

APENAS PARA EXPORTAÇÃO. NÃO SE DESTINA A VENDA NOS EUA.



Malaria and Malaria PLUS DNA Amplification Assays

Ensaio de amplificação de ADN para a deteção de *Plasmodium sp.*

REF 280925, 281125

IVD Dispositivo médico de diagnóstico in vitro

FINALIDADE

Os ensaios de amplificação de ADN *illumigene* Malaria e *illumigene* Malaria PLUS realizados no *illumipro-10™* são testes de diagnóstico in vitro qualitativos para a deteção direta de ADN de *Plasmodium sp.* em amostras de sangue venoso total humano com EDTA de indivíduos com sinais e sintomas de infeção da malária. Os resultados dos ensaios *illumigene* Malaria destinam-se a ser utilizados como auxiliares no diagnóstico de infeção da malária em humanos.

Os ensaios *illumigene* Malaria utilizam a tecnologia de amplificação isotérmica de ADN mediada em loop (LAMP) para detetar o ADN de *Plasmodium sp.* tendo como alvo segmentos do genoma de *Plasmodium*. Os ensaios *illumigene* Malaria não distinguem entre as diferentes espécies de *Plasmodium*.

Os ensaios *illumigene* Malaria e *illumigene* Malaria PLUS destinam-se a ser utilizados em laboratórios hospitalares, de referência ou estatais. Os dispositivos não se destinam a ser utilizados em locais de prestação de cuidados fora de laboratórios.

RESUMO E EXPLICAÇÃO DO TESTE

Os ensaios moleculares *illumigene* Malaria e *illumigene* Malaria PLUS baseiam-se na tecnologia de amplificação mediada em loop (LAMP).^{1, 2} Os ensaios visam uma região do genoma de *Plasmodium* presente nas espécies *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium knowlesi*. Os ensaios *illumigene* Malaria visam uma sequência de 214 pares de bases (pb) de uma região não codificadora do ADN mitocondrial de *Plasmodium sp.*

A amplificação mediada em loop utiliza primers especificamente concebidos para permitir uma amplificação isotérmica de ADN específica e contínua. O pirofosfato de magnésio é um subproduto da amplificação, que forma um precipitado branco que resulta numa solução de reação turva. As características de absorvância da solução de reação são monitorizadas pela Incubadora/Leitor Meridian *illumipro-10*. As alterações nas características de absorvância da solução de reação criadas pela precipitação de pirofosfato de magnésio indicam a presença de ADN-alvo. A ausência de resultados do ADN-alvo resulta em alterações pouco significativas na absorvância da amostra.

O kit *illumigene* Malaria inclui Dispositivos de teste *illumigene* Malaria, Aparelho de preparação de amostras IV (SMP PREP IV), Tampão *illumigene* I e tubos. As amostras de sangue total são, em primeiro lugar, tratadas com Tampão I; as células são rompidas e os ácidos nucleicos libertados. O lisato é adicionado ao SMP PREP IV e filtrado para um tubo limpo, apertando cuidadosamente. O efluente da amostra colhido após a filtragem contém ácidos nucleicos para utilização com o Dispositivo de teste *illumigene*.

O kit *illumigene* Malaria PLUS inclui Dispositivos de teste *illumigene* Malaria, Colunas *M-prep*, Tampão *illumigene* I, Tampão *M-prep* II, Tampão *M-prep* III e Tubos ST. As amostras de sangue total são processadas utilizando cromatografia de exclusão por tamanho mediante fluxo de gravidade para separar e purificar os ácidos nucleicos. As colunas *M-prep* proporcionam a matriz para purificação de ácidos nucleicos, enquanto os tampões incluídos facilitam a lise celular e eluição das amostras. As amostras de sangue total são, em primeiro lugar, tratadas com Tampão I; as células são rompidas e os ácidos nucleicos libertados. O material de amostra é aplicado na Coluna *M-prep* e este pode mover-se pela coluna por meio de gravidade, sendo que as moléculas maiores se movem pela matriz da coluna primeiro ou mais rápido. O Tampão *M-prep* II é adicionado à Coluna *M-prep* para facilitar o movimento da amostra pela matriz da coluna. O Tampão *M-prep* III contém um corante não reativo que constitui um indicador visual da progressão da amostra. O Tampão *M-prep* III é adicionado à coluna *M-prep* depois de o Tampão II ter sido introduzido na matriz de gel. O efluente da amostra colhido depois de adicionar o Tampão *M-prep* III contém ácidos nucleicos para utilização com o Dispositivo de teste *illumigene* Malaria. Nem o *illumigene* Malaria nem o *illumigene* Malaria PLUS requerem equipamento de laboratório especializado.

O Dispositivo de teste *illumigene* Malaria contém uma esfera de reagente de amplificação liofilizado em cada uma das duas câmaras: uma câmara de TESTE com primers específicos de *Plasmodium sp.* e uma câmara de CONTROLO com primers específicos de ADN mitocondrial humano. O ADN mitocondrial humano de amostras de sangue total e os primers específicos de ADN mitocondrial humano nas câmaras de CONTROLO do Dispositivo de teste funcionam como controlo interno do ensaio. Durante a preparação das amostras, o ADN mitocondrial humano é extraído com o ADN mitocondrial de *Plasmodium sp.* para permitir o processamento paralelo de ADN alvo e de ADN de controlo durante a amplificação e deteção. O controlo interno monitoriza a extração de ADN, a inibição da amplificação, o desempenho dos reagentes do ensaio e a eficácia de processamento da amostra. O alvo de controlo deve ser amplificado e detetado na reação final, caso contrário o teste será considerado inválido e os resultados não serão reportados.

