

Instruções de uso

RealStar[®] Malaria PCR Kit 1.0

08/2018 PT

RealStar[®]

Malaria 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)
LightCycler® 480 Instrument II (Roche)



341013



96



08 2018



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

Conteúdo

1.	Utilização Prevista	6
2.	Componentes do Kit	6
3.	Armazenamento	6
4.	Materiais e Dispositivos requeridos mas não fornecidos.....	7
5.	Informação de Base	8
6.	Descrição do Produto.....	8
6.1	Instrumento de PCR em tempo real.....	10
7.	Avisos e Precauções	10
8.	Procedimento	12
8.1	Preparação de Amostras.....	12
8.2	Preparação da Master Mix.....	13
8.3	Preparação da Reação	15
9.	Programação dos instrumentos de PCR em tempo real.....	15
9.1	Definições	16
9.2	Detetores de fluorescência (corantes)	16
9.3	Perfil de Temperatura e Aquisição de Corante.....	16
10.	Análise de Dados	17
10.1	Validade dos Processamentos do Teste de Diagnóstico.....	17
10.1.1	Processamento de Teste de Diagnóstico Válido (qualitativo)	17
10.1.2	Processamento de Teste Inválido (qualitativo).....	17
10.2	Interpretação dos Resultados	18
10.2.1	Análise Qualitativa	18
11.	Avaliação do Desempenho.....	18

11.1	Sensibilidade Analítica	18
11.2	Especificidade Analítica	19
11.3	Precisão	21
11.4	Avaliação Diagnóstica	22
12.	Limitações	23
13.	Controlo de Qualidade.....	23
14.	Apoio Técnico	24
15.	Bibliografia	24
16.	Marcas Comerciais e Isenções de Responsabilidade	24
17.	Explicação de Símbolos	26

1. Utilização Prevista

O RealStar® Malaria PCR Kit 1.0 é um teste de diagnóstico *in vitro* baseado na tecnologia de PCR em tempo real para a detecção do ADN específico do *Plasmodium species*, incluindo as cinco espécies patogênicas para humanos *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi*.

2. Componentes do Kit

Cor cobertura	Componente	Número de frascos	Volume [µl/tubo]
Azul	Master A	8	60
Violeta	Master B	8	180
Verde	Internal Control	1	1000
Vermelho	Positive Control	1	250
Branco	Water (PCR grade)	1	500

Internal Control (IC) = Controle interno

Positive Control (PC) = Controle positivo

Water (PCR grade) = Água de PCR

3. Armazenamento

- O RealStar® Malaria 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 recepção, 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 (consulte o 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 encontra-se entre uma das doenças infecciosas mais importantes a nível mundial. Cerca de 250 milhões de pessoas são infetadas todos os anos, sendo que a maioria dos casos ocorre na África, Ásia e América do Sul. Anualmente, 800 000 a 1,2 milhões de pessoas falecem devido à malária (fonte RKI, 2012).

A malária é uma doença infecciosa, transmitida por vetores, causada por parasitas eucariotas do género *Plasmodium*. Os parasitas são transmitidos às pessoas através de mosquitos *Anopheles* infetados. A infeção também pode ocorrer em aeroportos e ao redor dos mesmos, através da importação não identificada de mosquitos infetados em aeronaves ou na bagagem dos passageiros (malária em bagagem e aeroportos). A infeção através de dádivas de sangue também é possível.

Existem cinco espécies patogénicas para humanos conhecidas: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi*. A malária é uma doença febril aguda. Num indivíduo não imune, os sintomas aparecem 7 a 15 dias após a infeção. Os primeiros sintomas, febre, cefaleias, arrepios e vômitos, podem ser ligeiros e difíceis de reconhecer. Os sintomas são frequentemente diagnosticadas erroneamente como os de uma constipação comum ou uma infeção gastrointestinal. Se não tratada, a malária pode progredir para uma doença grave que, frequentemente, causa a morte. Para os *P. vivax* e *P. ovale*, podem ocorrer recaídas clínicas dentro de um período de semanas a meses após a primeira infeção. Estes novos episódios surgem de formas latentes no fígado, conhecidas como hipnozoites. Em zonas endémicas da malária, as pessoas podem desenvolver uma imunidade parcial, permitindo que ocorram infeções assintomáticas.

