

Instruções de uso

RealStar[®]

Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0

03/2019 PT

RealStar®

Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0

Para utilização com

Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)

VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)

ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)

ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)

Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)

Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)

CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

LightCycler® 480 Instrument II (Roche)



351013



2 x 48



03 2019



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

Conteúdo

1.	Utilização Prevista	6
2.	Componentes do Kit	6
3.	Armazenamento	7
4.	Materiais e Dispositivos requeridos mas não fornecidos.....	7
5.	Informação de Base	9
6.	Descrição do Produto.....	10
6.1	Instrumento de PCR em tempo real.....	12
7.	Avisos e Precauções	13
8.	Procedimento	14
8.1	Preparação de Amostras.....	14
8.2	Preparação da Master Mix.....	16
8.3	Preparação da Reação	17
9.	Programação dos instrumentos de PCR em tempo real.....	19
9.1	Definições	19
9.2	Detetores de fluorescência (corantes)	19
9.3	Perfil de Temperatura e Aquisição de Corante.....	20
10.	Análise de Dados	20
10.1	Validade dos Processamentos do Teste de Diagnóstico.....	21
10.1.1	Processamento de Teste de Diagnóstico Válido (qualitativo)	21
10.1.2	Processamento de Teste Inválido (qualitativo).....	21
10.2	Interpretação dos Resultados	22
10.2.1	Análise Qualitativa	22
11.	Avaliação do Desempenho.....	23

11.1	Sensibilidade Analítica	23
11.2	Especificidade Analítica	27
11.3	Precisão	28
12.	Limitações	30
13.	Controlo de Qualidade.....	31
14.	Apoio Técnico	31
15.	Bibliografia	31
16.	Marcas Comerciais e Isenções de Responsabilidade	32
17.	Explicação de Símbolos	33

1. Utilização Prevista

O RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 constitui uma análise de diagnóstico *in vitro*, baseada na tecnologia PCR em tempo real, para a deteção qualitativa e diferenciação do ADN agente patogénico humano das espécies de *Plasmodium* *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum*.

2. Componentes do Kit

O kit contém 2 ensaios PCR diferentes com 48 reações cada um. Inclui dois Controlo Positivo diferentes: um destinado ao sistema de deteção e amplificação específica de *Plasmodium (P.) knowlesi*, *P. malariae* e *P. ovale* e outro destinado ao sistema de deteção e amplificação específica de *P. falciparum* e *P. vivax*.

Cor cobertura	Componente	Número de tubos	Volume [µl/tubo]
Azul	Master A Pk/Pm/Po ¹⁾	4	60
Violeta	Master B Pk/Pm/Po ¹⁾	4	180
Azul Claro	Master A Pf/Pv ²⁾	4	60
Violeta Claro	Master B Pf/Pv ²⁾	4	180
Verde	Internal Control	1	1000
Vermelho	Positive Control Pk/Pm/Po ¹⁾	1	250
Laranja	Positive Control Pf/Pv ²⁾	1	250
Branco	Water (PCR grade)	1	500

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

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

3. Armazenamento

- O RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 é enviado em gelo seco. Os componentes do kit devem chegar congelados. Se um ou mais componentes não estiverem congelados no momento da receção, ou se algum tubo tiver ficado comprometido durante o envio, contacte a Altona Diagnostics GmbH para obter assistência.
- Todos os componentes devem ser conservados entre -25 °C e 15 °C depois do momento da entrega.
- Deve-se evitar o congelamento e descongelamento repetido de reagentes Master (mais do que duas vezes), pois isto poderá afetar o desempenho do ensaio. Os reagentes devem ser congelados em alíquotas se a sua utilização prevista for intermitente.
- O armazenamento entre +2 °C e +8 °C não deve exceder um período de duas horas.
- Proteger o Master A e o Master B da luz.

4. Materiais e Dispositivos requeridos mas não fornecidos

- Instrumento de PCR em tempo real adequado (consulte o capítulo 6.1. Instrumentos de PCR em tempo real)
- Sistema ou kit de extração de ácido nucleico adequado (ver capítulo 8.1 Preparação de amostras)
- Centrífuga de bancada com um rotor para tubos de reação de 2 ml
- Centrífuga com um rotor para placas de microtitulação, aquando da utilização de placas de reação com 96 poços
- Agitador vortex
- Placas de reação com 96 poços ou tubos de reação adequados com material de fecho (óticos) correspondente
- Pipetas (ajustáveis)
- Pontas de pipeta com filtros (descartáveis)

- Luvas sem pó (descartáveis)

NOTA

Certifique-se de que todos os instrumentos utilizados foram instalados, calibrados, verificados e mantidos de acordo com as instruções e recomendações do fabricante.

NOTA

É altamente recomendada a utilização do rotor de 72 poços com tubos de reação de 0,1 ml adequados, se utilizando o Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research) ou o Rotor-Gene® Q 5/6 plex (QIAGEN).

