped with a low profile block, like the systems listed in table A.1. High profile strips can be used in all PCR thermocyclers equipped with a high or regular profile block, like the systems listed in table A.2. If you do not find your thermocycler in the list below, please contact with your supplier.

Table A.1 LOW PROFILE BLOCK THERMOCYCLERS	
Manufacturer	Model
Agilent Technologies	AriaMx/AriaDx Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
Applied Biosystems	StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	StepOne™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ / CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Roche	LightCycler® 480 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	LightCycler® 96 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	Cobas z480 Analyzer ⁽⁴⁾

Table A.2 HIGH PROFILE BLOCK THERMOCYCLERS	
Manufacturer	Model
Abbott	Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7900 HT Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7000 ⁽⁶⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7700 ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Analytik Jena Biometra	TOptical
Analytik Jena Biometra	qTOWER 2.0
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ Deep Well / CFX96™ Deep Well IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™5 Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Bio-Rad	MyiQ™2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler ⁽²⁾
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System ⁽²⁾
Eppendorf	Mastercycler™ep realplex
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3000P™ Real Time PCR System
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3005P™ Real Time PCR System
VIASURE	VIASURE 48 Real Time PCR System ⁽²⁾
VIASURE	VIASURE 96 Real Time PCR System ⁽²⁾

(1) Select Ramp Speed "Standard".

(2) See Annex 3 to check optical measurement exposure setting.

(3) The product should be reconstituted following the appropriate procedure (see Test Procedure) and transferred into the specific Rotor-Gene® Q or SmartCycler® tubes.

(4) Shell Frame grid plate which fits in these Roche qPCR System is necessary.

(5) No detection in Cy5 channel.

(6) Detection in FAM and HEX channels only.

Table A1/A2. Compatible low and high profile Real Time PCR systems.



ANNEX 2

DETECTION CHANNELS FOR THE MOST COMMON REAL TIME PCR EQUIPMENT

The fluorescence detection channels for some of most common Real Time PCR Thermocyclers are specified in Table A3.

REAL-TIME PCR THERMOCYCLER	VIASURE CHANNEL	DETECTION CHANNEL	OBSERVATIONS
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	Some wells may have abnormally drifting RFU values during the initial few cycles of a run showing a non-sigmoidal ascendant line. If you see this effect, in the Settings menu, select the option Apply Fluorescence Drift Correction for Baseline Settings to correct it.
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Passive reference option for ROX must be none. Some wells may have abnormally drifting RFU values during the initial few cycles of a run showing a non-sigmoidal ascendant line. If you see this effect, please modify the baseline: Select the Start Cycle and End Cycle values so that the baseline ends before significant fluorescence is detected.
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Colour Compensation is required
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Passive reference option for ROX must be none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene®Q Qiagen	FAM	Green	In the Channel Setup, click on the "Gain Optimisation" button and then go to "Optimise Acquiring". The fluorescence Target Sample Range has to be between 5 and 10 FI for each channel. Also select the option "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Mic Real Time PCR Cycler bms	FAM	Green	In the "Run Profile" menu, introduce the correct parameters for "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) and the appropriate thermal profile. In the "Cycling" window, select the "Acquire on" option for all the channels by clicking on them. Use the default "Gain" values for each channel (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10)
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Table A3: Detection fluorescence channels of different Real Time PCR systems.



ANNEX 3

OPTICAL MEASUREMENT EXPOSURE SETTING

Optical measurement parameters of some thermocyclers must be adjusted to be suitable for operation with "VIASURE Real Time PCR Detection Kits". This assay has been validated with the following set exposition values:

- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology) and VIASURE 96 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): FAM channel -500*, HEX channel – 1000, ROX channel – 1000 and Cy5 channel - 1000.
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology) and VIASURE 48 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): FAM channel - 500, HEX channel - 500, ROX channel – 500 and Cy5 channel - 500.

*If the result in channel FAM is not as expected, there are no amplifications or high background noise is observed, please lower the exposure values indicated above to 150.



ESPAÑOL

1. Uso previsto

VIASURE *Malaria differentiation* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la detección y diferenciación específica del DNA de *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* y/o *Plasmodium knowlesi* en muestras de sangre total procedentes de pacientes con signos y síntomas de infección por malaria. El uso previsto del test es facilitar el diagnóstico de infección producida por estas cinco especies de *Plasmodium* responsables de casos de infección por malaria en combinación con factores de riesgos clínicos y epidemiológicos. El DNA es extraído a partir de las muestras, amplificado posteriormente mediante PCR a tiempo real y detectado utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con una molécula fluorescente y otra apantalladora (*quencher*) para detectar *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* y *P. knowlesi*.

2. Introducción y explicación

La malaria es una amenaza importante para la salud pública en todo el mundo en las enfermedades transmisibles, ya que su prevalencia y mortalidad son superiores a las de cualquier otra.

La malaria es una enfermedad infecciosa tratable transmitida por vectores y causada por la forma asexual de parásitos eucariotas del género *Plasmodium*. Es un apicomplejo de la clase *Hematozoa*, familia *Plasmodiidae*. Los parásitos se transmiten a las personas por las picaduras de mosquitos infectados del género *Anopheles*.

Se sabe que hay cinco especies que pueden infectar a los humanos: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* y *Plasmodium knowlesi*, esta última solo primates infectados, pero ha sido responsable de casos de infección en humanos en Malasia y Borneo. Las dos especies más frecuentes son *P. vivax* y *P. falciparum*. La infección por *P. falciparum* es la causa más común de malaria severa, es responsable de la mayoría de las muertes por malaria y puede causar otras complicaciones como la anemia y en niños de mujeres embarazadas con malaria, puede causar un bajo peso al nacer. La sintomatología clásica de la malaria es una tríada: fiebre, escalofríos y sudoración, y en ocasiones otros síntomas inespecíficos, como dolor de cabeza y dolor en otras partes del cuerpo, sin complicaciones asociadas. En algunos casos, hay malaria grave con complicaciones neurológicas o complicaciones que ponen en peligro la vida.

Los casos más graves (malaria tropica), generalmente causados por la especie más agresiva, *P. falciparum*, incluyen fiebre alta, escalofríos, diarrea, cefalea y en pocas horas pueden evolucionar a una condición grave con trastornos hepáticos, renales y de coagulación, edema pulmonar y cerebral, encefalopatía, coma y muerte. Incluso los casos leves pueden evolucionar rápidamente hasta convertirse en una forma mortal, por lo que el diagnóstico y tratamiento tempranos son esenciales. El tiempo de incubación es 7 días o más después de la primera exposición.

