

Vitassay qPCR

Malaria 5

PCR en tiempo real para la detección cualitativa y diferenciación de *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* y/o *Plasmodium knowlesi* en muestras clínicas.

Real-time PCR kit for the qualitative detection and differentiation of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* and/or *Plasmodium knowlesi* in clinical samples.



Uso previsto

Vitassay qPCR Malaria 5, permite la detección y diferenciación de *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* y/o *Plasmodium knowlesi* mediante PCR a tiempo real en muestras clínicas. Este producto está destinado para facilitar el diagnóstico diferencial de infecciones producidas por *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* y/o *Plasmodium knowlesi*.

Referencias

Vitassay qPCR Malaria 5, 8x8-well strip, low profile	7041050
Vitassay qPCR Malaria 5, 8x8-well strip, high profile	7042050

Materiales/Reactivos suministrados

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7041S050A/ 7042S050A	<i>P. malariae</i> , <i>P. knowlesi</i> & <i>P. ovale</i> strips low/high profile	-	4 tiras de 8 pocillos
7041S050B/ 7042S050B	<i>P. falciparum</i> + <i>P. vivax</i> strips low/high profile	-	4 tiras de 8 pocillos
7C050	Malaria 5 Positive Control	rojo	1 vial
7001A	PCR grade water	blanco	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension buffer	verde	1 vial x 1,8 mL
7003N	Negative control	amarillo	1 vial x 1 mL
7004O	Tapas ópticas	-	8 tiras de 8 tapones

Condiciones de Transporte y conservación

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- El control positivo resuspendido debe ser almacenado a -20°C. Para evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación, se recomienda distribuir en alícuotas.
- Conservar los reactivos en oscuridad.

Material y equipamiento necesario, pero no proporcionado

- Kit de extracción de DNA
- Equipo de PCR a tiempo real (ver Adjunto I)
- Centrífuga para tubos de 1,5 mL
- Vórtex
- Micropipetas (1-20 μ L, 20-200 μ L)
- Puntas con filtro
- Guantes desechables sin polvo

Resumen

La malaria es una enfermedad potencialmente mortal causada por parásitos que se transmiten a las personas a través de las picaduras de mosquitos *Anopheles* hembras infectadas. Los mosquitos que transmiten la malaria se encuentran en África, América Central y del Sur, partes del Caribe, Asia, Europa del Este y el Pacífico Sur. La malaria causa altos niveles de morbilidad y mortalidad en los seres humanos en todo el mundo. En 2018, se estimaron 228 millones de casos de malaria en todo el mundo. El número estimado de muertes por malaria fue de 405 000 en 2018. No hay vacuna contra la malaria.

La malaria es causada por parásitos que pertenecen al género *Plasmodium*. Cinco especies de *Plasmodium* causan enfermedades en humanos: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* y *P. knowlesi*. Dos de estas especies, *P. falciparum* y *P. vivax*, representan la mayor amenaza.

P. falciparum es letal y responsable de la patología grave de la enfermedad y de la mayoría de las muertes por malaria, especialmente en el África subsahariana. En 2018, *P. falciparum* representó el 99.7% de los casos estimados de malaria en la Región de África de la OMS, el 50% de los casos en la Región de Asia Sudoriental de la OMS, el 71% de los casos en el Mediterráneo Oriental y el 65% en el Pacífico Occidental. Si no se trata dentro de las 24 horas, la malaria por *P. falciparum* puede progresar a una enfermedad grave, que a menudo conduce a la muerte.

P. vivax es la más extendida de todas las especies de malaria y puede causar infecciones graves, incluso fatales. Es el parásito de la malaria más común que causa enfermedades clínicas fuera de África. *P. vivax* es altamente prevalente en Asia endémica y América del Sur y es el parásito predominante en la Región de las Américas de la OMS, representando el 75% de los casos de malaria. La malaria por *P. vivax* está asociada con una morbilidad severa y con mortalidad.

P. ovale demostró ser dos especies distintas (*P. ovale curtisi* y *P. ovale wallikeri*), que solo difieren en un período de latencia más corto en *P. ovale wallikeri* y en diferencias de secuencia genética. Estos dos organismos simpátricos son difícilmente distinguibles

pues se presentan con el mismo síndrome clínico y responden a la misma terapia. Las dos especies simpátricas de *P. ovale* producen etapas hepáticas latentes que pueden recaer meses después de la infección inicial y también están asociadas con síndromes graves y potencialmente mortales.

P. malariae es la forma más benigna de infección de malaria con varias características clínicas distintas. *P. malariae* está presente en la mayoría de los entornos endémicos de malaria y se asocia con un transporte de parásitos muy prolongado, anemia severa e insuficiencia renal. *P. malariae* a menudo se considera que causa una malaria crónica que pueden durar décadas.