O melhor tratamento disponível contra a malária, particularmente para infeções por *P. falciparum* é a terapia de combinação à base de artemisina (ACT).

6. Descrição do Produto

O RealStar® Malaria PCR Kit 1.0 é um teste de diagnóstico *in vitro* baseado

na tecnologia de PCR em tempo real para a detecção do ADN específico do *Plasmodium species*, incluindo as cinco espécies patogénicas para humanos *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi*.

O ensaio inclui um sistema de amplificação heteróloga (Controlo Interno) 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 detecção do ADN amplificado. As sondas estão marcadas com repórter fluorescente e corante quencher.

As sondas específicas para o ADN do *Plasmodium spp.* estão marcadas com o fluoróforo FAM™. A sonda específica para o Controlo Interno está marcada com o fluoróforo JOE™.

A utilização de sondas associada a colorações distinguíveis permite a detecção paralela do ADN específico do *Plasmodium spp.* e do Controlo Interno nos canais de detecção correspondentes do instrumento de PCR em tempo real.

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

- Amplificação de PCR do ADN alvo e Controlo Interno
- Detecção simultânea de amplicões de PCR por sondas marcadas com corante fluorescente

O RealStar® Malaria PCR Kit 1.0 consiste em:

- Dois reagentes Master (Master A e Master B)
- Controlo Interno
- Controlo Positivo
- Água de grau PCR

Os reagentes Master A e Master B contêm todos os componentes (tampão de PCR, ADN polimerase, sal de magnésio, primers e sondas) necessários para permitir a amplificação mediada por PCR e a deteção de alvos do ADN específico do *Plasmodium spp.* assim como do Controlo Interno numa preparação de reação.

6.1 Instrumento de PCR em tempo real

O RealStar® Malaria PCR Kit 1.0 foi desenvolvido e validado para utilização 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)
- 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)
 - Rotulagem 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 em procedimentos de diagnósticos *in vitro*.
- Os espécimes devem ser sempre tratados como sendo infecciosos e/ou nocivo, 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 nuclease (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 PCR Kit 1.0.

A qualidade do ADN extraído tem um impacto profundo no desempenho de todo o sistema de teste. É necessário 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)
- VERSANT® kPCR Molecular System 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 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 capítulo 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 PCR Kit 1.0 contém um Controlo Interno 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 controlo de inibição de PCR.

- ▶ Se o Controlo Interno for utilizado como um controlo de inibição de PCR, mas não como um controlo para o procedimento de preparação de amostras, o Master Mix é configurado segundo o seguinte esquema de pipetagem:

Número de Reações (reações)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Controlo Interno	1 µl	12 µl
Volume da Master Mix	21 µl	252 µl

- ▶ Se o Controlo Interno for utilizado para o procedimento de preparação de amostras e como um controlo de inibição de PCR, adicione o Controlo Interno durante o procedimento de extração de ácido nucleico.
- ▶ Independentemente do método/sistema utilizado para a extração de ácido nucleico, o Controlo Interno **não deve** ser adicionado diretamente à amostra. O Controlo Interno deve ser sempre acrescentado à mistura de tampão de amostra/lise. O volume do Controlo Interno 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 Controlo Interno por amostra à mistura de tampão de espécime/lise.
- ▶ Se o Controlo Interno for acrescentado durante o procedimento de preparação de amostras, o Master Mix é configurado segundo o seguinte esquema de pipetagem:

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

ATENÇÃO



Se o Controlo Interno foi adicionado durante o procedimento de preparação da amostra, pelo menos o controlo negativo deve incluir o Controlo Interno

ATENÇÃO



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

8.3 Preparação da Reação

- ▶ Pipete 20 µl da Master Mix 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 pelo menos um controlo positivo e um controlo negativo por 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 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
Ramp Rate	Predefinição
Predefinição	ROX™

9.2 Detetores de fluorescência (corantes)

- Defina os detetores de fluorescência (corantes):

Alvo	Nome do Detetor	Reporter	Quencher
ADN específico do <i>Plasmodium spp.</i>	<i>Plasmodium spp.</i>	FAM™	(Nenhum)
Controlo Interno (Internal Control)	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	Repetições Repetições	Aquisição	Temperatura [°C]	Tempo [min:sec]
Desnaturação	Suspensão	1	-	95	10:00
Amplification	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 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 processamento de teste de diagnóstico **qualitativo** é **válido**, se as seguintes condições de controlo estiverem presentes:

ID do Controlo	Canal de Detecção	
	FAM™	JOE™
Controlo Positivo	+	+/-*
Controlo Negativo	-	+

* A presença ou ausência de um sinal no canal JOE™ não é relevante para a validade do teste.