La diversidad genética le da a *Plasmodium* la capacidad de evadir la respuesta inmune del huésped y producir variantes resistentes a los medicamentos y vacunas, siendo esto en gran parte responsable de la supervivencia exitosa del parásito en la historia evolutiva, así como del fracaso de las medidas utilizadas con el objetivo de erradicarlo.



Desde que se describió por primera vez en 1880, el diagnóstico de esta enfermedad se realizó mediante la observación de las diferentes formas del parásito en el examen microscópico de frotis de sangre periférica teñidos con varios tintes. Hoy en día, esta técnica sigue siendo el método de referencia. Sin embargo, la laboriosidad que requiere la capacitación de un buen microscopista y la dificultad de observar bajas parasitemias han llevado al desarrollo de nuevas técnicas más simples pero más sensibles y específicas. El diagnóstico de la malaria a tiempo puede ser vital para el paciente, ya que la aparición de complicaciones está estrechamente relacionada con el retraso en el inicio del tratamiento.

Además, las pruebas de diagnóstico molecular pueden detectar cantidades de *Plasmodium* cuando la parasitemia está por debajo del nivel mínimo de detección en el examen de la muestra de sangre.

3. Procedimiento

VIASURE *Malaria differentiation* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para el diagnóstico de *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* y *P. knowlesi* en muestras de sangre total. Tras el aislamiento del DNA, la identificación de *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* y *P. knowlesi* se lleva a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con fluorescencia que hibridan con una región diana conservada del gen 18S rRNA para *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* y *P. knowlesi*.

VIASURE *Malaria differentiation* Real Time PCR Detection Kit aprovecha la actividad 5' exonucleasa de la DNA-polimerasa. Durante la amplificación del DNA, esta enzima hidroliza la sonda unida a la secuencia de DNA complementaria, separando el fluoróforo del *quencher*. Esta reacción genera un aumento en la señal fluorescente proporcional a la cantidad de DNA diana. Esta fluorescencia se puede monitorizar en equipos de PCR a tiempo real.

VIASURE *Malaria differentiation* Real Time PCR Detection Kit contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPS, tampón, polimerasa) en formato estabilizado. Este ensayo también se puede utilizar con un Control de Extracción (CE) que puede adicionarse en cada muestra durante la etapa de adición del tampón de lisis del proceso de extracción. Este control sirve para monitorizar el proceso de extracción y/o descartar una posible inhibición de la actividad polimerasa. Cada kit incluye dos tipos de tiras y cada una de ellas corresponde a un ensayo diferente. La primera tira contiene la mezcla de reacción multiplex para la detección de *P. malariae*, *P. knowlesi* y *P. ovale* (*P. malariae*, *P. knowlesi* & *P. ovale* 4/8-well strips). Tras la reacción de amplificación, *P. malariae* se detecta en el canal FAM, *P. knowlesi* se detecta en el canal ROX, *P. ovale* se detecta en el canal Cy5 y el control de extracción (EC) se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (Seleccionar el canal de detección apropiado según el equipo utilizado, ver Anexo 2). La segunda tira contiene la mezcla de reacción multiplex para la detección de *P. falciparum* y *P. vivax* (*P. falciparum* + *P. vivax* 4/8-well strips). Tras la reacción de amplificación, *P. falciparum* se detecta en el canal FAM, *P. vivax* es detectado en el canal ROX y el control de extracción (EC) se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (Seleccionar el canal de detección apropiado según el equipo utilizado, ver Anexo 2).



4. Reactivos suministrados

VIASURE *Malaria differentiation* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en las Tablas 1 y 2. Basado en la presentación comercial y la plataforma de PCR en tiempo real utilizada, la mezcla de reacción de PCR estabilizada se puede encontrar en diferentes tubos o pocillos y por tanto comercializar en múltiples formatos. La Tabla 1 incluye materiales y reactivos para usar con dispositivos compatibles para tiras de 8 pocillos (Ver Anexo 1). La Tabla 2 incluye materiales y reactivos para usar con los instrumentos Qiagen / Corbett Rotor-Gene® para tiras de 4 pocillos.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>P. malariae</i> , <i>P. knowlesi</i> & <i>P. ovale</i> 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado	Blanco	3/6 tiras de 8 pocillos
<i>P. falciparum</i> + <i>P. vivax</i> 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado	Blanco	3/6 tiras de 8 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
<i>Malaria differentiation</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Extraction Control	Ácido nucleico liofilizado no infeccioso	Verde	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNasa/DNasa	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	6/12 tiras de 8 tapones

Tabla 1. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Malaria differentiation* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-MAD106LE, VS-MAD106HE, VS-MAD112LE y VS-MAD112HE.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>P. malariae</i> , <i>P. knowlesi</i> & <i>P. ovale</i> 4-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado	Transparente	9 tiras de 4 pocillos
<i>P. falciparum</i> + <i>P. vivax</i> 4-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado	Transparente	9 tiras de 4 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
<i>Malaria differentiation</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Extraction Control	Ácido nucleico liofilizado no infeccioso	Verde	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNasa/DNasa	Blanco	1 vial x 1 mL
4-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	18 tiras de 4 tapones

Tabla 2. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Malaria differentiation* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-MAD136E. Para usar con instrumentos Qiagen / Corbett Rotor-Gene® y accesorios compatibles con tiras de 4 tubos 0.1 ml (72-Well Rotor y Locking Ring 72-Well Rotor).



5. Material requerido y no suministrado

La siguiente lista incluye los materiales que se requieren para el uso pero que no se incluyen en VIASURE *Malaria differentiation* Real Time PCR Detection Kit.

- Equipo de PCR a tiempo real (termociclador).
- Kit de extracción de DNA.
- Centrífuga para tubos de 1.5 mL y para tiras de tubos de PCR (si está disponible).
- Vórtex.
- Micropipetas (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Puntas con filtro.
- Guantes desechables sin polvo.
- Loading block (para usar con instrumentos Qiagen/Corbett Rotor-Gene®).

VIASURE *Malaria differentiation* Real Time PCR Detection Kit ha sido validado en los siguientes equipos: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, DNA-Technology DTLite Real-Time PCR System, Rotor-Gene® Q (Qiagen), SmartCycler® (Cepheid), Roche Molecular Diagnostics Cobas z480 Analyzer, VIASURE 48 Real Time PCR System y VIASURE 96 Real Time PCR System. Cuando se utiliza el equipo Applied Biosystems 7500 Fast con tiras, se recomienda colocar el soporte adecuado para reducir el riesgo de aplastar el tubo (Ref. PN 4388506).