5. Informação de Base

A malária é uma doença transmitida por vetor, resultado de uma infeção causada por protozoários. Os parasitas do género *Plasmodium* são transmitidos aos seus hospedeiros vertebrados durante a refeição de sangue de um mosquito fêmea do género *Anopheles*, infetado. O ciclo de vida dos parasitas envolve uma mudança de hospedeiro do artrópode para o hospedeiro vertebrado e é bastante complexo, pode no entanto ser dividido em 3 fases principais. Estas fases baseiam-se no estágio de mosquito do parasita, no estágio no fígado humano e no estágio no sangue humano. Existem cinco espécies patogénicas de *Plasmodium* para o ser humano, nomeadamente *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium vivax* e *Plasmodium malariae* [1].

A doença da malária tem diferentes manifestações, dependendo da espécie de *Plasmodium* que causa a infeção. Em geral, os primeiros sintomas da malária são muito pouco específicos: febre, cefaleias, fraqueza generalizada do corpo, mialgia, arrepios, tonturas, dor abdominal, diarreia, náuseas e vómitos. *P. falciparum* e *P. knowlesi* podem causar malária grave nos seres humanos [2,3]. *P. falciparum* é responsável por uma taxa anual de casos fatais > 90%, principalmente em crianças [2].

P. knowlesi passa por uma fase eritrocítica curta (24 horas) durante a qual se reproduz rapidamente [4]. A hiperparasitemia resultante pode conduzir a complicações potencialmente fatais como insuficiência multiorgânica ou a morte do doente. Antes do desenvolvimento de um teste baseado em PCR específico para o *P. knowlesi*, era frequente o *P. knowlesi* ser erradamente diagnosticado como *P. malariae* com base nas parecenças fenotípicas ou como *P. vivax* com base nas parecenças genéticas [5].

Embora *P. vivax* seja considerado um parasita benigno, provoca manifestações clínicas incapacitantes e complicações potencialmente fatais como, por exemplo, anemia grave, trombocitopenia e paroxismos perigosos [6].

Uma infeção por *P. ovale* é frequentemente confundida com uma infeção por *P. vivax* devido à sua febre terçã. As infeções por ambas as espécies parasitas apresentam sintomas semelhantes e são tratadas de forma semelhante, a única diferença é a potencial gravidade de uma infeção por *P. vivax*. Além do mais, as infeções por *P. ovale* e *P. vivax* são caracterizadas por recaídas debilitantes recorrentes derivadas dos hipnozoítos dormentes que persistem em hepatócitos mesmo depois da eliminação dos parasitas [1].

As infeções por *P. malariae* caracterizam-se por parasitemia reduzida e uma evolução ligeira da doença.

O diagnóstico da malária por microscopia de esfregaços de sangue finos ou espessos por coloração de Giemsa é o método gold-standard [7]. Adicionalmente, são frequentemente usados testes de diagnóstico rápido e recomendados pela Organização Mundial de Saúde (OMS). No entanto, a sensibilidade e a especificidade destes métodos são altamente limitadas e dificilmente se consegue fazer a diferenciação das espécies de *Plasmodium* com qualquer uma das técnicas [8]. Há uma necessidade óbvia de ferramentas de diagnóstico mais sensíveis que sejam rápidas, rigorosas e permitam fazer a tipagem rigorosa da espécie de *Plasmodium*, para uma gestão e controlo eficazes da doença. As técnicas moleculares, como PCR em tempo real, são cada vez mais populares, porque são alternativas mais sensíveis, fiáveis [9,10] e fáceis de usar do que a gold-standard. As análises de diagnóstico específicas e sensíveis corretamente utilizadas podem evitar a utilização desnecessária de medicamentos antimaláricos e contribuir para

um tratamento apropriado e económico da doença.

- [1] Cowman AF, Healer J, Marapana D, Marsh K (2016), Malaria: Biology and Disease. Cell. 167(3):610-624.
- [2] Organização Mundial da Saúde (2015), Relatório mundial de 2015 da OMS sobre a malária. Organização Mundial da Saúde, Genebra, Suíça.
- [3] Cox-Singh J, Davis TM, Lee KS, Shamsul SS, Matusop A, Ratnam S, Rahman HA, Conway DJ, Singh B (2008), Plasmodium knowlesi malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. Clin Infect Dis., 46(2):165–71.
- [4] White NJ (2008), Plasmodium knowlesi: the fifth human malaria parasite. Clin Infect Dis., 15;46(2):172-3.
- [5] Divis PC, Shokoples SE, Singh B, and Yanow Stephanie K (2010), A TaqMan real-time PCR assay for the detection and quantitation of Plasmodium knowlesi. Malar J, 9:344.
- [6] Dhanpat K. Kochar, Vishal Saxena, Narvachan Singh, Sanjay K. Kochar, S. Vijay Kumar, and Ashis Das (2005), Plasmodium vivax Malaria. Emerg Infect Dis. 11(1):132-134.
- [7] Warhurst, D. C., and J. E. Williams (1996), Laboratory diagnosis of malaria. J. Clin. Pathol. 49:533-538.
- [8] Organização Mundial da Saúde (2000), WHO/MAL/2000.1091. New perspectives in malaria diagnosis. Organização Mundial da Saúde, Genebra, Suíça.
- [9] Snounou, G., S. Viriyakosol, W. Jarra, S. Thaithong, and K. N. Brown (1993), Identification of the four human malarial species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. Mol. Biochem. Parasitol. 58:283-292.
- [10] Sethabutr, O., A. E. Brown, S. Panyim, K. C. Kain, K. Webster, and P. Echeverria (1992), Detection of Plasmodium falciparum by polymerase chain reaction in a field study. J. Infect. Dis. 166:145-148.