P. knowlesi se encuentra en una distribución limitada en Malasia / Indonesia Borneo con casos reportados en otros países del sudeste asiático. *P. knowlesi* no es único entre las malarías de vertebrados no humanos que se han transmitido a los humanos. La enfermedad se presenta como otras malarías con fiebre / escalofríos y dolor de cabeza y con características poco comunes como náuseas / vómitos, mialgia / artralgia, síntomas de las vías respiratorias superiores e ictericia. Aunque es raro, se han producido complicaciones fatales de *P. knowlesi* y lo hacen con mayor frecuencia que la observada en *P. vivax* y *P. falciparum* proporcionalmente.

Los síntomas de la malaria generalmente aparecen en 7 a 30 días, pero pueden tardar hasta un año en desarrollarse. En un individuo no inmune, los síntomas generalmente aparecen 10-15 días después de la picadura del mosquito infeccioso. Los primeros síntomas (fiebre, dolor de cabeza y escalofríos, pero sin alteración grave de los órganos) pueden ser leves y difíciles de reconocer como malaria y pueden ser causado por todas las *Plasmodium* spp. Por otro lado, la malaria severa es la forma más peligrosa de la enfermedad con numerosas complicaciones como anemia severa y daño de múltiples órganos, incluido el cerebro (malaria cerebral), pulmones y riñones, y es producida principalmente por *P. falciparum*. Sin embargo, también puede ser causada por *P. vivax* o *P. knowlesi* a una frecuencia mucho más baja.

Los niños menores de 5 años son el grupo más vulnerable afectado por la malaria; en 2018, representaron aproximadamente dos tercios de todas las muertes por malaria en todo el mundo. Los niños con malaria grave con frecuencia desarrollan uno o más de los siguientes síntomas: anemia severa, dificultad respiratoria en relación con la acidosis metabólica o malaria cerebral. En adultos, el fallo multiorgánico también es frecuente. Además, en áreas endémicas de malaria, las personas pueden desarrollar inmunidad parcial, lo que permite que ocurran infecciones asintomáticas.

Las herramientas de diagnóstico de la malaria se han expandido más allá del examen microscópico convencional de las películas de sangre teñidas con Giemsa. Han surgido técnicas contemporáneas e innovadoras, principalmente las pruebas de diagnóstico

rápido (RDT) y otros métodos de diagnóstico molecular como PCR, qPCR y amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP). El diagnóstico temprano y preciso de la malaria es de suma importancia para garantizar la administración adecuada del tratamiento, reducir la enfermedad y prevenir las muertes.

Principio del test

Vitassay qPCR Malaria 5 se basa en la amplificación a tiempo real de una región diana conservada del gen 18S rRNA para *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* y *P. knowlesi*. en muestras de sangre total. Tras la extracción de DNA, la presencia de los virus se detecta mediante un aumento de la fluorescencia observada durante la reacción, tras la hidrólisis de la sonda fluorescente.

El ensayo está basado en la actividad 5' exonucleasa que utiliza dos *primers* y una sonda de hidrolisis fluorogénica para detectar la acumulación de la secuencia diana amplificada durante la reacción de PCR. Cuando la polimerasa comienza a extender los primers, la sonda es hidrolizada mediante su actividad exonucleasa 5'- 3' produciendo la separación espacial del fluoróforo y el *quencher*. El aumento de la señal fluorescente resultante es proporcional a la cantidad de producto amplificado en la muestra y es detectado mediante un equipo de PCR en tiempo real.

Vitassay qPCR Malaria 5, se trata de un test *listo para usar* que contiene en cada pocillo todos los reactivos necesarios en formato estabilizado para llevar a cabo la PCR a tiempo real. Además, un control interno permite la detección de una posible reacción de inhibición. Cada kit incluye dos tipos de tiras y cada una de ellas corresponde a un ensayo diferente. La primera tira (*P. malariae*, *P. knowlesi* & *P. ovale* strips low/high profile) contiene la mezcla de reacción multiplex para la detección de *P. malariae*, *P. knowlesi* y/o *P. ovale*. 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 interno (CI) se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (según el equipo utilizado). La segunda tira (*P. falciparum* + *P. vivax* strips low/high profile) contiene la mezcla de reacción multiplex para la detección de *P. falciparum* y/o *P. vivax*. Tras la reacción de amplificación *P. falciparum* se detecta en el canal FAM, *P. vivax* se detecta en el canal ROX (según el equipo utilizado) y el control interno (CI) se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (según el equipo utilizado).

Precauciones

- Diseñado para uso profesional de diagnóstico *in vitro*.
- No utilizar el kit después de la fecha de caducidad.
- No mezclar reactivos de otros kits y/o diferentes lotes.
- No utilizar si el kit tiene signos de haber sido abierto o manipulado.
- No utilizar el kit si el material desecante de los diferentes sobres de aluminio está dañado o no está.
- Se recomienda proteger los tubos de la humedad ya que una exposición prolongada puede afectar al rendimiento del producto.
- Trabajar siguiendo las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes desechables, gafas y mascarilla.
- No comer, beber o fumar en la zona de trabajo.
- Es importante seguir un flujo de trabajo en el laboratorio unidireccional: Área de Extracción, Área de Amplificación y Detección. No retornar muestras, equipos ni reactivos a un área anterior.
- Las muestras y todo material en contacto con ellas se deben tratar como potencialmente infecciosos y se deben gestionar 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.