O *illumipro-10* monitoriza as alterações nas características de absorvância medindo a transmissão de luz através das soluções de reação de Teste e de Controlo. A transmissão de luz é verificada no Início do processamento do ensaio (S₁) e no Fim do processamento do ensaio (S₂). O *illumipro-10* calcula a mudança na transmissão de luz entre o Fim do processamento e o Início do processamento (S₂:S₁) e compara o rácio com um valor de corte fixo.

Os valores de corte fixos para a câmara de TESTE são utilizados para reportar resultados de amostras. Os rácios S₂:S₁ da câmara de TESTE inferiores a 70% são reportados como "POSITIVOS"; os rácios S₂:S₁ da câmara de TESTE iguais ou superiores a 70% são reportados como "NEGATIVOS". Os valores numéricos não são reportados.

Os valores de corte fixos para a câmara de CONTROLO são utilizados para determinar a validade. Os rácios S₂:S₁ da câmara de CONTROLO inferiores a 85% são considerados válidos e permitem a apresentação dos resultados da câmara de TESTE (POSITIVOS, NEGATIVOS). Os rácios S₂:S₁ da câmara de CONTROLO iguais ou superiores a 85% são considerados inválidos e impedem a apresentação dos resultados da câmara de TESTE. As reações inválidas da câmara de CONTROLO são reportadas como "INVÁLIDAS". Os valores numéricos não são reportados.

São aplicados critérios de corte mais rigorosos à reação da câmara de CONTROLO para assegurar que a amplificação não é inibida, que os reagentes estão a atuar conforme previsto e que o processamento das amostras foi corretamente efetuado.

PRINCÍPIOS BIOLÓGICOS

A malária é um problema de saúde pública a nível mundial, com uma estimativa de 3,2 mil milhões de pessoas em risco de infeção em 97 países.³ A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que, em 2013, surgiram 198 milhões de casos que resultaram em 584 000 mortes.³ A malária é causada pelo parasita intracelular *Plasmodium* e é transmitida aos humanos pelos mosquitos fêmea do género *Anopheles*.³ Depois de infetar uma pessoa, o *Plasmodium* passa por um ciclo de vida com múltiplas fases morfológicas entre o crescimento inicial nas células do fígado e a invasão dos eritrócitos.⁴ O *Plasmodium* replica-se no interior dos eritrócitos, causando a rutura das células e os sintomas clínicos da doença.⁴

Sabe-se que há cinco espécies *Plasmodium* que causam a malária nos seres humanos (*Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi*), sendo que a maioria das infeções é causada pelas espécies *P. falciparum* e *P. vivax*. O tratamento da malária depende das espécies *Plasmodium*, estado clínico do doente e sensibilidade antimicrobiana.⁵ As infeções causadas pelas espécies *P. falciparum* e *P. knowlesi* são normalmente mais graves e requerem um tratamento rápido.⁵

A OMS recomenda a realização de testes de diagnóstico em todos os indivíduos em que se suspeite da presença de malária.³ A microscopia de esfregaço com gota fina e espessa constitui atualmente o método de diagnóstico de referência. No entanto, a exatidão e a precisão da microscopia depende significativamente da perícia do técnico (o limite de deteção varia entre 4-100 parasitas/µL ou superior), com taxas de falsos negativos e falsos positivos entre 10-25% e uma variabilidade aproximada de 2-3 vezes na quantificação.^{6, 7, 8} Adicionalmente, num exame microscópico de rotina, é frequente ocorrerem erros na identificação da espécie *Plasmodium*.⁸ Os testes de diagnóstico rápido (TDR) baseados em imunoenensaio são também um método de diagnóstico disponível. Os testes de avaliação da qualidade realizados pela OMS demonstraram que, a baixas densidades de parasitas (200 parasitas/µL), apenas 76% e 42% dos TDR disponíveis detetariam as espécies *P. falciparum* e *P. vivax*, respetivamente.³

Os ensaios *illumigene* Malaria apresentam resultados rápidos com sensibilidade superior ao microscópio e aos TDR.

REAGENTES/MATERIAIS FORNECIDOS

O número máximo de testes que se podem realizar com este kit de teste é indicado na embalagem exterior.

Para *illumigene* Malaria, Referência 280925

1. **Dispositivo de teste *illumigene* Malaria:** dispositivo de duas câmaras que contém reagentes de amplificação liofilizados (ADN polimerase, trifosfatos de desoxinucleótido) e primers específicos para *Plasmodium sp.* (Câmara de TESTE) ou primers específicos para ADN mitocondrial humano (Câmara de CONTROLO).
2. **Tampão *illumigene* I:** solução de lise que contém 0,2 N de hidróxido de sódio.
3. **Aparelho de preparação de amostras IV *illumigene* (SMP PREP IV):** solução de tampão Tris que contém 0,09% de azida como conservante.
4. **Tubo *illumigene* I:** tubos de 1,5 mL

Para *illumigene* Malaria PLUS, Referência 281125

1. **Dispositivo de teste *illumigene* Malaria:** dispositivo de duas câmaras que contém reagentes de amplificação liofilizados (ADN polimerase, trifosfatos de desoxinucleótido) e primers específicos para *Plasmodium sp.* (Câmara de TESTE) ou primers específicos para ADN mitocondrial humano (Câmara de CONTROLO).
2. **Tampão *illumigene* I:** solução de lise que contém 0,2 N de hidróxido de sódio.
3. **Tampão *M-prep* II:** solução que contém vermelho de fenol e 0,09% de azida como conservante.
4. **Tampão *M-prep* III:** solução tamponada com Tris que contém 0,09% de azida como conservante.
5. **Coluna *M-prep*:** coluna comprida de 5,0 cm com ponta desenroscável e tampa com vedante hermético que contém resina para cromatografia numa solução tamponada com tris com azida sódica (0,09%) como conservante.
6. **Tubos ST:** tubos de microcentrifugação de 2,0 mL com tampa de enroscar.