6. Descrição do Produto

O RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 constitui uma análise de diagnóstico *in vitro*, baseada na tecnologia PCR em tempo real, para a deteção qualitativa e diferenciação do ADN agente patogénico humano das espécies de *Plasmodium*

Plasmodium malariae, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum*.

O RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 é composto por dois ensaios independentes, um destinado especificamente ao diagnóstico de *P. ovale*, *P. malariae* e *P. knowlesi* ADN e outro específico ao *P. vivax* e *P. falciparum* ADN.

Estes dois ensaios incluem um sistema de amplificação heteróloga (Controlo Interno) (Internal Control) para identificar possíveis inibições da PCR e para confirmar a integridade dos reagentes do kit.

A tecnologia de PCR em tempo real utiliza a reação em cadeia da polimerase (PCR) para a amplificação das sequências alvo específicas e das sondas alvo específicas para a deteção do ADN amplificado. As sondas estão marcadas com repórter fluorescente e corante quencher.

Mistura de Master Mix Pk/Pm/Po: A sonda específica ao *P. knowlesi* ADN é rotulada com fluoróforo ROX™, a sonda específica ao *P. malariae* ADN é rotulada com o fluoróforo FAM™ e a que é específica ao *P. ovale* ADN com o fluoróforo Cy®5.

Mistura de Master Mix Pf/Pv: A sonda específica ao *P. falciparum* ADN é rotulada com o fluoróforo FAM™ e a que é específica ao *P. vivax* ADN com o fluoróforo Cy®5.

A sonda específica para o Controlo Interno (Internal Control, IC) está marcada com o fluoróforo JOE™.

A utilização de sondas associada a colorações distinguíveis permite a deteção paralela do ADN específico do *P. knowlesi*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. falciparum*, *P. vivax*, assim como a deteção do Controlo Interno (Internal Control) nos canais de deteção correspondentes do instrumento de PCR em tempo real.

O teste para os ensaios consiste em dois processos num único tubo de ensaio:

- Amplificação de PCR do ADN alvo e Controlo Interno (Internal Control)

- Detecção simultânea de amplicões de PCR por sondas marcadas com corante fluorescente

O RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 consiste em:

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

O conjunto do Reagente Principal A Pf/Pv e do Reagente Principal B Pk/Pm/Po contém todos os componentes (tampão PCR, polimerase do ADN, sais de magnésio, primers e sondas) necessários para permitir a amplificação mediada por PCR e para a deteção do ADN específico ao *P. knowlesi*, *P. malariae* e ao *P. ovale*, bem como um Controlo Interno (Internal Control) numa única preparação de reação.

O conjunto do Reagente Principal A e do Reagente Principal B contém todos os componentes (tampão PCR, polimerase do ADN, sais de magnésio, primers e sondas) necessários para permitir a amplificação mediada por PCR e para a deteção do ADN específico ao *P. falciparum* e ao *P. vivax*, bem como um Controlo Interno (Internal Control) numa única preparação de reação.

6.1 Instrumento de PCR em tempo real

O RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 foi desenvolvido e validado para que ser utilizado com os seguintes instrumentos de PCR em tempo real:

- Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)

- VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)
- ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
- ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
- Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)
- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

7. Avisos e Precauções

Leia as Instruções de Utilização cuidadosamente antes de utilizar o produto.

- Antes da primeira utilização, verifique o produto e os seus componentes relativamente a:
 - Integridade
 - Totalidade no que diz respeito ao número, tipo e conteúdos (consulte o capítulo 2. Componentes do Kit)
 - Etiquetagem correta
 - Congelado aquando o momento da entrega
- A utilização deste produto está limitada a pessoal especialmente instruído e formado em técnicas de PCR em tempo real e *procedimentos de diagnósticos in vitro*.
- Os espécimes devem ser sempre tratados como sendo infecciosos e/ou nocivos, segundo os procedimentos laboratoriais de segurança.
- Utilize luvas protetoras descartáveis sem pó, uma bata de laboratório e proteção ocular quando manusear as amostras.
- Evite contaminação microbiana e por nucleases (DNase/RNase) dos espécimes e dos componentes do kit.
- Utilize sempre pontas de pipeta descartáveis sem DNase/RNase, com barreiras de aerossóis.