Procedimiento

Toma de muestra, preparación y 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. Realizar el pretratamiento y el aislamiento de los ácidos nucleicos utilizando un sistema manual o automático compatible con ensayos de PCR en tiempo real. Seguir las instrucciones de uso del fabricante. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

- Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec).
- MagDEA Dx SV kit, utilizando magLEAD® 6gC instrument (Precision System Science Co.).
- EZ1 DNA Blood Kit (QIAGEN), utilizando BioRobot EZ1 DSP Workstation (QIAGEN).

Preparación del control positivo

Reconstituir el contenido liofilizado del Malaria 5 Positive Control (tubo rojo) con 200 μL de agua ultrapura (PCR grade water, tubo blanco). Mezclar hasta conseguir una suspensión homogénea con ayuda del vórtex. Después del primer uso, dispensar en alícuotas para evitar repetidos ciclos de congelación-descongelación y almacenarlo a -20°C .

El control positivo contiene una gran cantidad de copias molde y el riesgo de contaminación es elevado. Por lo tanto, se recomienda abrir y manipular en un área del laboratorio separada de los otros componentes del kit y de las muestras a analizar.

Preparación de la reacción

- Preparar el número de pocillos necesarios incluyendo muestras y controles (un control positivo y uno negativo).
- Retirar el sello de aluminio que protege las tiras.
- Pipetear 15 μL de la solución de resuspensión (tubo verde) y añadirlos en cada pocillo.
- Pipetear 5 μL de DNA extraído, Control Negativo (tubo amarillo) y Control positivo (tubo rojo) y añadirlos en los pocillos correspondientes.
- Cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Centrifugar brevemente (opcional).
- Colocar las tiras en el equipo de PCR a tiempo real.

Programación del termociclador

Configurar el termociclador siguiendo las siguientes instrucciones:

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

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de hibridación (*) a través de los canales FAM (*P. malariae* y *P. falciparum*), HEX, JOE o VIC (Control Interno), ROX (*P. knowlesi* y *P. vivax*), y Cy5 (*P. ovale*). 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 esta desactivada (ver Adjunto II).

Análisis e interpretación de resultados

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.

Antes de analizar el resultado de las muestras clínicas debe validarse el resultado de los controles:

Control positivo

El control positivo utilizado en cada serie debe mostrar una curva de amplificación en los canales FAM (*P. malariae* y *P. falciparum*), HEX, JOE o VIC (Control Interno), ROX (*P. knowlesi* y *P. vivax*), y Cy5 (*P. ovale*).

Control negativo

El control negativo incluido en cada serie debe mostrar la ausencia de señal de FAM, HEX (o JOE o VIC), ROX, y Cy5.

El experimento es inválido si hay señal de amplificación en el control negativo o ausencia de la señal en el control positivo. El ensayo se debe de repetir.

Interpretación de los resultados

Los resultados de la primera tira que contiene la mezcla de reacción multiplex para la detección de *P. malariae*, *P. knowlesi* y *P. ovale* se interpretan de la siguiente manera:

<i>P. malariae</i>	<i>P. knowlesi</i>	<i>P. ovale</i>	Control Interno	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> y <i>P. knowlesi</i> Negativo
-	-	-	-	-	+	Inválido
+	+	+	+	+	-	Inválido

Positivo (+): Señal de amplificación

Negativo (-): No hay señal de amplificación

Los resultados de la segunda tira que contiene la mezcla de reacción multiplex para la detección de *P. falciparum* y *P. vivax* se interpretan de la siguiente manera:

<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	Control Interno	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

Positivo (+): Señal de amplificación

Negativo (-): No hay señal de amplificación

Si no se detecta señal de amplificación en el control positivo y/o presenta señal en el control negativo, el experimento se considera fallido.

Si las muestras negativas para todos los patógenos no muestran un resultado positivo para el control interno, se debe repetir el ensayo diluyendo la muestra original 1:10 o repetir la extracción de los ácidos nucleicos debido a posibles problemas causados por inhibidores de PCR.

Control de Calidad

Con el fin de confirmar el correcto funcionamiento de la técnica de diagnóstico molecular, se incluye un Control Interno (CI). Además, un control positivo y uno negativo se debe de incluir en cada ensayo para una correcta interpretación de los resultados.

Características técnicas

Sensibilidad y especificidad clínica

Para analizar la sensibilidad y la especificidad clínica se realizó un ensayo clínico comparativo y se evaluaron 226 muestras de muestras de sangre. Este estudio comparativo se llevó a cabo con los test de diagnóstico molecular Vitassay qPCR Malaria 5 y FTD Malaria differentiation (Fast Track Diagnostics).

Vitassay qPCR Malaria 5 detectó *P. malariae* en 2 muestras al igual que el test FTD Malaria differentiation (Fast Track Diagnostics). Ambos ensayos detectaron *P. ovale* en 2 muestras positivas. Vitassay qPCR Malaria 5 detectó *P. vivax* en 5 muestras al igual que el test FTD Malaria differentiation (Fast Track Diagnostics). Para *P. falciparum* un total de 55 muestras fueron positivas para ambos ensayos.