MATERIAIS FORNECIDOS SEPARADAMENTE

1. Kit de controlo externo *illumigene* Malaria, Meridian Bioscience, Inc. Referência: 279970

MATERIAIS NÃO FORNECIDOS

1. Luvas de látex descartáveis, sem pó-de-talco
2. Pontas de pipetas resistentes a aerossóis sem DNase/RNase
3. Tubos de colheita de sangue com anticoagulante EDTA

EQUIPAMENTO NÃO FORNECIDO

1. Temporizador
2. Agitador vórtex (opcional)
3. Micropipeta com capacidade para dispensar 50 µL
4. Micropipeta com capacidade para dispensar 250 µL (apenas referência 281125)
5. *illumipro-10™*, Meridian Bioscience, Inc. Referência: 610172

PRECAUÇÕES

1. Todos os reagentes destinam-se apenas a utilização em diagnóstico in vitro.
2. Não altere reagentes do kit e dispositivos de teste entre lotes. Os lotes individuais do Tubo I e dos Tubos ST são intercambiáveis dentro de cada tipo de kit, desde que sejam utilizados dentro do prazo de validade atribuído.
3. O *illumipro-10* pode gerar resultados incorretos se não for utilizado o programa de ensaio Malaria para testar a amostra.
4. Siga as boas práticas de laboratório e biossegurança de Nível 2 durante a realização dos testes.⁹ Trate todas as amostras e dispositivos de teste utilizados como capazes de transmitir agentes infecciosos. Não coma, beba ou fume em áreas de manuseamento de amostras ou reagentes do kit.
5. Use luvas descartáveis quando do manuseamento de amostras e lave bem as mãos a seguir.
6. Devem ser implementados Programas de controlo da qualidade para Laboratórios de testes moleculares, incluindo a utilização e manutenção apropriadas do equipamento.¹⁰
7. Os dispositivos de teste *illumigene* Malaria contêm reagentes liofilizados. As bolsas protetoras não devem ser abertas até estar pronto para executar o ensaio.
8. Os dispositivos de teste *illumigene* Malaria incluem um sistema de fecho concebido para prevenir a contaminação da área de teste com o produto de amplificação. NÃO utilize Dispositivos de teste com sistemas de fecho partidos.
9. Elimine os Dispositivos de teste *illumigene* Malaria, as Colunas *M-prep* e os tubos usados imediatamente após o processamento. Deixe o fecho do Dispositivo de teste devidamente fechado. NÃO abra o Dispositivo de teste após o processamento. A abertura do dispositivo após a amplificação pode resultar na contaminação da área de teste com o produto de amplificação.

DECLARAÇÕES DE PERIGO E PRECAUÇÃO

Consulte a FDS, disponível em www.meridianbioscience.com, para aceder às Declarações de perigo e precaução.

VIDA ÚTIL E ARMAZENAMENTO

O prazo de validade é indicado no rótulo do kit. Armazene os componentes do kit à temperatura indicada no rótulo.

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

Certifique-se de que os reagentes estão à temperatura ambiente (19-30 C) antes da utilização. Certifique-se de que o Tampão I foi aquecido até atingir completamente a temperatura ambiente antes da utilização e que não são visíveis quaisquer precipitados. O dispositivo pode gerar resultados incorretos se os reagentes não estiverem à temperatura ambiente antes da utilização.

PREPARAÇÃO DAS COLUNAS (apenas para *illumigene* Malaria PLUS Referência 281125)

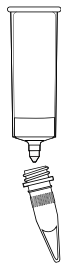
Inspeccione visualmente cada Coluna *M-Prep* e certifique-se de que o leito da coluna e os filtros não sofreram alterações durante o transporte. Colunas com leitos de resina alterados ou filtros incorretamente colocados podem não funcionar corretamente.

Preparação da coluna:

1. Utilize 1 coluna *M-prep* para cada amostra a testar. Remova a tampa superior e a ponta desenroscável inferior.
2. Coloque a ponta da coluna num tubo ST. O tubo ST deve ser mantido com um ligeiro nível de inclinação (aproximadamente 15 graus) da coluna *M-prep*.
3. Deixar a coluna *M-prep* drenar para o tubo ST. As colunas *M-prep* drenadas devem ser utilizadas no espaço de 1 hora.
4. Avance para a Preparação das amostras para o *illumigene* Malaria PLUS.

NOTA: não assente a coluna diretamente no tubo de colheita, uma vez que tal pode criar uma vedação e causar um fluxo inadequado através da coluna. Consulte a **Figura 1** para a colocação correta da coluna e do tubo de colheita.

FIGURA 1: Colocação da coluna *M-prep* e do tubo ST



COLHEITA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Tipo de amostra: amostras de sangue venoso total humano com EDTA como conservante.

Colheita de amostras: a colheita das amostras de sangue venoso total deve ser feita para um tubo de amostra com EDTA seguindo as diretrizes institucionais para a colheita de amostras clínicas para infecção por malária. Certifique-se de que o tubo de colheita de sangue é imediatamente invertido após a colheita, pelo menos 8 vezes ou de acordo com as instruções do fabricante.

As amostras de sangue venoso total com EDTA podem ser armazenadas a 2-30 C após a colheita e durante o transporte para o laboratório. As amostras devem ser analisadas assim que possível, mas podem ser armazenadas durante, no máximo, 7 dias à temperatura ambiente (19-30 C) ou durante, no máximo, 14 dias refrigeradas (2-8 C) antes da análise. As amostras que não se destinam a ser analisadas durante este período de tempo devem ser imediatamente congeladas a -20 C durante, no máximo, 30 dias até serem analisadas. As amostras podem ser congeladas e descongeladas 2 vezes após o armazenamento a -20 C antes de serem analisadas com os ensaios *illumigene* Malária.

PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

NOTA: certifique-se de que o *illumipro-10* está ligado e que realizou as verificações de desempenho necessárias antes de iniciar a PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS. Consulte o Manual do Operador *illumipro-10* para obter mais informações acerca da preparação e funcionamento do instrumento.

NOTA: certifique-se de que as amostras estão à temperatura ambiente (19-30 C) antes da preparação das amostras.

As amostras a analisar com o ensaio *illumigene* Malária podem ser preparadas utilizando um dos seguintes métodos:

1. Preparação de amostras *illumigene* Malária (Referência 280925)

- Inverta a amostra de sangue total com EDTA 2 a 3 vezes para obter uma mistura homogênea.
- Adicione 50 µL da amostra de sangue venoso total colhida (com EDTA) a um tubo de Tampão I. Misture por inversão 5 vezes ou utilize o agitador vórtex durante aproximadamente 10 segundos. Segure na amostra durante 2 minutos.
- Misture por inversão 5 vezes ou utilize o agitador vórtex durante aproximadamente 10 segundos e transfira imediatamente 50 µL de lisato para o SMP PREP IV. Misture por inversão 5 vezes ou utilize o agitador vórtex durante 10 segundos.
- Aperte cuidadosamente o SMP PREP IV e proceda lentamente à colheita de 5 a 10 gotas para um tubo I limpo. Verifique visualmente se o eluato apresenta uma coloração vermelha a castanho avermelhado. Etiquete o tubo com a identificação da amostra e avance para o Procedimento de teste.

2. Preparação de amostras *illumigene* Malária PLUS (Referência 281125)

NOTA: os passos de eluição da amostra com colunas *M-prep* não devem demorar mais do que 30 minutos. As amostras cuja eluição demorar mais de 30 minutos devem ser eliminadas e novamente analisadas com a amostra original do doente.

- Inverta a amostra de sangue total com EDTA 2 a 3 vezes para obter uma mistura homogênea.
- Adicione 50 µL da amostra de sangue venoso total colhida (com EDTA) a um tubo de Tampão I. Misture por inversão 5 vezes ou utilize o agitador vórtex durante aproximadamente 10 segundos. Segure na amostra durante 2 minutos.
- Misture por inversão 5 vezes ou utilize o agitador vórtex durante aproximadamente 10 segundos e, com uma micropipeta, transfira imediatamente 250 µL da amostra preparada para a parte superior de uma coluna *M-prep* devidamente etiquetada e preparada. Aguarde aproximadamente 2 minutos ou até a amostra ter sido absorvida pela coluna e o fluxo parar. Este passo não deve demorar mais do que 30 minutos.
- Com uma micropipeta, adicione 250 µL de tampão *M-prep* II à parte superior da coluna *M-prep*. Elimine a ponta da pipeta. A coluna terá um aspecto avermelhado depois de adicionar o tampão *M-prep* II. Aguarde aproximadamente 2 minutos ou até o tampão de cor avermelhada ter sido absorvido pela coluna e o fluxo parar. Este passo não deve demorar mais do que 30 minutos.
- Remova a última gota de líquido da ponta da coluna com o tubo ST. Elimine o tubo.
- Coloque um tubo ST limpo por baixo da coluna *M-prep*. Com uma micropipeta, adicione 250 µL de tampão *M-prep* III à parte superior da coluna *M-prep*. Elimine a ponta da pipeta. Aguarde aproximadamente 2 minutos ou até o fluxo parar. Este passo não deve demorar mais do que 30 minutos.
- Remova a última gota de líquido da ponta da coluna com o tubo ST. Inspeção visualmente se o eluato apresenta uma coloração vermelha a castanho avermelhado. Etiquete o tubo com as informações de identificação da amostra e avance para o Procedimento de teste.

PROCEDIMENTO DE TESTE

NOTA: é possível processar até 10 amostras num único processamento do *illumipro-10*.

- Retire 1 Dispositivo de teste *illumigene* Malária da bolsa protetora por cada amostra. Abra cuidadosamente o dispositivo, segurando nas câmaras de modo a que os reagentes liofilizados não caiam aquando da abertura. Coloque o dispositivo numa superfície plana ou num suporte que possa acomodar o dispositivo.
- Com uma micropipeta, transfira 50 µL da amostra para as câmaras de TESTE (esfera branca) e de CONTROLO (esfera amarela) do teste *illumigene* Malária. Tenha cuidado para não introduzir ar na mistura de reação.
- Feche o dispositivo de teste *illumigene* e bloqueie devidamente os fechos.
- Toque no(s) dispositivo(s) na bancada ou misture para remover quaisquer bolhas de ar. Examine cuidadosamente o(s) dispositivo de teste(s) quanto à reidratação da esfera de controlo/teste, quanto à presença de bolhas de ar na câmara e quanto a líquido na parte superior do dispositivo. Se detetar esferas não dissolvidas, bolhas de ar ou líquido na parte superior do dispositivo, toque no dispositivo na bancada e repita a inspeção visual. A amplificação e a deteção devem ser iniciadas no espaço de 15 minutos.
- Repita os passos do Procedimento de teste para todas as amostras a analisar.
- Introduza os Dispositivos de teste *illumigene* no *illumipro-10* e inicie o processamento utilizando o programa Malária. Os resultados serão apresentados no fim do processamento.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