- Use sempre luvas protetoras descartáveis sem pó quando manusear os componentes do kit.
- Utilize áreas de trabalho separadas e isoladas para (i) a preparação da amostra, (ii) a preparação da reação e (iii) as atividades de amplificação/deteção. A ordem das tarefas no laboratório deve ser unidirecional. Utilize sempre luvas descartáveis em cada área e troque-as antes de entrar numa área diferente.
- Selecione materiais e equipamentos específicos para cada área de trabalho individual e não os transfira de uma área para outra.
- Guarde o material positivo e/ou potencialmente positivo separado de todos os outros componentes do kit.
- Não abra os tubos/placas de reação pós-amplificação para evitar a contaminação com amplicões.
- Os controlos adicionais poderão ser testados segundo as diretrizes ou requisitos de regulamentações estatais e/ou federais ou organizações acreditadas.
- Não utilize a autoclave para os tubos de reação após a PCR, dado que não iria degradar o ácido nucleico amplificado e iria suportar o risco de contaminar a área de laboratório.
- Não utilize componentes do kit que tenham passado do prazo de validade.
- Deite fora os resíduos de amostras e ensaios respeitando as regulamentações de segurança locais.

8. Procedimento

8.1 Preparação de Amostras

O ADN extraído é o material inicial para o RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0.

A qualidade do ADN extraído tem um impacto profundo no desempenho de todo o sistema de teste. É recomendado assegurar que o sistema utilizado para a

extração de ácido nucleico é compatível com a tecnologia de PCR em tempo real. Os seguintes kits e sistemas são adequados para a extração de ácido nucleico:

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

Os seguintes kits e sistemas de extração de ácido nucleico também podem ser adequados. A adequação do procedimento de extração de ácido nucleico para utilização com RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 deve ser validada pelo utilizador.

No caso da utilização de um procedimento de preparação de amostras baseado numa coluna de centrifugação, incluindo tampões de lavagem contendo etanol, recomenda-se vivamente um passo de centrifugação adicional de 10 min. a aproximadamente 17 000 x g (~ 13 000 rpm), utilizando um tubo de colheita novo, antes da eluição do ácido nucleico.

ATENÇÃO



Se o seu sistema de preparação de amostras utilizar tampões de lavagem contendo etanol, certifique-se de que elimina quaisquer vestígios de etanol antes da eluição do ácido nucleico. O Etanol é um forte inibidor de PCR em tempo real.

ATENÇÃO



A utilização de ARN transportador é crucial para a eficiência da extração e estabilidade do ácido nucleico.

Para obter informações adicionais e assistência técnica relativamente ao pré-tratamento e preparação de amostras, contacte o nosso Apoio Técnico (consulte o 14. Apoio Técnico).

8.2 Preparação da Master Mix

Todos os reagentes e amostras devem ser completamente descongelados, misturados (através de pipetagem ou por agitação ligeira em vortex) e centrifugados brevemente antes da utilização.

O RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 contém um Controlo Interno (Internal Control, IC) heterólogo, que pode ser utilizado como um controlo de inibição de PCR ou para controlar o procedimento de preparação de amostras (extração de ácido nucleico) e como um PCR controlo de inibição.

- ▶ Se o IC for utilizado como um controlo de inibição de PCR, mas não como um controlo para o procedimento de preparação de amostras, prepare cada Reagente Principal (Master Mix Pk/Pm/Po e Master Mix Pf/PV) de acordo com o seguinte esquema de pipetagem:

Número de Reações (reações)	1	12
Reagente Principal A	5 µl	60 µl
Reagente Principal B	15 µl	180 µl
Internal Control	1 µl	12 µl
Volume da Master Mix	21 µl	252 µl

- ▶ Se o IC for utilizado para o procedimento de preparação de amostras e como um controlo de inibição de PCR, adicione o IC durante o procedimento de extração de ácido nucleico.
- ▶ Independentemente do método/sistema usado para a extração de ácido nucleico, o CI (IC) **não deve ser** adicionado diretamente ao espécime. O IC deve ser sempre acrescentado à mistura de tampão de espécime/lise. O

volume do IC que deve ser adicionado depende sempre e apenas do volume da eluição. Este representa 10% do volume da eluição. Por exemplo, se o ácido nucleico vai ser eluído em 60 µl de tampão de eluição ou água, deve ser adicionado 6 µl de IC por amostra à mistura de tampão de espécime/lise.

- ▶ Se o IC for adicionado durante o procedimento de preparação de amostras, prepare cada Reagente Principal (Master Mix Pk/Pm/Po e Master Mix Pf/Pv) de acordo com o seguinte esquema de pipetagem:

Número de Reações (reações)	1	12
Reagente Principal A	5 µl	60 µl
Reagente Principal B	15 µl	180 µl
Volume da Master Mix	20 µl	240 µl

ATENÇÃO



Se o IC (Internal Control - Controlo interno) tiver sido adicionado durante o procedimento de preparação de amostras, pelo menos o controlo negativo deve incluir o IC.

ATENÇÃO



Independentemente do método/sistema utilizado para a extração de ácido nucleico, nunca adicione IC diretamente ao espécime.

8.3 Preparação da Reação

- ▶ Pipete 20 µl da Master Mix Pk/Pm/Po ou da Master Mix Pf/Pv para cada poço necessário de uma placa de reação ótica com 96 poços adequada ou um tubo de reação ótico adequado.
- ▶ Adicione 10 µl da amostra (eluato da extração de ácido nucleico) ou 10 µl dos controlos (controlo positivo ou negativo).