Para verificar la compatibilidad de los termocicladores, consulte el Anexo 1, para verificar los canales de detección más comunes, consulte el Anexo 2 y para verificar la configuración de la exposición de medición óptica, ver Anexo 3.

6. Condiciones de transporte y almacenamiento

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación. Se ha validado la estabilidad del control positivo tras 6 ciclos de congelación y descongelación.
- Proteger los componentes de la luz.

7. Precauciones para el usuario

- El producto está destinado para uso exclusivo de usuarios profesionales, como profesionales o técnicos de laboratorio y sanitarios, entrenados en técnicas de biología molecular.
- No se recomienda usar el kit después de la fecha de caducidad.
- No utilizar los reactivos si los sobres o las bolsas que protegen los tubos están abiertos o dañados en el momento que se reciben.



- No utilizar los tubos de reacción si el material desecante que se incluye en cada sobre de aluminio no está o está dañado.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio que contienen los tubos de reacción una vez abiertos.
- Cerrar los sobres de aluminio que protegen los tubos de reacción con el cierre zip inmediatamente después de cada uso (si está disponible, Ref. VS-MAD136E). Antes de cerrar los sobres eliminar cualquier exceso de aire.
- No utilizar los tubos de reactivos si el aluminio protector está roto o dañado.
- No mezclar reactivos de diferentes sobres y/o kits y/o lotes y/u otro proveedor.
- Proteger los reactivos de la humedad. Una exposición prolongada a la humedad puede afectar al rendimiento del producto.
- Para referencia VS-MAD136E (compatible con instrumentos Qiagen/Corbett Rotor-Gene®) utilice el loading block para pipetear reactivos y muestras en cada tubo y para ayudar en el ajuste correcto de las tapas así como para evitar la contaminación.
- Diseñar un flujo de trabajo unidireccional. Se debe comenzar en el área de extracción y después pasar al área de amplificación y de detección. No poner en contacto las muestras, equipos y reactivos utilizados en un área con la zona en la que se realizó el paso anterior.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes de uso desechables, gafas y mascarilla. No comer, beber o fumar en el área de trabajo. Una vez terminada la prueba, lavarse las manos.
- Las muestras deben ser tratadas como potencialmente infecciosas, así como los reactivos que han estado en contacto con las muestras y deben ser gestionadas según la legislación sobre residuos sanitarios nacional. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.
- Asegurarse de usar un pocillo para la detección de *P. malariae*, *P. knowlesi* y *P. ovale* y otro para el ensayo de *P. falciparum* y *P. vivax*. Tener precaución para que no se mezclen durante el proceso.
- Consulte las hojas de seguridad, previa solicitud.
- Consulte el manual de cada equipo de PCR a tiempo real para advertencias adicionales, precauciones y procedimientos.

8. Procedimiento del test

8.1. Control de extracción liofilizado

Se recomienda abrir y manipular el control de extracción (CE) en el área pre-PCR del laboratorio, alejada del control positivo liofilizado. Reconstituir el Control de Extracción liofilizado (vial verde) añadiendo 500 µL del Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex. Almacenar el Control de Extracción a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.



Nota: Se debe utilizar en primer lugar el vial de Agua libre de RNAsa/DNAsa para reconstituir el Control de Extracción liofilizado en el área pre-PCR del laboratorio y después se debe usar para reconstituir el *Malaria differentiation* Positive Control liofilizado en un área separada de los demás componentes.

8.2. Extracción de DNA

Realizar la preparación de la muestra de acuerdo con las recomendaciones que aparecen en las instrucciones de uso del kit de extracción utilizado.

Si el Control de Extracción se utiliza para monitorizar el proceso de aislamiento de los ácidos nucleicos y como control de la posible inhibición de la PCR, añadir 5 µL del CE a la muestra o a la mezcla del tampón de lisis-muestra. (muestras clínicas, control positivo y/o negativo). Cerrar cada uno de los tubos y mezclar con la ayuda del vórtex durante 10 segundos.

Si el Control de Extracción se emplea sólo como control de inhibición de la PCR, añadir 1 µL de CE a la mezcla de reacción reconstituida.

Para la extracción de DNA a partir de muestras de sangre total puede utilizar su sistema optimizado de rutina manual o automático. Además, se puede usar cualquier kit de extracción de DNA disponible en el mercado y seguir las instrucciones de uso del fabricante. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

- Viasure RNA-DNA Extraction kit (VIASURE), recomendado.
- Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec).
- MagDEA Dx SV kit, utilizando magLEAD® 6gC instrument (Precision System Science Co.).
- MagCore® Viral Nucleic Acid Extraction kit (Low PCR inhibition), utilizando MagCore® HF16 automated Nucleic Acid Extractor System (RBC Bioscience).

8.3. Control positivo liofilizado

El vial de *Malaria differentiation* Positive Control contiene una gran cantidad de copias molde por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir *Malaria differentiation* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 200 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex. Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

8.4. Protocolo PCR

Determinar y separar el número de reacciones necesarias incluyendo las muestras y los controles. En cada serie de muestras para cada uno de los ensayos a analizar se deben incluir un control positivo y uno negativo. Retirar el aluminio protector de las placas o tiras.

- 1) Reconstituir el número de pocillos que sean necesarios.

Añadir 15 µL del Rehydration buffer (vial azul) en cada pocillo.



2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de Negative Control (vial morado) en los pocillos reservados para el control negativo.

Añadir 5 µL de la muestra de DNA en los diferentes pocillos.

Añadir 5 µL de *Malaria differentiation* Positive Control (vial rojo), en los pocillos reservados para el control positivo.

Si el CE se utiliza sólo como control de la inhibición de la PCR, se recomienda añadir 1 µL del CE (vial verde) a los pocillos en los que se encuentre la muestra.

Se recomienda centrifugar brevemente las tiras de 8 pocillos o las placas de 96 pocillos, o golpear suavemente cada tira sobre una superficie dura para asegurarse de que todos los líquidos queden en el fondo de los tubos (para los kits compatible con Qiagen/Corbett Rotor-Gene®).

Colocar la placa o las tiras en el termociclador.

3) Configurar el termociclador (para verificar la compatibilidad, consulte el Anexo 1).