10.1.2 Processamento de Teste Inválido (qualitativo)

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

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

10.2 Interpretação dos Resultados

10.2.1 Análise Qualitativa

Canal de Detecção		Interpretação de Resultados
FAM™	JOE™	
+	+*	Foi detetado o ADN específico do <i>Plasmodium spp.</i>
-	+	Não foi detetado o ADN específico do <i>Plasmodium spp.</i> . A amostra não contém quantidades detetáveis de ADN específico do <i>Plasmodium spp.</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 FAM™. Uma carga elevada de ADN do *Plasmodium spp.* na amostra pode causar a redução ou ausência de sinais de Controlo interno

11. Avaliação do Desempenho

A avaliação do desempenho analítico do RealStar® Malaria PCR Kit 1.0 foi efetuada utilizando a "1.^a norma internacional da OMS para as técnicas baseadas na amplificação de ácido nucleico de ADN do *Plasmodium falciparum* ADN (NIBSC código: 04/176)".

11.1 Sensibilidade Analítica

A sensibilidade analítica (limite de deteção: LDD) do RealStar® Malaria PCR Kit 1.0 define-se como a concentração (UI por µl de eluato) de moléculas de ADN específico do HEV que pode ser detetada com uma taxa de positividade de 95%. A sensibilidade analítica foi determinada através da análise de diluições

seriadas de ADN quantificado do *Plasmodium spp.* ("1ª norma internacional da Organização Mundial da Saúde para ensaios de amplificação de ácido nucleico (NAT) do ADN específico do *Plasmodium falciparum*

Tabela 1: Resultados da PCR utilizados para o cálculo da sensibilidade analítica no que respeita à deteção de ADN específico do *Plasmodium spp.*

Concentração inserida [UI/μl]	Número de Réplicas	Número de Positivos	Taxa de Positividade [%]
10,000	12	12	100
3,160	12	12	100
1,000	12	12	100
0,316	12	8	67
0,100	12	4	33
0,032	12	4	33
0,010	12	1	8
0,003	12	0	0

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

- Para a deteção de ADN específico do *Plasmodium spp.*, a sensibilidade analítica é de 1.27 UI/μl [intervalo de confiança (confidence interval, CI) de 95%: 0.57 - 5.42 UI/μl]

11.2 Especificidade Analítica

A especificidade analítica do RealStar® Malaria PCR Kit 1.0 é garantida pela seleção meticulosa dos oligonucleotídeos (primers e sondas). Os oligonucleotídeos foram verificados pela análise de comparação das sequências com sequências publicamente disponíveis, para garantir que todos os génotipos relevantes do *Plasmodium spp.* serão detetados.

Mais de cem espécimes diferentes de sangue total *Plasmodium* negativo foram analisados com o RealStar® Malaria PCR Kit 1.0, após extração de ADN utilizando o QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen). Nenhum destes evidenciou um sinal específico *Plasmodium* positivo (FAM™), mas todos apresentaram um sinal de Controlo interno (Internal control) (JOE™) positivo.

Adicionalmente, a especificidade do RealStar® Malaria PCR Kit 1.0 foi avaliada através do teste de diferentes *espécies de Plasmodium*, bem como a um painel de ADN/ARN genómico extraído de espécies relacionadas com *Plasmodium*, outros agentes patogénicos transmitidos por via sanguínea e de agentes patogénicos que provocam sintomas semelhantes.