ID da amostra	Resultado reportado	Interpretação
Amostra do doente	POSITIVO	A amostra contém ADN alvo de <i>Plasmodium sp.</i>
	NEGATIVO	Não foi detetado ADN de <i>Plasmodium sp.</i>
	INVÁLIDO	Sem resultados notificáveis. Repita o teste utilizando a amostra original. Amostra de doente inibitória, preparação indevida da amostra, falha do reagente, falha do instrumento ou falha do controlo interno.
Controlo positivo	POSITIVO	Resultado de controlo positivo válido. Reagentes ativos no momento de utilização, o <i>illumipro-10</i> funciona corretamente.
	NEGATIVO	Resultado de controlo incorreto. Repita os testes de controlo como o primeiro passo para determinar a causa de origem da falha. Se as falhas de controlo persistirem, contacte o Departamento de Assistência Técnica da Meridian através do número 1-800-343-3858 (EUA) ou o seu distribuidor local.
	INVÁLIDO	Sem resultados notificáveis. Repita o processamento de ensaio na íntegra utilizando as amostras originais. Preparação indevida da amostra, falha do reagente, falha do instrumento ou falha do controlo interno.
	POSITIVO	Resultado de controlo incorreto. Repita os testes de controlo como o primeiro passo para determinar a causa de origem da falha. Se as falhas de controlo persistirem, contacte o Departamento de Assistência Técnica da Meridian através do número 1-800-343-3858 (EUA) ou o seu distribuidor local.
Controlo negativo	NEGATIVO	Resultado de controlo negativo válido. Reagentes ativos no momento de utilização, o <i>illumipro-10</i> funciona corretamente.
	INVÁLIDO	Sem resultados reportáveis. Repita o processamento de ensaio na íntegra utilizando as amostras originais. Preparação indevida da amostra, falha do reagente, falha do instrumento ou falha do controlo interno.
POÇO VAZIO	NENHUM	Nenhum Dispositivo de teste <i>illumigene</i> no poço <i>illumipro-10</i> . OU O Dispositivo de teste <i>illumigene</i> presente está comprometido devido a falha na preparação da amostra, sujidade no dispositivo ou dispositivo incorretamente colocado. Repita o teste utilizando a amostra original.

CONTROLO DE QUALIDADE

Este teste deve ser realizado de acordo com os regulamentos locais, estatais ou federais aplicáveis e de acordo com os organismos de acreditação.

- Cada dispositivo contém um controlo interno que controla a inibição da amplificação, os reagentes do ensaio, a preparação do ADN e a eficácia de processamento da amostra. O ADN mitocondrial humano, que atua como ADN de controlo interno, é isolado da amostra de sangue total e processado seguindo todos os passos do procedimento. Os primers para a amplificação do ADN de controlo interno estão presentes na Câmara de controlo do Dispositivo de teste *illumigene*.
- As boas práticas laboratoriais recomendam a utilização de materiais de controlo. Os utilizadores devem seguir as diretrizes federais, estatais e locais aplicáveis no que diz respeito à execução de controlos de qualidade externos.
- O Reagente de controlo positivo externo *illumigene* Malária é fornecido separadamente (Referência 279970). Alternativamente, as amostras de sangue previamente caracterizadas como clínicas ou forçadas para *Plasmodium sp.* podem ser utilizadas como controlo positivo externo. Como controlo negativo externo, é possível utilizar uma amostra de sangue total humano com EDTA qualificada como validada. Recomenda-se que a reatividade de cada novo lote e de cada nova remessa de *illumigene* Malária e *illumigene* Malária PLUS seja verificada aquando da receção e antes da utilização. Os testes de controlo externo devem ser realizados em seguida, de acordo com as diretrizes federais, estatais e locais apropriadas. O kit de teste *illumigene* Malária e o kit de teste *illumigene* Malária PLUS não devem ser utilizados em testes do doente se os controlos externos não produzirem resultados corretos.
- Deverá ser utilizado um Dispositivo de teste individual para cada reagente de controlo externo.

VALORES ESPERADOS

A incidência de *Plasmodium sp.*, conforme detetada pelo ensaio *illumigene* Malária durante o estudo clínico de 2015 foi de 68,1% (147/216) utilizando o método de preparação de amostras *illumigene* Malária (Referência 280925) e de 70,6% (149/211) utilizando o método *illumigene* Malária PLUS (Referência 281125). A incidência global de cada espécie *Plasmodium* é apresentada abaixo.

Espécie	Prevalência por espécie <i>Plasmodium</i>			
	<i>illumigene</i> Malária (n=216)		<i>illumigene</i> Malária PLUS (n=211)	
	Total positivos	Prevalência	Total positivos	Prevalência
<i>P. falciparum</i>	137	63,4%	134	63,5%
<i>P. vivax</i>	0	0%	0	0%
<i>P. ovale</i>	1	0,5%	1	0,5%
<i>P. malariae</i>	1	0,5%	1	0,5%
<i>P. knowlesi</i>	0	0%	0	0%
Desconhecida*	8	3,7%	13	6,2%

*As amostras não puderam ser determinadas dado que as amostras foram negativas por microscopia.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