Programar el termociclador siguiendo las condiciones descritas en la siguiente tabla e iniciar el programa:

Ciclos	Etapas	Tiempo	Temperatura
1	Activación de la polimerasa	2 min	95°C
45	Desnaturalización	10 seg	95°C
	Hibridación/Elongación (Recogida de datos*)	50 seg	60°C

Tabla 3. Protocolo PCR

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (*P. malariae* y *P. falciparum*), ROX (*P. knowlesi* y *P. vivax*), Cy5 (*P. ovale*) y HEX, JOE o VIC (Control Extracción). Dependiendo del equipo a utilizar seleccionar el canal de detección adecuado (ver Anexo 2). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System y Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System comprobar que la opción del control pasivo ROX está desactivada. En el termociclador Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System seleccionar Ramp Speed Standard en el menú Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

9. Interpretación de resultados

El uso de los controles positivo y negativo junto con cada serie de muestras a analizar, valida la reacción comprobando la ausencia de señal en el pocillo del control negativo y la presencia de una señal en el pocillo de control positivo de *Malaria differentiation*. Comprobar la emisión de la señal del Control de Extracción (CE) para verificar el proceso de extracción y el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación. El análisis de las muestras se realiza con el software propio del equipo de PCR a tiempo real de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. Con ayuda de las siguientes tablas, leer y analizar los resultados:



Interpretación de los resultados para *P. malariae*, *P. knowlesi* & *P. ovale* 4/8-well strips:

<i>P. malariae</i> (FAM)	<i>P. knowlesi</i> (ROX)	<i>P. ovale</i> (Cy5)	Control Extracción (HEX)	Control Negativo	Control Positivo	Interpretación
+	+	+	+/-	-	+	<i>P. malariae</i> , <i>P. knowlesi</i> y <i>P. ovale</i> Positivos
-	-	-	+	-	+	<i>P. malariae</i> , <i>P. knowlesi</i> y <i>P. ovale</i> Negativos
+	-	-	+/-	-	+	<i>P. malariae</i> Positivo, <i>P. knowlesi</i> y <i>P. ovale</i> Negativos
+	+	-	+/-	-	+	<i>P. malariae</i> y <i>P. knowlesi</i> Positivos, y <i>P. ovale</i> Negativo
+	-	+	+/-	-	+	<i>P. malariae</i> y <i>P. ovale</i> Positivos, y <i>P. knowlesi</i> Negativo
-	+	-	+/-	-	+	<i>P. knowlesi</i> Positivo, <i>P. malariae</i> y <i>P. ovale</i> Negativos
-	+	+	+/-	-	+	<i>P. knowlesi</i> y <i>P. ovale</i> Positivos, <i>P. malariae</i> Negativo
-	-	+	+/-	-	+	<i>P. ovale</i> Positivo, <i>P. malariae</i> and <i>P. knowlesi</i> Negative
-	-	-	-	-	+	Inválido
+	+	+	+	+	-	Inválido

Tabla 4. Interpretación

+: curva de amplificación

-: sin curva de amplificación

Interpretación de los resultados para *P. falciparum* + *P. vivax* 4/8-well strips:

<i>P. falciparum</i> (FAM)	<i>P. vivax</i> (ROX)	Control Extracción (HEX)	Control Negativo	Control Positivo	Interpretación
+	+	+/-	-	+	<i>P. falciparum</i> y <i>P. vivax</i> Positivos
-	-	+	-	+	<i>P. falciparum</i> y <i>P. vivax</i> Negativos
+	-	+/-	-	+	<i>P. falciparum</i> Positivo y <i>P. vivax</i> Negativo
-	+	+/-	-	+	<i>P. vivax</i> Positivo y <i>P. falciparum</i> Negativo
-	-	-	-	+	Inválido
+	+	+	+	-	Inválido

Tabla 5. Interpretación

+: curva de amplificación

-: sin curva de amplificación



Una muestra se considera positiva, si el valor Ct obtenido es menor de 40 y el Control de Extracción muestra o no una gráfica de amplificación. En ocasiones, la detección del Control Extracción no es necesaria, ya que la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última.

Una muestra se considera negativa, si no se detecta una curva de amplificación por encima del valor umbral, y el Control de Extracción si la presenta. Un fallo en el proceso de extracción y la inhibición de la reacción de PCR pueden ser excluidas por la amplificación del Control de Extracción.

Figura 1. Ejemplo de gráficas de amplificación del control negativo y positivo. Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (*P. malariae*, *P. knowlesi* & *P. ovale*).

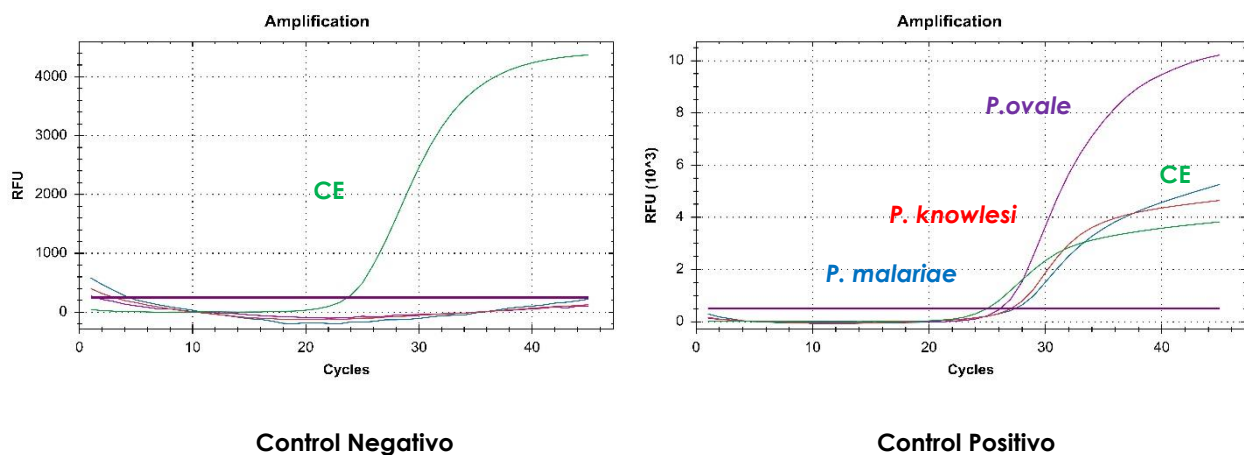
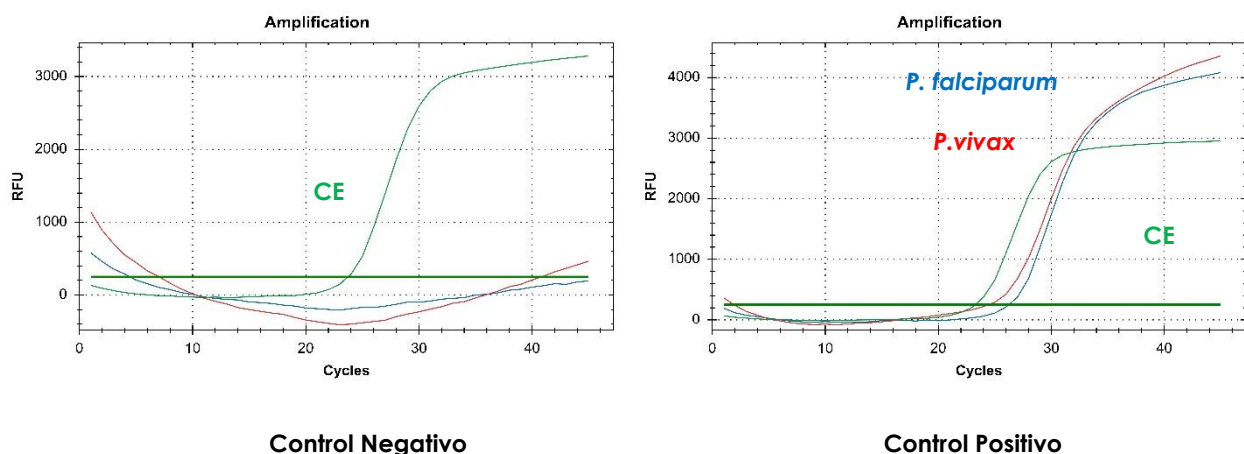