Los valores de sensibilidad y especificidad para Vitassay qPCR Malaria 5 en comparación con FTD Malaria differentiation (Fast Track Diagnostics) se muestran en la siguiente tabla:

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

Estos resultados muestran la alta sensibilidad y especificidad para detectar *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* y/o *Plasmodium malariae* del kit de diagnóstico molecular Vitassay qPCR Malaria 5.

Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica fue determinada a partir de diluciones seriadas (1:10) del DNA molde de los diferentes virus (10^7 - 10^1 copias/reacción). Este ensayo tiene un límite de detección de ≥ 10 copias de DNA viral por reacción.

Especificidad analítica

La especificidad analítica para la detección de los patógenos de Malaria fue confirmada probando un panel compuesto por los siguientes microorganismos, no observándose reacciones cruzadas entre ninguna de las especies:

Cepas empleadas en las pruebas de reactividad 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>	Virus Chikungunya WHO IS (R91064)	Virus Zika cepa 11474/16 (French Polynesia)
<i>Borrelia japónica</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)		

Reactividad analítica

Vitassay qPCR Malaria 5 ha sido evaluado con las siguientes cepas *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* y *Plasmodium knowlesi*, obteniéndose un resultado positivo para todos ellos.

Termocicladores compatibles

Vitassay qPCR Malaria 5, ha sido probado en los siguientes equipos:

- Cobas z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^{II}
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen) ^I
- SmartCycler® (Cepheid) ^I

I: Para los equipos Rotor-Gene® Q y SmartCycler® el producto debe ser reconstituido y trasvasado a los tubos específicos de cada uno de los equipos.

II: En el caso de utilizar el equipo Applied Biosystems 7500 Fast con tiras, se recomienda colocar el soporte adecuado para los tubos (Ref. PN 4388506).

Limitaciones

- Todos los resultados obtenidos deben ser interpretados por un especialista junto con la información clínica y los hallazgos de laboratorio disponibles.
- Este ensayo ha sido probado en muestras de sangre total. El uso de otras muestras no se ha establecido.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el DNA deber 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 DNA 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 los diferentes virus, 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.

Adjunto I: Compatibilidad de los termocicladores a tiempo real más usuales

Los termocicladores más usuales se enumeran en la siguiente tabla separados por tipo de tubo. Si no encuentra su termociclador, póngase en contacto con su proveedor:

Termocicladores con bloque de bajo perfil	Termocicladores con bloque de alto perfil
Agilent Technologies	Abbott
AriaMx Real-Time PCR System	Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems	Applied Biosystems
7500 Fast Real-Time PCR System	7300 Real-Time PCR System
7500 Fast Dx Real-Time PCR System	7500 Real-Time PCR System
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast	7900 HT Real-Time PCR System
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7000
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7700
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
StepOne Plus™ Real-Time PCR System	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
StepOne™ Real-Time PCR System	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
BIONEER	ViiA™ 7 Real-Time PCR
Exicycler™ 96	Analytik Jena Biometra
Bio-Rad	TOptical
CFX96™ Real-Time PCR Detection System	qTOWER 2.0
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System	BIONEER
Cepheid	Exicycler™ 96
SmartCycler®	Bio-Rad
Qiagen	CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection
Rotor-Gene® Q	iCycler iQ™ Real-Time PCR
Roche	iCycler iQ™ 5 Real-Time PCR
LightCycler® 480 Real-Time PCR System	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System
LightCycler® 96 Real-Time PCR System	MyiQ™ 2 Real-Time PCR Detection System
Cobas z480 Analyzer	Cepheid
	SmartCycler®
	DNA-Technology
	DTlite Real-Time PCR System*
	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler*
	Eppendorf
	Mastercycler™ ep <i>realplex</i>
	Qiagen
	Rotor-Gene® Q
	Stratagene / Agilent Technologies
	Mx3000P™ Real Time PCR System
	Mx3005P™ Real Time PCR System

* Ver Adjunto III para configurar los valores de exposición

Adjunto II: Canales de detección de los equipos a tiempo real

Los canales de fluorescencia de algunos de los termocicladores a tiempo real más comunes se especifican en la siguiente tabla:

Termociclador	Canal Vitassay	Canal de Detección	Observaciones
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	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	Al configurar los canales, 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	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Adjunto III: Configuración valores de exposición

Los valores de exposición de algunos termocicladores se deben ajustar para su correcto funcionamiento. Establecer los valores de exposición de la siguiente manera:

Termociclador	Canal Vitassay	Valor de exposición
DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

Intended use

Vitassay qPCR Malaria 5 allows the detection and differentiation of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* and/or *Plasmodium knowlesi* by real-time PCR in clinical samples. The product is intended for use in the diagnosis of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* and/or *Plasmodium knowlesi* alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes.