- Este produto só pode ser utilizado com o instrumento *illumipro-10*.
- Os ensaios *illumigene* Malária e *illumigene* Malária PLUS não distinguem entre as diferentes espécies *Plasmodium*.
- Se o hematócrito (> 57,5%) e os níveis de hemoglobina (> 30 g/dl) forem superiores aos níveis fisiológicos normais, os resultados dos ensaios *illumigene* Malária podem não ser válidos.
- O desempenho dos ensaios *illumigene* Malária não foi estabelecido para amostras de concentrados de eritrócitos.
- O desempenho do *Plasmodium knowlesi* com o ensaio *illumigene* Malária foi estabelecido utilizando apenas ADN genómico purificado; não foram efetuados testes com o organismo completo.
- Os ensaios *illumigene* Malária e *illumigene* Malária PLUS são ensaios qualitativos e não fornecem valores quantitativos ou informações acerca da carga de organismos.
- A deteção de ácidos nucleicos depende de uma colheita de amostras, manuseamento, transporte, armazenamento e preparação adequados. O não cumprimento do procedimento apropriado em qualquer um destes passos pode conduzir a resultados incorretos.
- Os ácidos nucleicos dos organismos podem persistir *in vivo*, independentemente da viabilidade do organismo. Os ensaios *illumigene* Malária e *illumigene* Malária PLUS não distinguem organismos viáveis dos não viáveis.
- À semelhança de todos os testes de diagnóstico molecular, podem obter-se (A) resultados falsos negativos pela presença de inibidores, erro técnico, mistura de amostras ou números baixos de organismos na amostra clínica; (B) resultados falsos positivos pela presença de contaminação cruzada por organismos alvo, dos respetivos ácidos nucleicos ou produto amplificado e de sinais não específicos.

CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DO DESEMPENHO

As características de desempenho dos ensaios de amplificação de ADN *illumigene* Malária e *illumigene* Malária PLUS foram estabelecidas em ensaios clínicos realizados no Senegal, África, em novembro de 2015. As características de desempenho do ensaio foram comparadas com o método de referência, microscopia com película fina e espessa. A identificação das espécies *Plasmodium* para todas as amostras positivas foi determinada por microscopia.

As amostras incluíram amostras de sangue venoso total prospectivas e retrospectivas com EDTA de doentes com sinais e sintomas de infeção por *Plasmodium*. No total, foram avaliadas 216 amostras de sangue total elegíveis e anonimadas. 66 amostras foram analisadas prospectivamente e 150 amostras foram colhidas prospectivamente e armazenadas congeladas antes do teste com o ensaio *illumigene* Malaria (retrospectivo). Cada amostra foi preparada pelos métodos de preparação de amostras *illumigene* Malaria e *illumigene* Malaria PLUS. Adicionalmente, outras cinco amostras foram consideradas não elegíveis para o ensaio *illumigene* Malaria devido a um erro de processamento. Por conseguinte, existem 211 amostras elegíveis para o *illumigene* Malaria PLUS. Todas as amostras foram analisadas prospectivamente por microscopia.

A análise do desempenho do ensaio com amostras prospectivas e retrospectivas indicou não existir qualquer diferença de desempenho para amostras frescas e congeladas com os ensaios *illumigene* Malaria e *illumigene* Malaria PLUS. As tabelas abaixo resumem o desempenho dos ensaios de amplificação de ADN *illumigene* Malaria e *illumigene* Malaria PLUS para as amostras prospectivas e retrospectivas combinadas.

Desempenho do *illumigene* Malaria comparado com microscopia

	Microscopia			<i>illumigene</i>	Desempenho				
	Pos	Neg	Total		Sensibilidade	100,0%	139/139	IC de 95%	
	INVA								
<i>illumigene</i> Malaria	Pos	139	8	147	0(1)				
	Neg	0	67	67	2(2)	Especificidade	89,3%	67/75	80,3-94,5%
	Total	139	75	214	2				

*Os resultados inicialmente inválidos são apresentados entre parêntesis. O número final de amostras inválidas remanescentes após a repetição do teste é apresentado antes dos parêntesis.

Desempenho do *illumigene* Malaria PLUS comparado com microscopia

	Microscopia			<i>illumigene</i>	Desempenho				
	Pos	Neg	Total		Sensibilidade	100,0%	136/136	IC de 95%	
	INVA								
<i>illumigene</i> Malaria PLUS	Pos	136	13	149	0				
	Neg	0	62	62	0	Especificidade	82,7%	62/75	72,6-89,6%
	Total	136	75	211	0				

As amostras foram colhidas de doentes com idades compreendidas entre 4 e 77 anos. 15 tinham idades compreendidas entre 1 e 12 anos; 75 tinham idades compreendidas entre 13 e 21 anos; 125 tinham ≥ 22 anos de idade; não foi possível definir a idade de um dos doentes. Não foi observada qualquer diferença de desempenho significativa com base na idade. A população do estudo incluiu 84 (38,9%) doentes do sexo feminino e 131 (60,6%) doentes do sexo masculino; não foi possível definir o género de um dos doentes. Não se prevê que o desempenho do ensaio seja influenciado pelo género.

SENSIBILIDADE ANALÍTICA

O Limite de deteção (LdD) foi determinado utilizando as espécies *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax*. O LdD foi confirmado utilizando 20 réplicas e uma probabilidade determinada (por ex., 95%, em que 19/20 réplicas são positivas) de obtenção de respostas positivas.

	<i>illumigene</i> Malaria	<i>illumigene</i> Malaria PLUS
Espécies <i>Plasmodium</i>	Parasitas/ μ L	Parasitas/ μ L
<i>P. falciparum</i> (3D7)	2	0,25
<i>P. vivax</i> (Índia VII)	0,125	0,063

REATIVIDADE DO ENSAIO

Foram diluídas reservas quantificadas de ADN de *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi* em sangue total negativo com aproximadamente o triplo do limite de deteção para cada método de preparação de amostras *illumigene* Malaria e *illumigene* Malaria PLUS (aproximadamente 72 cópias/ μ L de 6 parasitas/ μ L para *illumigene* Malaria; aproximadamente 9 cópias/ μ L ou 0,75 parasitas/ μ L para *illumigene* Malaria PLUS). Todas as espécies reagiram nas concentrações testadas.