Figura 2. Ejemplo de gráficas de amplificación del control negativo y positivo. Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (*P. falciparum* + *P. vivax*).



El resultado se considera inválido si se observa una gráfica de amplificación en el control negativo o ausencia de señal en el pocillo del control positivo. En ese caso, se recomienda repetir el ensayo.

En caso de ausencia de la señal de ambos, el Control de Extracción y de la muestra, se recomienda repetir el ensayo diluyendo la muestra 1:10 o repetir la extracción para descartar posibles problemas durante la purificación de los ácidos nucleicos y/o de inhibición.



En el caso de obtener un resultado de dudosa interpretación, se recomienda verificar la correcta realización de cada uno de los pasos y revisar los parámetros y la forma sigmoidea de la curva. Si la situación no se resuelve, se recomienda repetir el ensayo, preferiblemente por duplicado. El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.

En los controles de extracción se pueden observar diferencias en los valores de Ct entre las muestras control (control negativo y control positivo) y las muestras clínicas, debido al proceso de extracción.

Para muestras en el límite de detección (LOD) o muestras negativas con un valor de Ct para el control de extracción ≥ 35 , se recomienda filtrar la muestra, o diluir el extraído (1:10 and 1:100) para evitar las posibles interferencias e inhibidores en la reacción de amplificación. Conviene revisar las instrucciones de uso del proceso de extracción empleado por el usuario.

10. Limitaciones del test

- El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.
- Este ensayo se podría utilizar con diferentes tipos de muestras, aunque sólo ha sido validado con RNA extraído de muestras de sangre total.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el ácido nucleico debe ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas. Una forma inadecuada de recolección, almacenaje y/o transporte de las muestras puede dar lugar a falsos negativos.
- Se puede detectar un bajo número de copias molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con *Malaria differentiation* Positive Control ya sea por muestras que contienen altas concentraciones de DNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada entre el Control de Extracción y *Malaria differentiation* Positive Control, el cual contiene un elevado número de copias molde, durante su reconstitución al añadir el Agua libre RNAsa/DNAsa (vial blanco). Cada uno de los procesos de debe de llevar a cabo siguiendo el orden establecido y en áreas del laboratorio separadas.

11. Control de calidad

VIASURE *Malaria differentiation* Real Time PCR Detection Kit contiene controles positivo y negativo que deben ser incluidos en cada ensayo para interpretar correctamente los resultados. Además, el control de extracción (CE) en cada pocillo confirma el correcto funcionamiento de la técnica.



12. Características del test

12.1. Sensibilidad y especificidad clínica

Se evaluaron 119 muestras de sangre de pacientes sintomáticos utilizando VIASURE *Malaria differentiation* Real Time PCR Detection Kit. Estos resultados se compararon con los obtenidos por un método de detección molecular (FTD *Malaria differentiation* (Fast Track Diagnostics)). Los resultados fueron los siguientes:

VIASURE <i>Malaria differentiation</i> Real Time PCR Detection Kit	FTD <i>Malaria differentiation</i> (Fast Track Diagnostics)		
		+	-
	+	1	0
	-	0	118
	Total	1	118

Tabla 6. Comparativa de resultados para *P. malariae*.

VIASURE <i>Malaria differentiation</i> Real Time PCR Detection Kit	FTD <i>Malaria differentiation</i> (Fast Track Diagnostics)		
		+	-
	+	2	0
	-	0	117
	Total	2	117

Tabla 7. Comparativa de resultados para *P. ovale*.

VIASURE <i>Malaria differentiation</i> Real Time PCR Detection Kit	FTD <i>Malaria differentiation</i> (Fast Track Diagnostics)		
		+	-
	+	4	0
	-	0	115
	Total	4	115

Tabla 8. Comparativa de resultados para *P. vivax*.

VIASURE <i>Malaria differentiation</i> Real Time PCR Detection Kit	FTD <i>Malaria differentiation</i> (Fast Track Diagnostics)		
		+	-
	+	30	0
	-	0	89
	Total	30	89

Tabla 9. Comparativa de resultados para *P. falciparum*.



Los valores de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN para VIASURE *Malaria differentiation* Real Time PCR detection kit (CerTest Biotec) en comparación con FTD *Malaria differentiation* (Fast Track Diagnostics) se muestran en la siguiente tabla:

	<i>P. malariae</i>	<i>P. ovale</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. falciparum</i>
SE (%)	>99	>99	>99	>99
SP (%)	>99	>99	>99	>99
VPP (%)	>99	>99	>99	>99
VPN (%)	>99	>99	>99	>99

Tabla 10. Sensibilidad (SE), especificidad (SP), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) calculados para el ensayo VIASURE y el ensayo FTD *Malaria differentiation* (Fast Track Diagnostics) como referencia. (IC = intervalo de confianza 95%).