References

Vitassay qPCR Malaria 5, 8x8-well strip, low profile	7041050
Vitassay qPCR Malaria 5, 8x8-well strip, high profile	7042050

Materials/reagents provided

Reference	Reagent/Material	Colour	Amount
7041S050A/ 7042S050A	<i>P. malariae</i> , <i>P. knowlesi</i> & <i>P. ovale</i> strips low/high profile	-	4 x 8-well strip
7041S050B/ 7042S050B	<i>P. falciparum</i> + <i>P. vivax</i> strips low/high profile	-	4 x 8-well strip
7C050	Malaria 5 Positive Control	red	1 vial
7001A	PCR grade water	white	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension Buffer	green	1 vial x 1,8 mL
7003N	Negative control	yellow	1 vial x 1 mL
7004O	Optical caps	-	8 x 8 cap strip

Transport and storage

- The reagents and the test can be shipped and stored at 2-40°C until expiration date stated in the label.
- The resuspended positive control should be stored at -20°C. In order to avoid repeated freeze/thaw cycles, it is recommended to distribute the content in different aliquots.
- Keep all reagents in the darkness.

Additional equipment and material required

- DNA extraction kit
- Real-time PCR instrument (thermocycler) (Attached I)
- Centrifuge for 1.5 mL tubes

- Vortex
- Micropipettes (1-20 µL, 20-200 µL)
- Filter tips
- Powder-free disposal gloves

Summary

Malaria is a life-threatening disease caused by parasites that are transmitted to people through the bites of infected female *Anopheles* mosquitoes. The mosquitoes that spread malaria are found in Africa, Central and South America, parts of the Caribbean, Asia, Eastern Europe, and the South Pacific. Malaria causes high levels of morbidity and mortality in human beings worldwide. In 2018, there were an estimated 228 million cases of malaria worldwide. The estimated number of malaria deaths stood at 405 000 in 2018. There is no malaria vaccine.

Malaria is caused by parasites belonging to the *Plasmodium* genus. Five species of *Plasmodium* are known to cause disease in humans: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, and *P. knowlesi*. Two of these species – *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* – pose the greatest threat.

P. falciparum is lethal and responsible for severe disease pathology and the majority of deaths due to malaria, especially in sub-Saharan Africa. In 2018, *P. falciparum* accounted for 99.7% of estimated malaria cases in the WHO African Region, 50% of cases in the WHO South-East Asia Region, 71% of cases in the Eastern Mediterranean and 65% in the Western Pacific. If not treated within 24 hours, *P. falciparum* malaria can progress to severe illness, often leading to death.

P. vivax is the most widespread of all the malaria species and can cause severe, even fatal infections. *P. vivax* is the most common malaria parasite causing clinical disease outside of Africa. *P. vivax* is highly prevalent across endemic Asia and South America. *P. vivax* is the predominant parasite in the WHO Region of the Americas, representing 75% of malaria cases. *P. vivax* malaria is associated with severe morbidity and with mortality.

P. ovale was shown to be two distinct species (*P. ovale curtisi* and *P. ovale wallikeri*), which only differ by a shorter latency period in *P. ovale wallikeri* and genetic sequence differences. These two sympatric organisms are difficult to distinguish since they present with the same clinical syndrome and respond to the same therapy. The two sympatric species of *P. ovale* produce dormant liver stages that can relapse months after the initial infection and are also associated with severe and life-threatening syndromes.

P. malariae is the most benign form of malaria infection with several distinct clinical features. *P. malariae* is present in most malaria-endemic settings and associated with greatly prolonged parasite carriage, severe anemia, and renal impairment. *P. malariae* is often considered to cause a chronic malaria they may last decades.

P. knowlesi is found in a limited distribution in Malaysian/Indonesian Borneo with cases reported in other southeast Asian countries. *P. knowlesi* is not unique among the nonhuman vertebrate malarial parasites that have been transmitted to humans. The disease presents like other malarial parasites with fever/chills and headache with uncommon features like nausea/vomiting, myalgia/arthralgia, upper respiratory symptoms, and jaundice. Although rare, fatal complications of *P. knowlesi* have occurred and do so with higher frequency than seen in *P. vivax* and *P. falciparum* proportionally.

Malaria symptoms usually appear within 7 to 30 days but can take up to one year to develop. In a non-immune individual, symptoms usually appear 10–15 days after the infective mosquito bite. The first symptoms – fever, headache, and chills but no serious organ disturbance – may be mild and difficult to recognize as malaria. This can be caused by all the *Plasmodium* spp. Severe malaria, on the other hand, is the most dangerous form of the disease with numerous complications such as severe anemia and multiple organ damage, including the brain (cerebral malaria), lungs, and kidneys and is mainly produced by *P. falciparum*. Nonetheless, it can also be caused by *P. vivax* or *P. knowlesi* at a much lower frequency.

Children under 5 years of age are the most vulnerable group affected by malaria; in 2018, they accounted for about two thirds of all malaria deaths worldwide. Children with severe malaria frequently develop one or more of the following symptoms: severe anemia, respiratory distress in relation to metabolic acidosis, or cerebral malaria. In adults, multi-organ failure is also frequent. Moreover, in malaria endemic areas, people may develop partial immunity, allowing asymptomatic infections to occur.