REPRODUTIBILIDADE

Foram realizados estudos de reprodutibilidade por três laboratórios internos. Foram fornecidos painéis codificados de forma oculta de 10 amostras aos laboratórios participantes. Os painéis incluíram amostras forçadas de *Plasmodium falciparum* (estirpe 3D7) fabricadas como amostras moderadamente positivas, amostras fracamente positivas ou amostras fortemente negativas. O painel incluiu igualmente uma amostra de sangue total negativa. Os testes foram realizados por, pelo menos, 2 operadores diferentes em cada laboratório no mesmo dia (variabilidade intra-ensaio) durante cinco dias (variabilidade inter-ensaio). Neste estudo, foram utilizados três lotes de *illumigene* Malaria ou *illumigene* Malaria PLUS e 8 instrumentos *illumipro-10*. Foram testados controlos externos positivos e negativos com cada painel; foi utilizada uma amostra de sangue negativa qualificada como Controlo negativo.

Resumo do estudo de reprodutibilidade: Método de preparação de amostras <i>illumigene</i> Malaria								
Tipo de amostra	Local 1		Local 2		Local 3		Total	
	Percentagem de concordância	Percentagem de concordância	Percentagem de concordância	Percentagem de concordância	Percentagem de concordância	Percentagem de concordância	Percentagem de concordância	Percentagem de concordância
Moderadamente positiva (8 parasitas/ μ L)	30/30	100,0%	30/30	100,0%	30/30	100,0%	90/90	100,0%
Fracamente positiva (2 parasitas/ μ L)	30/30	100,0%	30/30	100,0%	30/30	100,0%	90/90	100,0%
Fortemente negativa (0,458 parasitas/ μ L)	30/30	100,0%	30/30	100,0%	30/30	100,0%	90/90	100,0%
Negativa	10/10	100,0%	10/10	100,0%	10/10	100,0%	30/30	100,0%
Controlo negativo	10/10	100,0%	10/10	100,0%	10/10	100,0%	30/30	100,0%
Controlo positivo	10/10	100,0%	10/10	100,0%	10/10	100,0%	30/30	100,0%

Resumo do estudo de reprodutibilidade: Método de preparação de amostras <i>illumigene</i> Malaria PLUS								
Tipo de amostra	Local 1		Local 2		Local 3		Total	
	Percentagem de concordância	Percentagem de concordância	Percentagem de concordância	Percentagem de concordância	Percentagem de concordância	Percentagem de concordância	Percentagem de concordância	Percentagem de concordância
Moderadamente positiva (1 parasita/ μ L)	30/30	100,0%	30/30	100,0%	30/30	100,0%	90/90	100,0%
Fracamente positiva (0,5 parasitas/ μ L)	30/30	100,0%	30/30	100,0%	30/30	100,0%	90/90	100,0%
Fortemente negativa (0,029 parasitas/ μ L)	29/30	96,7%	28/30	93,3%	30/30	100,0%	87/90	96,7%
Negativa	10/10	100,0%	10/10	100,0%	10/10	100,0%	30/30	100,0%
Controlo negativo	10/10	100,0%	10/10	100,0%	10/10	100,0%	30/30	100,0%
Controlo positivo	10/10	100,0%	10/10	100,0%	10/10	100,0%	30/30	100,0%

ESTUDOS DE REATIVIDADE CRUZADA

Os estudos de reatividade cruzada utilizaram amostras de sangue total positivas (*P. falciparum* 3D7) e negativas inoculadas com organismos bacterianos ou fúngicos até uma concentração mínima de $1,0 \times 10^6$ UFC/mL, vírus a uma concentração mínima de $1,0 \times 10^5$ TCID₅₀/mL ou protozoários até uma concentração mínima de $1,0 \times 10^5$ organismos/mL. Nos casos em que os organismos totais não estavam disponíveis, foi testada uma concentração de $1,0 \times 10^6$ cópias/mL para ADN genómico. Nenhum dos organismos seguintes nem o respetivo material genético reagiu com os ensaios *illumigene* Malaria:

Babesia microti, *Borrelia burgdorferi*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Leishmania donovani*, *Leishmania infantum*, *Leptospira interrogans*, *Mycobacterium smegmatis*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Treponema pallidum*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Citomegalovirus* (CMV), vírus Epstein-Barr (VEB), vírus da Hepatite B, vírus da Hepatite C, vírus Herpes simplex 1 (VHS 1), VIH-1, vírus do Papiloma humano (HPV) e o vírus da Rubéola.

Não foi possível obter os seguintes organismos nem o respetivo ADN para o teste e foram avaliados através da análise *in silico*. Não se espera que nenhum dos organismos seguintes reaja com os ensaios *illumigene* Malaria com base nesta análise:

Anaplasma phagocytophilum, *Clostridium botulinum*, *Orientia tsutsugamushi*, *Rickettsia conorii*, *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia typhi*, vírus Chikungunya, vírus da Dengue (tipos 1-4), vírus do Nilo ocidental e vírus da Febre amarela.

O ADN genómico humano não foi reativo a $1,0 \times 10^6$ cópias/mL.

TESTES PARA SUBSTÂNCIAS INTERFERENTES

Foram realizados testes de interferência na presença de concentrações mais desfavoráveis de substâncias químicas e biológicas introduzidas diretamente em amostras de sangue total forçadas fracamente positivas (*P. falciparum* 3D7) e negativas. Não é observada qualquer interferência com as seguintes substâncias para qualquer um dos métodos de preparação de amostras *illumigene* Malaria:

Acetaminofeno (1 mg/mL), amoxicilina (0,1 mg/mL), artesunato (1 mg/mL), aspirina (1 mg/mL), atovaquona (0,1 mg/mL), cefalexina (0,1 mg/mL), cloroquina (1 mg/mL), ciprofloxacina (0,1 mg/mL), clindamicina (1 mg/mL), cloridrato de doxiciclina (1 mg/mL), entriomicina (0,1 mg/mL), sulfato de hidroxiquina (1 mg/mL), ibuprofeno (1 mg/mL), lumefantina (1 mg/mL), mefloquina (1 mg/mL), fosfato de primaquina (1 mg/mL), cloridrato de proguanil (1 mg/mL), pirimetamina (1 mg/mL), sulfato de quinina (1 mg/mL), citrato de sódio (0,11 M), bilirrubina elevada (> 0,15 mg/mL), leucócitos (camada leuco-plaquetária, buffy coat) >10% v/v, albumina sérica (> 0,03 g/L) e triglicéridos (> 9,9 mg/mL).