Los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad para detectar *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae* utilizando VIASURE *Malaria differentiation* Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Sensibilidad analítica

VIASURE *Malaria differentiation* Real Time PCR Detection Kit tiene un límite de detección de ≥ 10 copias de DNA por reacción para *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* y *P. knowlesi*. (Figura 3, 4, 5, 6 y 7).

Figura 3. Diluciones seriadas de un estándar de *P. malariae* (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de reacción *P. malariae*, *P. knowlesi* & *P. ovale*, canal FAM).

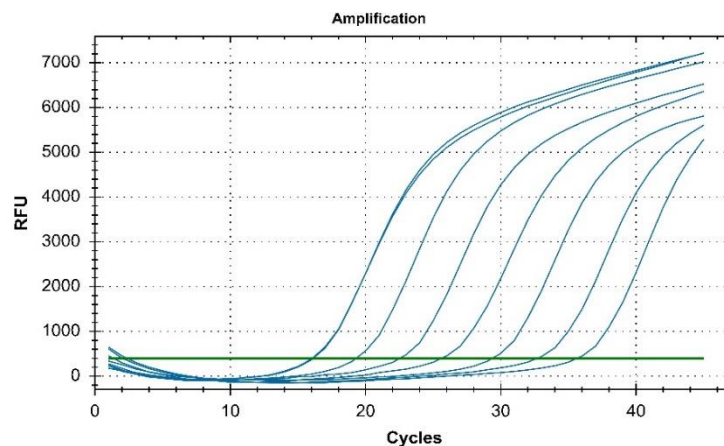


Figura 4. Diluciones seriadas de un estándar de *P. knowlesi* (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de reacción *P. malariae*, *P. knowlesi* & *P. ovale*, canal ROX).

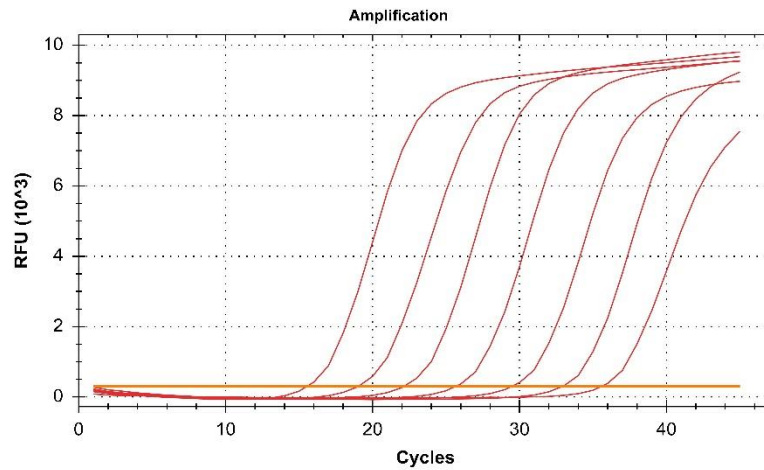


Figura 5. Diluciones seriadas de un estándar de *P. ovale* (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de reacción *P. malariae*, *P. knowlesi* & *P. ovale*, canal Cy5).

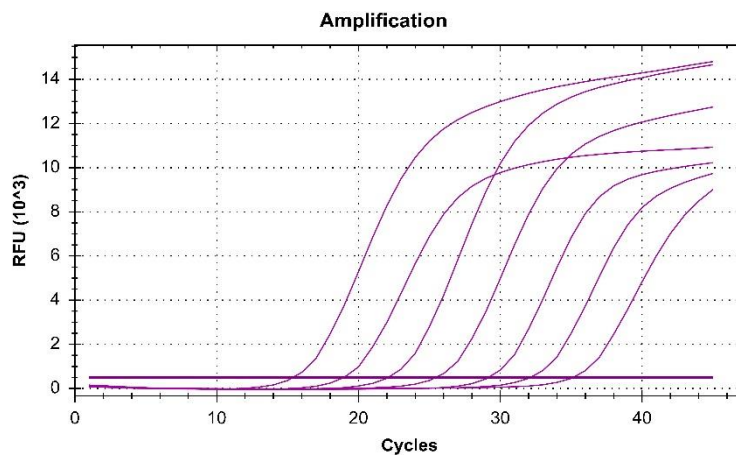


Figura 6. Diluciones seriadas de un estándar *P. falciparum* (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de reacción *P. falciparum* + *P. vivax*, canal FAM).

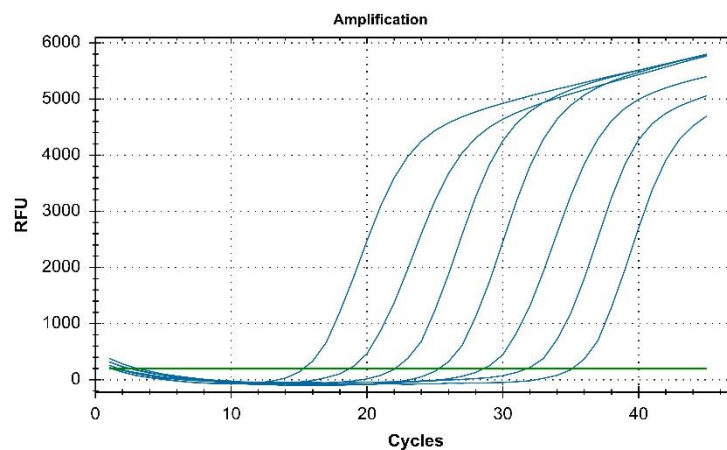
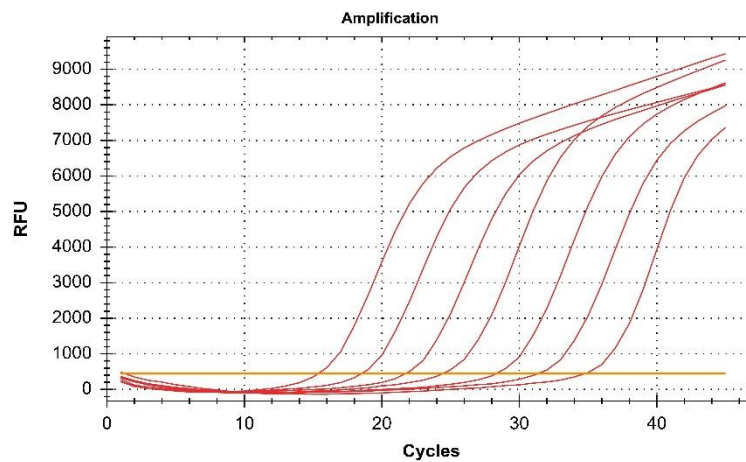


Figura 7. Diluciones seriadas de un estándar *P. vivax* (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de reacción *P. falciparum* + *P. vivax*, canal ROX).