Malaria diagnostic tools have expanded beyond the conventional microscopic examination of Giemsa-stained blood films. Contemporary and innovative techniques have emerged, mainly the rapid diagnostic tests (RDT) and other molecular diagnostic methods such as PCR, qPCR and loop-mediated isothermal amplification (LAMP). Early and accurate diagnosis of malaria is of paramount importance to ensure appropriate administration of treatment, reduce disease and prevent deaths.

Principle of the test

Vitassay qPCR Malaria 5 test is based on the real-time amplification of a conserved target region of the 18S rRNA gene for *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* and/or *Plasmodium knowlesi* in whole blood samples. After DNA extraction, the presence of viruses is detected by an increase in the fluorescence observed during the reaction, after hydrolysis of the fluorescent probe.

The assay is based on 5' nuclease activity using two primers and a fluorogenic hydrolysis probe to detect accumulation of the amplified target sequence during the PCR reaction. When the polymerase begins to spread the primers, the probe is hydrolyzed by its exonuclease 5'-3' activity causing the spatial separation of the

fluorophore and the quencher. The increase in the resulting fluorescent signal is proportional to the amount of amplified product in the sample and is detected by means of real-time PCR equipment.

Vitassay qPCR Malaria 5 test is a ready-to-use test which contains in each well all the necessary reagents for real-time PCR assay in a stabilized format. In addition, an internal control allows the detection of a possible reaction inhibition. Each kit includes two kind of strips and each one corresponds to one different assay. The first strip (*P. malariae*, *P. knowlesi* & *P. ovale* strips low/high profile) contains the multiplex reaction mix for the detection of *P. malariae*, *P. knowlesi* and/or *P. ovale*. The second strip (*P. falciparum* + *P. vivax* strips low/high profile) contains the multiplex reaction mix for the detection of *P. falciparum* and/or *P. vivax*. *P. malariae* and *P. falciparum* DNA targets are amplified and detected in FAM channel, *P. knowlesi* and *P. vivax* DNA targets are amplified and detected in ROX channel, the internal control (IC) DNA targets is amplified and detected in HEX, VIC or JOE channel (depending on the equipment used) and *P. ovale* DNA targets are amplified and detected in Cy5 channel.

Precautions

- For *in vitro* diagnostic use.
- Do not use after expiration date.
- Do not mix components from different kits and/or lots.
- Do not use if package is open or damaged.
- Do not use the kit if the desiccant from the different reagents is not present or broken or if the foil has been broken or damaged.
- Protect the kit against humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposal gloves, goggles and mask.
- Do not eat, drink or smoke in the working area.
- The laboratory process must be one-directional, it should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Areas. Do not return samples, equipment and reagents to the area in which the previous step was performed.
- Specimens and reagents/materials that have been exposed to them must be treated as potentially infectious. 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.

Procedures

Specimen collection, processing and DNA extraction

Perform the sample preparation according to the recommendations appearing in the instructions for use of the extraction kit used. For pre-treatment and nucleic acid isolation, it is recommended to use your optimized manual or automatic system compatible with real-time PCR technology. The assay has been validated with the following extraction kits:

- Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec).
- MagDEA Dx SV kit, utilizando magLEAD® 6gC instrument (Precision System Science Co.).
- EZ1 DNA Blood Kit (QIAGEN), utilizando BioRobot EZ1 DSP Workstation (QIAGEN).

Positive control preparation

Reconstitute the lyophilized Malaria 5 Positive Control (red tube) in the 200 µL of PCR grade water (white tube). To ensure a complete resuspension, vortex the tube thoroughly. After first use, dispense into aliquots in order to avoid multiple freeze-thaw cycles, and store them at -20°C.

This component contains high copies number template and is a very significant contamination risk. Therefore, we recommend open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components and samples.

Reaction setup

- Separate the number of required reactions including samples and controls. Remember that one positive and one negative control must be included in each run.
- Peel off protective aluminium seal from the strips.
- Pipette 15 µL of Resuspension buffer (green tube) and add them into each well.
- Pipette 5 µL of DNA sample, negative and positive controls and add them into each well.
- Cover the wells with the caps provided. Spin down briefly (optional).
- Place the strips in the Real-time PCR instrument.

Programme your thermocycler

Set your thermocycler following the conditions below:

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

Set the fluorescence data collection during the extension step (*) through the FAM (*P. malariae* and *P. falciparum*), HEX, JOE or VIC (Internal Control (IC)), ROX (*P. knowlesi* and *P. vivax*), and Cy5 channels (*P. ovale*). If you use the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System or the Stratagene Mx3005P™ check that passive reference option ROX is none. (Attached II)

Analysis and interpretation of results

The analysis of the results is done by the software itself of the used real-time PCR system following manufacturer's instructions.