Preparação da Reação	
Master Mix	20 µl
Controlo da Amostra	10 µl
Volume Total	30 µl

- ▶ Certifique-se de que é utilizado para a Master Mix pelo menos um Controlo Positivo (Controlo Positivo Pk/Pm/Po para a Master Mix Pk/Pm/Po e Controlo Positivo Pf/Pv para a Master Mix Pf/Pv), bem como pelo menos um Controlo Negativo, e execute o processamento.
- ▶ Misture cuidadosamente as amostras e os controlos com a Master Mix através de pipetagem para cima e para baixo.
- ▶ Feche a placa de reação com 96 poços com as tampas adequadas ou uma película adesiva ótica e os tubos de reação adequados.
- ▶ Centrifugue a placa de reação com 96 poços numa centrífuga com rotor para placas de microtitulação durante 30 segundos a aproximadamente 1000 x g (~ 3000 rpm).

9. Programação dos instrumentos de PCR em tempo real

Para obter informações relativas à configuração e programação dos diferentes instrumentos de PCR em tempo real, consulte o manual do utilizador do respetivo instrumento.

Para obter instruções detalhadas relativamente à utilização do RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 em instrumentos de PCR em tempo real específicos, contacte o nosso Apoio Técnico (consulte o capítulo 14. Apoio Técnico).

9.1 Definições

- Configure as seguintes definições:

Definições	
Volume de Reação	30 µl
Taxa de rampa	Predefinição
Referência Passiva	Nenhuma

9.2 Detetores de fluorescência (corantes)

- Defina os detetores de fluorescência (corantes):

Alvo	Master Mix	Nome do Detetor	Reporter	Quencher
Específico ao <i>P. knowlesi</i> ADN	Pk/Pm/Po	<i>P. knowlesi</i>	ROX™	(Nenhum)
Específico ao <i>P. malariae</i> ADN		<i>P. malariae</i>	FAM™	(Nenhum)
Específico ao <i>P. ovale</i> ADN		<i>P. ovale</i>	Cy®5	(Nenhum)
Específico ao <i>P. falciparum</i> ADN	Pf/Pv	<i>P. falciparum</i>	FAM™	(Nenhum)
Específico ao <i>P. vivax</i> ADN		<i>P. vivax</i>	Cy®5	(Nenhum)
Internal Control	Pk/Pm/Po e Pf/Pv	IC	JOE™	(Nenhum)

9.3 Perfil de Temperatura e Aquisição de Corante

► Defina o perfil de temperatura e a aquisição de corante:

	Modo de análise	Ciclo Repetições	Aquisição	Temperatura [°C]	Tempo [min: seg]
Desnaturação	Suspensão	1	-	95	02:00
Amplificação	Realização de Ciclo	45	-	95	00:15
			sim	58	00:45
			-	72	00:15

10. Análise de Dados

Para obter informações básicas relativas à análise de dados em instrumentos de PCR em tempo real, consulte o manual do utilizador do respetivo instrumento.

Para obter instruções detalhadas relativamente à análise dos dados gerados com o RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 em diferentes instrumentos de PCR em tempo real, contacte o nosso Apoio Técnico (consulte o capítulo 14. Apoio Técnico).

10.1 Validade dos Processamentos do Teste de Diagnóstico

10.1.1 Processamento de Teste de Diagnóstico Válido (qualitativo)

Um teste de diagnóstico **qualitativo** é considerado **válido** se as seguintes condições de controlo forem cumpridas:

ID do Controlo	Canal de Detecção			
	ROX™	FAM™	Cy [®] 5	JOE™
Controlo Positivo <i>P. knowlesi</i> , <i>P. malariae</i> , <i>P. ovale</i>	+	+	+	+/-*
Controlo Positivo <i>P. falciparum</i> , <i>P. vivax</i>	-	+	+	+/-*
Controlo Negativo	-	-	-	+

* A presença ou ausência de um sinal no canal JOE™ não é relevante para a validade da análise processada.

10.1.2 Processamento de Teste Inválido (qualitativo)

Um ensaio de diagnóstico **qualitativo** é **inválido**, (i) se o processamento não tiver sido concluído ou (ii) se alguma das condições para um ensaio de diagnóstico **válido** não existir.

No caso de um ensaio de diagnóstico **inválido**, repita o teste usando os restantes ácidos nucleicos purificados ou comece a partir das amostras originais novamente.

10.2 Interpretação dos Resultados

10.2.1 Análise Qualitativa

Tabela 1: Análise Qualitativa utilizando a Master Mix Pk/Pm/Po

Canal de Detecção				Master Mix	Interpretação de Resultados
ROX™	FAM™	Cy®5	JOE™		
+	+	+	+*	Pk/Pm/ Po	Detetado o ADN específico ao <i>P. knowlesi</i> , ao <i>P. malariae</i> e ao <i>P. ovale</i> .
+	-	-	+*		Detetado o ADN específico ao <i>P. knowlesi</i> .
-	+	-	+*		Detetado o ADN específico ao <i>P. malariae</i> .
-	-	+	+*		Detetado o ADN específico ao <i>P. ovale</i> .
+	+	-	+*		Detetado o ADN específico ao <i>P. knowlesi</i> e ao <i>P. malariae</i> .
+	-	+	+*		Detetado a ADN específico ao <i>P. knowlesi</i> e ao <i>P. ovale</i> .
-	+	+	+*		Detetado o ADN específico ao <i>P. malariae</i> e ao <i>P. ovale</i> .
-	-	-	+		Não foi detetado o ADN específico ao <i>P. knowlesi</i> nem ao <i>P. malariae</i> nem ao <i>P. ovale</i> .
-	-	-	-		PCR inibição ou falha ao nível do reagente. Repetir teste a partir da amostra original ou recolher e testar uma nova amostra.