12.3. Especificidad analítica

La especificidad del ensayo de *Malaria differentiation* fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos que representan los patógenos transmitidos por vectores más comunes y eucariotas portadores de regiones homologas del gen 18S rRNA. No se detectaron reacciones cruzadas con casi ninguno de los siguientes microorganismos testados, excepto con los patógenos diana que detecta cada ensayo.



Prueba de reacción cruzada					
<i>Anaplasma marginale</i>	-	Virus Chikungunya cepa S27 Petersfield	-	<i>Theileria annulata</i>	-
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	Virus Chikungunya Martinique isolate	-	Virus Tick Borne Encephalitis (TBEV) cepa Neudorfl	-
<i>Bartonella henselae</i> cepa Houston-1	-	Virus Chikungunya cepa F24	-	<i>Toxoplasma gondii</i> (Type II)	-
<i>Borrelia hermsii</i>	-	Virus Dengue 1 cepa Hawaii	-	<i>Treponema phagedenis</i>	-
<i>Borrelia lusitanae</i>	-	Virus Dengue 2 cepa New Guinea C	-	<i>Trypanosoma cruzi</i>	-
<i>Borrelia valaisiana</i>	-	Virus Dengue 3 cepa H87	-	Virus Usutu	-
<i>Borrelia azfeli</i> cepa P-Ko/1984	-	Virus Dengue 4 cepa H241	-	Virus West Nile cepa NY99	-
<i>Borrelia bavariensis</i>	-	Japanese encephalitis	-	Virus West Nile Heja	-
<i>Borrelia bisetti</i>	-	Japanese Encephalitis Nakayama	-	Virus West Nile Ug37	-
<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu stricto cepa IRS	-	<i>Leptospira</i>	-	Virus Yellow Fever cepa 17D	-
<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu stricto cepa B31	-	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	-	Virus Yellow Fever French Neurotropic	-
<i>Borrelia garinii</i>	-	<i>Plasmodium falciparum</i> 3D7	-/+	Virus Zika cepa 11474/16 (French Polynesia)	-
<i>Borrelia japonica</i>	-	<i>Rickettsia conorii</i> cepa Moroccan	-	Virus Zika cepa 11468/16(French Polynesia)	-
<i>Borrelia miyamotoi</i>	-	Virus Rift Valley Fever AR21229	-	Virus Zika (African)	-
<i>Borrelia spielmanii</i>	-	Virus Rift Valley Fever MP12	-	Virus Zika cepa PF13/251013-18 (Asian)	-
<i>Coxiella burnetii</i> cepa Nine Mile Q	-	Virus St Louis Encephalitis	-	Virus Zika cepa FB-GWUH-2016	-
Virus Chikungunya WHO IS (R91064)	-				

Tabla 11. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en este estudio.

12.4. Reactividad analítica

La reactividad de VIASURE *Malaria differentiation* Real Time PCR Detection Kit se evaluó frente a *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* y *Plasmodium knowlesi*, mostrando un resultado positivo.











13. Bibliography/Bibliografía

1. S. E. Shokoples *et al.* Multiplexed Real-Time PCR Assay for Discrimination of *Plasmodium* Species with Improved Sensitivity for Mixed Infections. *Journal of clinical microbiology*, 2009, p. 975–980.
2. M. Rougemont *et al.* Detection of Four *Plasmodium* Species in Blood from Humans by 18S rRNA Gene Subunit-Based and Species-Specific Real-Time PCR Assays. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, p. 5636–5643.
3. P. CS. Divis *et al.* A TaqMan real-time PCR assay for the detection and quantitation of *Plasmodium knowlesi*. *Malaria Journal*, 2010, 9:344.
4. A. Moody *et al.* Rapid Diagnostic Tests for Malaria Parasites. *Clinical Microbiology Reviews*, 2002. 15(1): 66–78.
5. PF Mens *et al.* Detection and identification of human *Plasmodium* species with real-time quantitative nucleic acid sequence-based amplification. *Malaria Journal*, 2006. 3:5:80.



6. I. Safeukui *et al.* Evaluation of FRET real-time PCR assay for rapid detection and differentiation of *Plasmodium* species in returning travellers and migrants. *Malaria Journal*, 2008. 7: 70.
7. N. Tangpukdee *et al.* Malaria Diagnosis: A Brief Review. *The Korean Journal of Parasitology*, 2009. Vol. 47, No. 2: 93-102.
8. N. Steenkeste *et al.* Towards high-throughput molecular detection of *Plasmodium*: new approaches and molecular markers., *Malaria Journal*, 2009. 29;8:86.
9. J. Maltha *et al.* Malaria rapid diagnostic tests: *Plasmodium falciparum* infections with high parasite densities may generate false positive *Plasmodium vivax* pLDH lines. *Malaria Journal*, 2010.10;9:198.
10. N. Bourgeois *et al.* Comparison of three real-time PCR methods with blood smears and rapid diagnostic test in *Plasmodium* sp. Infection. *Clinical Microbiology and Infection*, 2010 Volume 16, Issue 8, Pages 1305–1311.
11. E. Kamau *et al.* Multiplex qPCR for Detection and Absolute Quantification of Malaria. *Ploze One*, 2013. 29.
12. A. K *et al.* Rapid diagnostic tests for diagnosing uncomplicated non-falciparum or *Plasmodium vivax* malaria in endemic countries. *Cochrane Database Syst Rev*, 2014. 18;(12):CD011431.
13. S. A. Bickersmith *et al.* A sensitive, specific and reproducible real-time polymerase chain reaction method for detection of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infection in field-collected anophelines. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2015. vol.110 no.4.
14. F. D. Krampa *et al.* Recent Progress in the Development of Diagnostic Tests for Malaria., *Diagnostics (Basel)*, 2017; 7(3): 54.
15. N. Siwal *et al.* Malaria diagnosis by PCR revealed differential distribution of mono and mixed species infections by *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* in India. *Ploze One*, 2018. 22.
16. J. M. Roth *et al.* *Plasmodium* Detection and Differentiation by Direct-on-Blood PCR Nucleic Acid Lateral Flow Immunoassay. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 2018. Vol. 20, nº 1.
17. <https://www.who.int/malaria/areas/diagnosis/rapid-diagnostic-tests/en/>
18. <https://www.malariasite.com/rdt/>
19. https://www.cdc.gov/malaria/diagnosis_treatment/diagnostic_tools.html#tabs-2-2
20. <https://www.who.int/tdr/publications/documents/rdt3.pdf?ua=1>