For a valid diagnostic test run, the following control conditions must be met:

Positive control

The positive controls used in each run, must show an amplification curve for FAM (*P. malariae* and *P. falciparum*), HEX, JOE or VIC (Internal Control), ROX (*P. knowlesi* and *P. vivax*) and Cy5 (*P. ovale*), which validates the reaction.

Negative control

The negative controls included in each run, must show the absence of signal in FAM, ROX, HEX and Cy5 which validates the reaction.

The experiment seems to be failed if there is signal of amplification in negative control or absence of signal in the positive well. The assay should be repeated.

Interpretation of results for *P. malariae*, *P. knowlesi* & *P. ovale* strips:

The results of the first strip containing the multiplex reaction mixture for the detection of *P. malariae*, *P. knowlesi* and *P. ovale* are interpreted as follows:

<i>P. malariae</i>	<i>P. knowlesi</i>	<i>P. ovale</i>	Internal Control	Negative Control	Positive Control	Interpretation
+	+	+	+/-	-	+	<i>P. malariae</i> , <i>P. knowlesi</i> and <i>P. ovale</i> Positives
-	-	-	+	-	+	<i>P. malariae</i> , <i>P. knowlesi</i> and <i>P. ovale</i> Negatives
+	-	-	+/-	-	+	<i>P. malariae</i> Positive, <i>P. knowlesi</i> and <i>P. ovale</i> Negatives
+	+	-	+/-	-	+	<i>P. malariae</i> and <i>P. knowlesi</i> Positives, and <i>P. ovale</i> Negative
+	-	+	+/-	-	+	<i>P. malariae</i> and <i>P. ovale</i> Positives, and <i>P. knowlesi</i> Negative
-	+	-	+/-	-	+	<i>P. knowlesi</i> Positive, <i>P. malariae</i> and <i>P. ovale</i> Negatives
-	+	+	+/-	-	+	<i>P. knowlesi</i> and <i>P. ovale</i> Positives, <i>P. malariae</i> Negative
-	-	+	+/-	-	+	<i>P. ovale</i> Positive, <i>P. malariae</i> and <i>P. knowlesi</i> Negative
-	-	-	-	-	+	Experiment fail
+	+	+	+	+	-	Experiment fail

(+) **Positive:** Amplification signal

(-) **Negative:** No amplification signal

Interpretation of results for *P. falciparum* + *P. vivax* strips:

The results of the second strip containing the multiplex reaction mixture for the detection of *P. falciparum* and *P. vivax* are interpreted as follows:

<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	Internal Control	Negative Control	Positive Control	Interpretation
+	+	+/-	-	+	<i>P. falciparum</i> and <i>P. vivax</i> Positives
-	-	+	-	+	<i>P. falciparum</i> and <i>P. vivax</i> Negatives
+	-	+/-	-	+	<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

(+) **Positive:** Amplification signal

(-) **Negative:** No amplification signal

If amplification signal is detected in the negative control and / or no signal is present in the positive control, the experiment is considered unsuccessful.

If the negative samples do not show a positive result for the internal control, they should be retested from the diluted original sample 1:10 or the nucleic acid extraction has to be repeated due to possible problems caused by PCR inhibitors.

Quality Control

In order to confirm the appropriate performance of the molecular diagnostic technique, an Internal Control (IC) is included. Besides, a positive and a negative control must be included in each assay to interpret the results correctly.

Performance evaluation

Clinical sensitivity and specificity

To analyze sensitivity and clinical specificity, a comparative clinical trial was carried out and 226 blood samples were evaluated. This comparative study was carried out with the Vitassay qPCR Malaria 5 and FTD Malaria differentiation (Fast Track Diagnostics) molecular diagnostic tests.

Vitassay qPCR Malaria 5 detected *P. malariae* in 2 samples as well as the FTD Malaria differentiation test (Fast Track Diagnostics). Both tests detected *P. ovale* in 2 positive samples. Vitassay qPCR Malaria 5 detected *P. vivax* in 5 samples as well as the FTD Malaria differentiation test (Fast Track Diagnostics). For *P. falciparum* a total of 55 samples were positive for both tests.

Sensitivity and specificity for Vitassay qPCR Malaria 5 compared with FTD Malaria differentiation (Fast Track Diagnostics) are shown in next table:

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

These results show the high sensitivity and specificity to detect *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* and/or *Plasmodium knowlesi* using the molecular diagnostic test Vitassay qPCR Malaria 5.

Analytical sensitivity

The analytical sensitivity was determined by analysis of 10-fold dilution series of the template DNA of the different pathogens (10^7 - 10^1 copies / reaction). This assay has a limit of detection of ≥ 10 copies of DNA per reaction.

Analytical specificity

The analytical specificity for Malaria pathogens was tested within the panel of following microorganisms, where no cross-reactivity was seen between any of the species:

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 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>	Chikungunya virus WHO IS (R91064)	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

Analytical reactivity

Vitassay qPCR Malaria 5 has been evaluated with the following strains *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* and *Plasmodium knowlesi*, obtaining a positive result for all of them.