* Não é necessária a deteção do controlo interno (Internal control) no canal de deteção JOE™ para resultados positivos no canal de deteção ROX™ nem no Cy®5, FAM™. Uma carga elevada de ADN do *Plasmodium* spp. na amostra pode causar a redução ou ausência do sinal de controlo interno (Internal Control).

Tabela 2: Análise Qualitativa utilizando a Master Mix Pf/Pv

Canal de Detecção				Master Mix	Interpretação de Resultados
ROX™	FAM™	Cy®5	JOE™		
N/A	+	+	+*	Pf/Pv	Detetado o ADN específico ao <i>P. falciparum</i> e ao <i>P. vivax</i> .
	+	-	+*		Detetado o ADN específico ao <i>P. falciparum</i> .
	-	+	+*		Detetado o ADN específico ao <i>P. vivax</i> .
	-	-	+		Não foi detetado o ADN específico ao <i>P. falciparum</i> nem ao <i>P. vivax</i> .
	-	-	-		PCR inibição ou falha ao nível do reagente. Repetir teste a partir da amostra original ou recolher e testar uma nova amostra.

* Não é necessária a deteção do Controlo interno (Internal control) no canal de deteção JOE™ para resultados positivos no canal de deteção ROX™ nem no Cy®5, FAM™. Uma carga elevada de ADN do *Plasmodium* spp. na amostra pode causar a redução ou ausência do sinal de Controlo Interno (Internal Control).

11. Avaliação do Desempenho

A avaliação do desempenho do RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 foi efetuada utilizando produtos da PCR quantificados e ADN genómico do *Plasmodium* species.

11.1 Sensibilidade Analítica

A sensibilidade analítica do RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 define-se como a concentração (cópias/μl do eluato) de moléculas de ADN específico ao *Plasmodium* que pode ser detetada com uma taxa de positividade de 95%. A sensibilidade analítica foi determinada pela análise de séries de diluição de produtos da PCR específicos ao *Plasmodium* (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, e *P. knowlesi*).

Tabela 3: Resultados da PCR utilizados para o cálculo da sensibilidade analítica no que respeita à deteção do ADN específico ao *P. falciparum*

Concentração inserida [cópias]	Número de Réplicas	Número de Positivos	Taxa de Positividade [%]
316,228	24	24	100
100,000	24	24	100
31,622	24	24	100
10,000	24	24	100
3,161	24	24	100
1,000	24	24	100
0,316	24	18	75
0,100	24	14	58
0,032	23	7	30
0,000	23	0	0

Tabela 4: Resultados da PCR utilizados para o cálculo da sensibilidade analítica no que respeita à deteção do ADN específico ao *P. vivax*

Concentração inserida [cópias]	Número de Réplicas	Número de Positivos	Taxa de Positividade [%]
316,228	24	24	100
100,000	24	24	100
31,622	24	24	100
10,000	24	24	100
3,161	24	24	100
1,000	24	24	100
0,316	24	19	79
0,100	24	5	21
0,032	24	3	13
0,000	24	0	0

Tabela 5: Resultados da PCR utilizados para o cálculo da sensibilidade analítica no que respeita à deteção do ADN específico ao *P. ovale*

Concentração inserida [cópias]	Número de Réplicas	Número de Positivos	Taxa de Positividade [%]
316,228	24	24	100
100,000	24	24	100
31,622	24	24	100
10,000	24	24	100
3,161	24	24	100
1,000	24	21	88
0,316	24	15	63
0,100	24	4	17
0,032	24	1	4
0,000	24	0	0

Tabela 6: Resultados da PCR utilizados para o cálculo da sensibilidade analítica no que respeita à deteção do ADN específico ao *P. malariae*

Concentração inserida [cópias]	Número de Réplicas	Número de Positivos	Taxa de Positividade [%]
316,228	24	24	100
100,000	24	24	100
31,622	24	24	100
10,000	24	24	100
3,161	24	24	100
1,000	24	24	100
0,316	24	23	96
0,100	24	9	38
0,032	24	2	8
0,000	24	0	0

Tabela 7: Resultados da PCR utilizados para o cálculo da sensibilidade analítica no que respeita à deteção do ADN específico ao *P. knowlesi*

Concentração inserida [cópias]	Número de Réplicas	Número de Positivos	Taxa de Positividade [%]
316,228	24	24	100
100,000	24	24	100
31,622	24	24	100
10,000	24	24	100
3,161	24	24	100
1,000	24	21	88
0,316	24	8	33
0,100	24	5	21
0,032	24	2	8
0,000	24	0	0