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

- Vírus BK
- Citomegalovírus
- Vírus da Dengue
- Vírus Epstein-Barr
- Vírus da Hepatite A
- Vírus da Hepatite B
- Vírus da Hepatite C
- Vírus da Hepatite E
- Vírus Herpes Simplex 1
- Vírus Herpes Simplex 2
- Herpesvírus humano 6A
- Herpesvírus humano 6B
- Herpesvírus humano 7
- Herpesvírus humano 8
- Vírus da imunodeficiência humana 1
- Parvovírus humano B19
- Vírus da Gripe A

- Vírus da Gripe B
- Vírus JC
- Vírus Varicella-Zoster
- Vírus do Nilo Ocidental
- *Leishmania donovani*
- *Leishmania infantum*
- *Leishmania major*
- *Toxoplasma gondii*
- *Trypanosoma cruzi*

11.3 Precisão

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

Os dados de variabilidade são expressos através do desvio padrão e do coeficiente de variação com base na concentração para ADN específico do *Plasmodium spp.* e com base nos valores do ciclo limiar (C_t) em termos de Controlo Interno (Internal Control). Pelo menos seis réplicas por amostra foram analisadas quanto a variabilidade Intra-ensaio, variabilidade Inter-ensaio e variabilidade Inter-lote.

Tabela 2: Dados de precisão para a deteção de ADN específico do *Plasmodium spp.*

<i>Plasmodium spp.</i>	Ciclo limiar médio (C_t)	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação [%]
Variabilidade Intra-ensaio	29,05	0,18	0,63
Variabilidade Inter-ensaio	30,77	0,16	0,51
Variabilidade Inter-lote	29,14	0,64	2,21
Variabilidade Total	29,65	0,27	0,92

Tabela 3: Dados de precisão para a detecção do Controle Interno

Controlo Interno	Ciclo limiar médio (C _t)	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação [%]
Variabilidade Intra-ensaio	23,45	0,14	0,61
Variabilidade Inter-ensaio	25,87	0,33	1,26
Variabilidade Inter-lote	23,46	0,14	0,62
Variabilidade Total	24,26	0,11	0,43

11.4 Avaliação Diagnóstica

O RealStar® Malaria PCR Kit 1.0 foi avaliado num estudo prospetivo versus análise microscópica de "Esfregaço Espesso", o padrão de referência no diagnóstico de malária. 118 espécimes, enviados para diagnóstico de malária de rotina foram analisados utilizando análise microscópica de "Esfregaço Espesso" e adicionalmente, após a extração de ácido nucleico (QIAamp® DNA Blood Mini Kit; QIAGEN), utilizando o RealStar® Malaria PCR Kit 1.0.

Tabela 4: Resultados da avaliação da sensibilidade e da especificidade de diagnóstico do RealStar® Malaria PCR Kit 1.0

		RealStar® Malaria PCR Kit 1.0	
		+	-
Método de referência	+	17	0
	-	3	98

* Todas as amostras discrepantes foram identificadas como positivas quanto a agentes patogénicos de Plasmodium spp. por análise de sequência

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 em 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 (p.e. heparina) pode provocar falsos negativos ou resultados inválidos.
- A existência potencial de mutações nas regiões alvo do genoma *Plasmodium spp.* abrangidas pelos primers e/ou sondas utilizados no kit poderá resultar na incapacidade de deteção da presença dos agentes patogénicos.
- Como em qualquer outro teste diagnóstico, os resultados do RealStar® Malaria 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 PCR Kit 1.0 é testado face a especificações predeterminadas de modo a garantir uma qualidade do produto consistente.

14. Apoio Técnico

Para recomendações técnicas, contacte o nosso Apoio Técnico:

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 PCR Kit 1.0 é a CE-marked diagnostic kit according to the European *in vitro* diagnostic directive 98/79/EC.

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

Não disponível em todos os países.

© 2018 Altona Diagnostics GmbH; todos os direitos reservados.

17. Explicação de Símbolos

Símbolo	Explicação
	Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>
	Código de lote
	Cor cap
	Número do produto
	Conteúdo
	Número
	Componente
	Número de identificação de comércio internacional
	Consult instructions for use
	Contém o suficiente para "n" testes/reações (rxns)
	Limite de temperatura
	Data de validade
	Fabricante
	Atenção
	Nota
	Versão

Notes:

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