Compatibles real-time PCR equipment

Vitassay qPCR Malaria 5 has been validated on the following equipments:

- Cobas z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^{II}
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen) ^I
- SmartCycler® (Cepheid) ^I

I: For Rotor-Gene® Q and SmartCycler® thermocyclers the product should be reconstituted following the procedure and transferred into specific Rotor-Gene® Q and/or SmartCycler® tubes.

II: When using the Applied Biosystems 7500 Fast with strips it is recommend placing a plate holder for the tubes (Ref. PN 4388506).

Limitations

- All results must be interpreted together with other clinical information and laboratory findings available to the physician.
- This assay was tried with whole blood samples. The use of other samples has not been established.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper DNA from clinical specimens must be extracted.
- Extremely low levels of target below the limit of detection may be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by the different virus, either samples containing high concentrations of target DNA or contamination due to PCR products from previous reactions.

Attached I: Compatibility of the most common real-time PCR equipment

The most common thermocyclers are listed in the following table separated by tube type. If you do not find your thermocycler, please contact with your supplier.

Low profile Block Thermocyclers	High profile Block Thermocyclers
Agilent Technologies	Abbott
AriaMx Real-Time PCR System	Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems	Applied Biosystems
7500 Fast Real-Time PCR System	7300 Real-Time PCR System
7500 Fast Dx Real-Time PCR System	7500 Real-Time PCR System
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast	7900 HT Real-Time PCR System
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7000
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7700
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
StepOne Plus™ Real-Time PCR System	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
StepOne™ Real-Time PCR System	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
BIONEER	ViiA™ 7 Real-Time PCR
Exicycler™ 96	Analytik Jena Biometra
Bio-Rad	TOptical
CFX96™ Real-Time PCR Detection System	qTOWER 2.0
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System	BIONEER
Cepheid	Exicycler™ 96
SmartCycler®	Bio-Rad
Qiagen	CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection
Rotor-Gene® Q	iCycler iQ™ Real-Time PCR
Roche	iCycler iQ™ 5 Real-Time PCR
LightCycler®480 Real-Time PCR System	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System
LightCycler®96 Real-Time PCR System	MyiQ™ 2Real-Time PCR Detection System
Cobas z480 Analyzer	Cepheid
	SmartCycler®
	DNA-Technology
	DTlite Real-Time PCR System
	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler
	Eppendorf
	Mastercycler™ep <i>realplex</i>
	Qiagen
	Rotor-Gene® Q
	Stratagene / Agilent Technologies
	Mx3000P™ Real Time PCR System
	Mx3005P™ Real Time PCR System

* See Attached III to configure exposure settings.

Attached II: Detection channels of most common real time PCR equipment

The fluorescence detection channels of some of most common Real Time PCR Thermocyclers are specified in the following table:

REAL-TIME PCR THERMOCYCLER	Vitassay CHANNEL	DETECTION CHANNEL	OBSERVATIONS
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Colour Compensation 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 ROX is 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	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Attached III: Optical measurement exposure setting

The exposure values of some thermocyclers must be adjusted for proper operation. Set exposure values as follows:

Thermocycler	Vitassay channel	Exposure values
DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

Bibliography/Bibliografía

1. Centers for Disease Control and Prevention. Available from: <https://wwwnc.cdc.gov/travel/diseases/malaria> Accessed Jul 2020
2. World Health Organization. Malaria. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malaria> Accessed Jul 2020
3. Milner DA, Jr. (2018). Malaria Pathogenesis. Cold Spring Harbor perspectives in medicine. 8(1), a025569.
4. Garrido-Cardenas JA, González-Cerón L, Manzano-Agugliaro F, Mesa-Valle C. (2019). Plasmodium genomics: an approach for learning about and ending human malaria. Parasitol Res. 118(1):1-27.
5. Amir A, Cheong FW, De Silva JR, Lau YL. (2018). Diagnostic tools in childhood malaria. Parasit Vectors. 11(1):53.
6. Lover AA, Baird JK, Gosling R, Price RN. (2018). Malaria Elimination: Time to Target All Species. Am J Trop Med Hyg. 99(1):17-23.
7. Meibalan E, Marti M. (2017). Biology of Malaria Transmission. Cold Spring Harb Perspect Med. 7(3):a025452.
8. Menkin-Smith L, Winders WT. (2019). Malaria (Plasmodium Vivax). In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; May 4, 2019.

Trademarks

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™ and Mx3029™ 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.

Symbols for IVD components and reagents/ Símbolos utilizados para componentes y reactivos IVD

	Producto para diagnóstico <i>in vitro</i> For in vitro diagnostic use only		Almacenar en lugar seco Keep dry
	Consultar las instrucciones de uso Consult instructions for use		Limitación de temperatura Temperature limitation
	Fecha de caducidad Use by		Fabricante Manufacturer
	Número de lote Lot number		Contiene <n> test Contains sufficient for <n> test
DIL	Diluyente de muestra Buffer (sample diluent)		Número de referencia Catalogue number



VVA Vitassay

Vitassay Healthcare S.L.U. Parque Tecnológico Walqa
Ctra. N-330 Km. 566 • 22197 Huesca (Spain)

www.vitassay.com