Um hematócrito (> 57,5%) e hemoglobina (> 30 g/dl) acima dos níveis fisiológicos normais pode produzir resultados inválidos com os ensaios *illumigene* Malaria.


REFERÊNCIAS

- Nagamine K, Hase T, Notoni T. Reação acelerada por amplificações isotérmicas mediadas em loop utilizando primers em loop. *Sondas celulares mol* 2002;16:223-29.
- Mori Y, Kitao M, Tomita N, Notoni T. Turbidimetria em tempo real de reação LAMP para quantificar o ADN molde. *J Biochem Biophys* 2004;59:145-47.
- Relatório mundial sobre a malária 2014. Programa global da malária, Organização Mundial de Saúde. http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report/en/.
- Cowman AF e Crabb BS. Invasão de eritrócitos por parasitas de malária. *Cell* 2006; 124: 755-766.
- Tratamento da malária (Diretrizes para médicos). Centros de Prevenção e Controlo de Doenças, Julho 2013. www.cdc.gov/malaria/resources/pdf/clinicalguidance.pdf.
- O'Meara WP, Barcus M, Wongsrichanalai C, Muth S, Maguire JD, Jordan RG, Prescott WR e McKenzie FE. Técnica do leitor como uma fonte de variabilidade na determinação da densidade de parasitas da malária por microscopia. *Malária J* 2006;5:118.
- McKenzie FE, Sirichaisinthop J, Miller RS, Gasser RA e Wongsrichanalai C. Dependência da deteção da malária e diagnóstico de espécies por microscopia na densidade de parasitas. *Am J Trop Med Hyg* 2003;69(4):372-376.
- Wongsrichanalai C, Barcus MJ, Muth S, Sutarnahardja A e Wernsdorfer WH. Uma análise das ferramentas de diagnóstico da malária: Microscopia e testes de diagnóstico rápido (TDR). *Am J Trop Med Hyg* 2007;77(6):119-127.
- Departamento dos EUA de Serviços de Saúde e Humanos PHS/CDC/NIH. Biossegurança em laboratórios de microbiologia e biomédicos. Washington DC: Imprensa do Governo dos EUA, 2007.
- CLSI: MM3-A2 Métodos de diagnóstico molecular para doenças infecciosas; diretriz aprovada, 2ª ed. Wayne PA: Clinical Laboratory Standards Institute. 2006.



SN11102

REV. 01/16










Fabricado por

Meridian Bioscience, Inc.
Sede nos EUA/Corporativa
3471 River Hills Drive
Cincinnati, OH 45244
Telefone: 513.271.3700
Encomendas/Apoio ao Cliente: 800.543.1980
Centro de Assistência Técnica: 800.343.3858
Fax para informações: 513.272.5432
Fax para encomendas: 513.271.0124

UTILIZAÇÃO DE SÍMBOLOS

Poderá ver um ou mais do que um destes símbolos na rotulagem/embalagem deste produto:

Legenda dos símbolos

	Prazo de validade	CONTROL +	Controlo positivo
LOT	Código do lote	CONTROL -	Controlo negativo
IVD	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro	EC REP	Representante autorizado na Comunidade Europeia
	Este produto cumpre os requisitos da Diretiva 98/79/CE relativa a dispositivos médicos de diagnóstico in vitro	SMP PREP DIL SPE	Aparelho de preparação de amostras com diluente de amostras
REF	Referência		Não congelar
	Consultar as Instruções de Utilização	RoHS	Restrição de substâncias perigosas
	Fabricante		Atenção, consultar os documentos fornecidos
	Apenas para uma única utilização	STERILE R	Esterilização por radiação gama
	Sexo feminino	STERILE EO	Esterilização por óxido de etileno
	Conteúdo suficiente para <n> testes	BUF RXN	Tampão de reação
	Limites de temperatura		Marca registada de certificação ETL
SN	Número de série		Reciclar - não eliminar como lixo comum
TEST	Dispositivo de teste	HT TUBE	Tubo de tratamento térmico
	Data de fabrico		Apenas para avaliação do desempenho IVD
	RADIAÇÃO LASER: evitar exposição ao feixe		SUPERFÍCIE QUENTE: mantenha as mãos afastadas de superfícies quentes
CAUTION	PRECAUÇÃO: radiação laser	IPX-0	PRECAUÇÃO: proteger contra a entrada de água
	PRECAUÇÃO: potencial perigo	CONTROL	Controlo do ensaio
BUF	Tampão	MIN OIL	Óleo mineral
MEDIA	Meio		Aviso
ST TUBE	Tubo com tampa de enroscar	IUO	Apenas para utilização em investigação
RUO	Apenas para utilização em investigação	COL	Coluna de preparação de amostras
BUF SMP	Tampão de amostra	PRE REAG	Reagente pré-tratamento
Rx Only	Apenas para utilização mediante prescrição	SMP PREP	Preparação de amostras

Para assistência técnica, contacte o Departamento de Assistência Técnica através do número 800-343-3858 entre as 8.00 e as 18.00, horário padrão da costa leste dos Estados Unidos. Para fazer uma encomenda, contacte o Departamento de Apoio ao Cliente através do número 800-543-1980.