14. Symbols for IVD components and reagents/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico *in vitro*

	<i>In vitro</i> diagnostic device Producto para diagnóstico <i>in vitro</i>		Keep dry Almacenar en lugar seco		Use by Fecha de caducidad		Manufacturer Fabricante		Batch code Número de lote
	Consult instructions for use Consultar las instrucciones de uso		Temperature limitation Limitación de temperatura		Contains sufficient for <n> test Contiene <n> test		Sample diluent Diluyente de muestra		Catalogue number Número de referencia

ANEXO 1

COMPATIBILIDAD DE LOS EQUIPOS A TIEMPO REAL MÁS COMUNES

Las tiras de bajo perfil pueden usarse en todos los termocicladores equipados con un bloque de perfil bajo, como los sistemas listados en la tabla A.1. Las tiras de perfil alto pueden usarse en todos los termocicladores PCR equipados con bloque de perfil alto o normal (high profile), como los sistemas listados en la tabla A.2. Si no encuentra su termociclador en la siguiente lista, por favor póngase en contacto con su proveedor.

Tabla A.1 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE BAJO PERFIL	
Fabricante	Modelo
Agilent Technologies	AriaMx/AriaDx Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
Applied Biosystems	StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	StepOne™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ / CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Roche	LightCycler® 480 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	LightCycler® 96 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	Cobas z480 Analyzer ⁽⁴⁾

Tabla A.2 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE PERFIL ALTO	
Fabricante	Modelo
Abbott	Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7900 HT Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7000 ⁽⁶⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7700 ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Analytik Jena Biometra	TOptical
Analytik Jena Biometra	qTOWER 2.0
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ / CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™5 Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Bio-Rad	MyiQ™2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler ⁽²⁾
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System ⁽²⁾
Eppendorf	Mastercycler™ep realplex
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3000P™ Real Time PCR System
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3005P™ Real Time PCR System
VIASURE	VIASURE 48 Real Time PCR System ⁽²⁾
VIASURE	VIASURE 96 Real Time PCR System ⁽²⁾

(1) Seleccionar Ramp Speed "Standard".

(2) Ver Anexo 3 para la configuración de los valores de exposición.

(3) El producto se debe reconstituir siguiendo el procedimiento adecuado (ver Procedimiento del test) y transvasar a los tubos específicos Rotor-Gene® Q o SmartCycler®.

(4) Se necesita un soporte especial que ajuste con estos equipos Roche de PCR a tiempo real.

(5) No lectura en canal Cy5.

(6) Lectura solo en canales FAM y HEX.

Tabla A1/A2. Equipos compatibles de PCR a tiempo real más comunes.



ANEXO 2

CANALES DE DETECCIÓN DE LOS EQUIPOS A TIEMPO REAL MÁS COMUNES

Los canales de fluorescencia de algunos de los termocicladores a tiempo real más comunes se especifican en la Tabla A3.

TERMOCICLADORES A TIEMPO REAL	CANAL VIASURE	CANAL DE DETECCIÓN	OBSERVACIONES
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	Algunos pocillos pueden tener una deriva anormal de la fluorescencia durante los ciclos iniciales de la carrera, dando lugar a una línea ascendente no sigmoidea. Si ve este efecto, en el menú Setting, seleccione la opción Apply Fluorescence Drift Correction dentro de Baseline Settings para corregirlo.
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada. Algunos pocillos pueden tener una deriva anormal de la fluorescencia durante los ciclos iniciales de la carrera, dando lugar a una línea ascendente no sigmoidea. Si ve este efecto, por favor modifique la línea base (Baseline): Seleccione los valores para Start Cycle y End Cycle de forma que la línea base termine antes de comienzo de la detección de un aumento significativo de la fluorescencia.
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene®Q Qiagen	FAM	Green	Durante la configuración de los canales (Channel Setup), presione el botón "Gain Optimisation" y después vaya a "Optimise Acquiring". La fluorescencia del apartado Target Sample Range tiene que estar entre 5 y 10 FI para cada canal. Además, marque la opción "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Mic Real Time PCR Cycler bms	FAM	Green	En el menú "Run Profile", introduzca los parámetros correctos para "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) y el protocolo térmico apropiado. En la ventana "Cycling", seleccione la opción "Acquire on" para todos los canales haciendo click sobre ellos. Utilice los valores de "Gain" que aparecen por defecto para cada canal (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10).
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Tabla A3: Canales de detección de fluorescencia de diferentes equipos de PCR a Tiempo Real



ANEXO 3

CONFIGURACIÓN DE LOS VALORES DE EXPOSICIÓN

Los parámetros de exposición de algunos termocicladores deben ajustarse para su adecuación y correcto funcionamiento con los test "VIASURE Real Time PCR Detection Kits". Este ensayo ha sido validado con los siguientes valores de exposición:

- DTprime Real-time Detection Thermal Cyclers (DNA-Technology) y VIASURE 96 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): canal FAM -500*, canal HEX - 1000, canal ROX - 1000 y canal Cy5 -1000.
- DTLite Real-Time PCR System (DNA-Technology) y VIASURE 48 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): canal FAM -500, canal HEX - 500, canal ROX - 500 y canal Cy5 – 500.

*Si el resultado en el canal FAM no es el esperado, no hay amplificaciones o se observa elevado ruido de fondo, por favor, baje los valores de exposición indicados anteriormente hasta 150.



- CFX™ and IQ5™ are registered trademarks of Bio-Rad Laboratories.
- ABI®, QuantStudio™ and ViiA™ are registered trademarks of Thermo Fisher Scientific Inc.
- LightCycler® is a registered trademark of Roche.
- Mx3000P™, Mx3005™ and AriaMx are registered trademarks of Agilent Technologies.
- Mastercycler™ is a registered trademark of Eppendorf.
- Rotor-Gene®Q is a registered trademark of Qiagen.
- SmartCycler® is a registered trademark of Cepheid.

Revision: November 2019







CerTest Biotec, S.L.

Pol. Industrial Río Gállego II · Calle J, Nº1
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (Spain)
www.certest.es



VIASURE online

F-349 rev00

VIASURE



Real Time PCR Detection Kits

CerTest
BIOTEC