A sensibilidade analítica do RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 foi determinada por análise Probit:

- Para a deteção do ADN específico ao *P. falciparum*, a sensibilidade analítica é de 0,80 cópias eluato [intervalo de confiança (confidence interval, CI) de 95%: 0,44 a 2,45 cópias]
- Para a deteção do ADN específico do *P. vivax*, a sensibilidade analítica é de 0,73 cópias eluato [intervalo de confiança (confidence interval, CI) de 95%: 0,46 a 1,62 cópias]
- Para a deteção do ADN específico ao *P. ovale*, a sensibilidade analítica é de 1,46 cópias eluato [intervalo de confiança (confidence interval, CI) de 95%: 0,89 a 3,28 cópias]
- Para a deteção do ADN específico do *P. malariae*, a sensibilidade analítica é de 0,36 cópias eluato [intervalo de confiança (confidence interval, CI) de 95%: 0,24 a 0,74 cópias]

- Para a deteção do ADN específico ao *P. knowlesi*, a sensibilidade analítica é de 2,35 cópias eluato [intervalo de confiança (confidence interval, CI) de 95%: 1,37 a 5,55 cópias]

11.2 Especificidade Analítica

A especificidade analítica do Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 RealStar® foi avaliada através do teste a um painel de ARN/ADN genómico extraído de agentes patogénicos relacionados com *Plasmodium* e outros agentes patogénicos que provocam sintomas semelhantes aos do *Plasmodium*.

O RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 não reagiu com nenhum dos seguintes patogénicos:

- Vírus Chikungunya
- Vírus da Dengue
- Vírus da Gripe A
- Vírus da Gripe B
- Vírus do Nilo Ocidental
- *Babesia microti*
- *Leishmania donovani*
- *Leishmania infantum*
- *Leishmania major*
- *Toxoplasma gondii*
- *Trypanosoma brucei*
- *Trypanosoma cruzi*

Especificidade analítica do RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 em relação a de deteção as outras espécies de *Plasmodium* foi avaliada do teste a um painel de ADN genómico.

Para demonstrar que o RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 é capaz de detetar e diferenciar corretamente o ADN de *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. knowlesi*, *P. malariae* e *P. ovale*, o ADN genómico de cinco espécies de *Plasmodium* foi testado utilizando um CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) para análise PCR em tempo real. Cada amostra foi testada com resultado positivo para o ADN específico à respetiva espécie de *Plasmodium* mas com resultado negativo para as outras quatro espécies de *Plasmodium*.

11.3 Precisão

A precisão do RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 foi determinada com base na variabilidade intraensaio (variabilidade dentro de um ensaio), na variabilidade inter-ensaio (variabilidade entre diferentes ensaios) e na variabilidade interlote (variabilidade entre diferentes lotes de produção). A variabilidade total foi calculada através da combinação das três análises.

Os dados de variabilidade são expressos em termos do desvio padrão e do coeficiente de variação. Os dados baseiam-se nos valores do ciclo limiar (C_t). Pelo menos seis réplicas por amostra foram analisadas quanto a variabilidade intraensaio, variabilidade inter-ensaio e variabilidade interlote.

Tabela 8: Dados de precisão para a detecção do ADN específico ao *P. ovale*, *P. malariae* e *P. knowlesi*

<i>P. ovale</i> , <i>P. malariae</i> e <i>P. knowlesi</i>		Ciclo limiar médio (C_t)	Desvio padrão	Coefficiente de Variação (%)
Variabilidade Intraensaio	<i>P. malariae</i>	31,88	0,24	0,76
	<i>P. ovale</i>	30,29	0,12	0,40
	<i>P. knowlesi</i>	30,39	0,14	0,46
Variabilidade Inter-Ensaio	<i>P. malariae</i>	31,89	0,18	0,58
	<i>P. ovale</i>	30,30	0,10	0,32
	<i>P. knowlesi</i>	30,53	0,14	0,45
Variabilidade Entre Lotes	<i>P. malariae</i>	31,95	0,11	0,35
	<i>P. ovale</i>	30,26	0,11	0,35
	<i>P. knowlesi</i>	30,40	0,11	0,35
Variabilidade Total	<i>P. malariae</i>	31,92	0,16	0,51
	<i>P. ovale</i>	30,27	0,10	0,32
	<i>P. knowlesi</i>	30,48	0,15	0,49

Tabela 9: Dados de precisão para a detecção do ADN específico ao *P. falciparum* and *P. vivax*

<i>P. falciparum</i> e <i>P. vivax</i>		Ciclo limiar médio (C _t)	Desvio padrão	Coefficiente de Variação (%)
Variabilidade Intraensaio	<i>P. falciparum</i>	31,72	0,11	0,35
	<i>P. vivax</i>	31,71	0,26	0,82
Variabilidade Inter-Ensaio	<i>P. falciparum</i>	31,38	0,37	0,14
	<i>P. vivax</i>	31,57	0,24	0,77
Variabilidade Entre Lotes	<i>P. falciparum</i>	31,42	0,33	1,04
	<i>P. vivax</i>	31,09	0,40	1,27
Variabilidade Total	<i>P. falciparum</i>	31,29	0,33	1,04
	<i>P. vivax</i>	31,30	0,46	1,46

Tabela 10: Dados de precisão para a detecção do Controlo Interno (Internal Control) utilizando Master Mix Pk/Pm/PO

Internal Control	Ciclo Limiar (C _t)	Desvio padrão	Coefficiente de Variação (%)
Variabilidade Intraensaio	25,88	0,07	0,29
Variabilidade Inter-Ensaio	25,64	0,27	1,05
Variabilidade Entre Lotes	25,89	0,06	0,23
Variância Total	25,72	0,25	0,97

Tabela 11: Dados de precisão para a detecção do Controlo Interno (Internal Control) utilizando Master Mix Pf/Pv

Internal Control	Ciclo Limiar (C _t)	Desvio padrão	Coefficiente de Variação (%)
Variabilidade Intraensaio	26,73	0,13	0,47
Variabilidade Inter-Ensaio	26,90	0,21	0,76
Variabilidade Entre Lotes	26,96	0,13	0,49
Variância Total	26,89	0,17	0,63

12. Limitações

- A rigorosa conformidade com as Instruções de utilização é necessária para resultados otimizados.
- A utilização deste produto está limitada a pessoal especialmente instruído e formado em técnicas de PCR em tempo real e procedimentos de diagnósticos *in vitro*.
- A boa prática laboratorial é essencial para que este ensaio tenha um desempenho adequado. Deve-se ter um cuidado extremo para preservar a pureza dos componentes do kit e as configurações da reação. Todos os reagentes devem ser vigiados de perto para evitar impurezas e contaminação. Qualquer reagente duvidoso deve ser rejeitado.
- São necessários procedimentos de recolha, transporte, armazenamento e processamento adequados para o desempenho ideal deste teste.
- Este ensaio não pode ser utilizado diretamente no espécime. Devem ser realizados métodos apropriados de extração de ácido nucleico antes da utilização deste ensaio.
- A presença de inibidores PCR de (por ex., heparina) poderá causar resultados inválidos ou sub falsos negativos em .
- A existência potencial de mutações nas regiões alvo do genoma dos *Plasmodium* spp. abrangidas pelos primers e/ou sondas utilizados no kit

poderá resultar em na incapacidade de deteção da presença do agente patogénico.

- Como em qualquer outro teste diagnóstico, os resultados do RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 têm de ser interpretados tendo em consideração todas as conclusões clínicas e laboratoriais.

13. Controlo de Qualidade

De acordo com o Sistema de Gestão da Qualidade Altona Diagnostics GmbH EN ISO 13485 certificado, cada lote de RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 é testado face a especificações predeterminadas de modo a garantir uma qualidade do produto consistente.

14. Apoio Técnico

Para apoio ao cliente, contacte o nosso Apoio Técnico através do

E-mail: support@altona-diagnostics.com

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

15. Bibliografia

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

Cohen, Jonathan, Powderly, William G, and Steven M Opal. Infectious Diseases, Third Edition. Mosby, 2010.

16. Marcas Comerciais e Isenções de Responsabilidade

RealStar® (Altona Diagnostics); ABI Prism® (Applied Biosystems); ATCC® (American Type Culture Collection); CFX96™ (Bio-Rad); Cy® (GE Healthcare); FAM™, JOE™, ROX™ (Life Technologies); LightCycler® (Roche); SmartCycler® (Cepheid); Maxwell® (Promega); Mx 3005P™ (Stratagene); NucliSENS®, easyMag® (bioMérieux); Rotor-Gene®, QIAamp®, MinElute®, QIASymphony® (QIAGEN); VERSANT® (Siemens Healthcare).

Os nomes registados, marcas comerciais, etc. utilizados neste documento, mesmo onde não estão especificamente marcados como tal, não devem ser considerados como estando desprotegidos pela legislação.















O RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 é um kit de diagnóstico com a marcação CE de acordo com a Diretiva Europeia 98/79/EC relativa ao diagnóstico *in vitro*.

Produto não licenciado junto da Health Canada e não autorizado ou aprovado pela FDA.

Não disponível em todos os países.

© 2019 Altona Diagnostics GmbH; todos os direitos reservados.

17. Explicação de Símbolos

Símbolo	Explicação
	Dispositivo médico de diagnóstico <i>In vitro</i>
	Código do lote
	Cor cap
	Número de catálogo
	Conteúdo
	Número
	Componente
	Número de identificação de comércio internacional
	Consulte as instruções de utilização
	Contém o suficiente para “n” testes/reações (rxns)
	Limite de temperatura
	Data de validade
	Fabricante
	Atenção
	Nota
	Versão

Notas:

always a drop ahead.

altona Diagnostics GmbH
Mörkenstr. 12
22767 Hamburg, Germany

phone +49 40 548 0676 0
fax +49 40 548 0676 10
e-mail info@altona-diagnostics.com

www.altona-diagnostics.com

