

Instrução de Uso - KIT IBMP
 Biomol Malária
 IU-IVD-005
 Revisão 05/04/11/2022

1. NOME COMERCIAL

Kit IBMP Biomol Malária

2. DADOS DO FABRICANTE

INSTITUTO DE BIOLOGIA MOLECULAR DO PARANÁ – IBMP
 CNPJ: 03.585.986/0001-05
 RUA PROFESSOR ALGACYR MUNHOZ MADER, 3.775
 CEP 81350-010 - CURITIBA – PARANÁ – BRASIL
 Suporte e Assessoria Científica: 0800 400 4267
 Horário de atendimento: segunda à sexta-feira, das 8:30 às 16:30h (exceto feriados)
 sac@ibmp.org.br | www.ibmp.org.br

3. APRESENTAÇÃO

Kit para 96 determinações (Para cada alvo: 46 amostras; 1 poço para Controle Positivo; 1 poço para Controle Negativo).

4. FINALIDADE

Teste molecular para detecção laboratorial qualitativa (presença/ausência) dos protozoários *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax* em amostras de sangue total através da técnica de PCR em tempo real.

USO EM DIAGNÓSTICO IN VITRO

5. USUÁRIO PRETENDIDO

O teste deve ser realizado por profissionais da área de saúde com conhecimento específico em biologia molecular.

6. INDICAÇÕES DE ARMAZENAMENTO OU MANUSEIO

O transporte do Módulo de Amplificação Kit IBMP Biomol Malária deve ser realizado em gelo seco e o armazenamento deve ser feito entre -35 e -15°C.

7. PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO

O Kit IBMP Biomol Malária utiliza a técnica de PCR em Tempo Real (PCR - Reação em Cadeia pela Polimerase). A reação de PCR em Tempo Real permite a detecção de sequências específicas, em uma amostra de DNA extraído, a partir da captura de intensidade de fluorescência, durante o andamento da reação.

O Kit IBMP Biomol Malária permite a detecção dos protozoários *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax* além de um Controle Interno (CI) da reação. A detecção da presença de ácidos nucleicos do patógeno e do Controle



Interno é feita através da utilização de sondas específicas para cada alvo molecular (oligonucleotídeos marcados com fluorescência). O teste é realizado através do preparo de duas diferentes misturas de reação de PCR, uma específica para o alvo *P. falciparum* e outra para o alvo *P. vivax*. Em ambas as reações existe a presença do alvo para controle interno da reação (CI).

A amplificação do Controle Interno indica o funcionamento adequado da reação (reagentes e operador) e a qualidade do DNA extraído. Em amostras negativas, apenas o Controle Interno é detectado. Já a amplificação para os dois alvos moleculares (patógeno e CI) indica a presença de DNA do protozoário na amostra.

Esse KIT foi desenvolvido para a realização de análises de perfil qualitativo, ou seja, avalia apenas a presença ou ausência do alvo molecular.

8. TIPO DE AMOSTRAS OU MATRIZES APLICÁVEIS

Produto deve ser utilizado em DNA extraído de amostras de sangue total coletado em tubo apropriado contendo EDTA.

8.1. Condições de coleta, manuseio, preparo ou preservação de amostras

A coleta da amostra de sangue total deve ser feita através de punção de veia do braço e coleta em tubo específico contendo EDTA como conservante. Após a coleta, a amostra deverá ser processada para armazenamento, podendo ser mantida em geladeira por até 48 horas. As extrações de DNA das amostras foram validadas com o kit de Extração de Ácidos Nucleicos "QIAamp DNA Blood Mini Kit" (QIAGEN) adotando o protocolo estabelecido pelo fabricante. Após a purificação, o DNA deve ser guardado em freezer -20°C.

9. DESCRIÇÃO DO PRODUTO

9.1. Composição

O Kit IBMP Biomol Malária é composto por:

- 01 microtubo contendo 1100 µL de Água RNase Free;
- 01 microtubo contendo 900 µL de Mistura de PCR;
- 01 microtubo contendo 60 µL de OligoMix Vivax
- 01 microtubo contendo 60 µL de OligoMix FAL;
- 01 microtubo contendo 60 µL de Controle Negativo;
- 01 microtubo contendo 60 µL de Controle Positivo;

9.2. Materiais necessários não fornecidos com o produto

- Equipamentos de proteção individual (jaleco, máscara descartável, óculos de segurança, luvas sem pó descartáveis);

- Tubos para diluição e armazenamento de amostras;
- Microtubos de 1,5 ou 2,0 mL para o preparo da reação;
- Micropipetas de precisão (0,5-10 µL; 2,0-20 µL; 10-100 µL e 100-1000 µL);
- 01 placa de PCR (96 poços) ou tubos de qPCR compatíveis com Rotor-Gene Q;
- 01 adesivo óptico para placa de PCR;
- Kit de extração de ácidos nucleicos;
- Cabine de segurança biológica;
- Centrífuga para microtubos;
- Centrífuga para microplacas;
- Agitador tipo vórtex;
- 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems) ou Rotor-Gene Q (Qiagen).

10. ESTABILIDADE DO PRODUTO EM USO

O estudo de estabilidade em uso apresentou desempenho satisfatório mesmo após cinco ciclos de descongelamento. Desta forma, sugere-se que, quando não utilizado em sua totalidade, o módulo de amplificação Kit IBMP Biomol Malária pode ser congelado/descongelado até cinco vezes. A temperatura ambiente indicada para manipulação deste produto é entre 15 e 25°C.

11. PROCEDIMENTOS A SEREM REALIZADOS ANTES DA UTILIZAÇÃO DO PRODUTO

A extração e purificação do DNA presente na amostra deverá ser realizada conforme orientações do fabricante do kit indicado. Após a purificação, o DNA deve ser armazenado em freezer -20°C.

Importante: Descongelar os reagentes do kit e centrifugá-los. Manter os reagentes em gelo durante todo o processo de preparo da reação.

12. PROCEDIMENTOS DE CONTROLE DE QUALIDADE

- Cuidados com Controle Positivo: deve-se manusear o controle positivo com cuidado e atenção para evitar possíveis contaminações do CP nos poços de amostras e gerar resultados falso-positivos.
- Cuidados com Controle Interno: ao manusear o kit de amplificação, é importante utilizar os EPIs corretamente, a fim de evitar a contaminação das amostras por manipulação do operador e ocorrer a amplificação do controle interno (alvo humano).
- Cuidados de contaminação: Para o bom funcionamento do kit de amplificação, o manuseio deve ocorrer em áreas segregadas ou dentro de cabines de manipulação

Instrução de Uso - KIT IBMP Biomol Malária 1



de preparo de reações de PCR com superfícies devidamente descontaminadas. O operador deve estar devidamente paramentado (máscara, touca, jaleco e luvas), utilizar ponteiros descartáveis com filtro.

- Cuidados de descarte: Por se tratar da manipulação de amostras biológicas, os componentes do kit devem ser descartados conforme legislação vigente e normas da instituição.

13. PROCEDIMENTOS PARA O USO DO PRODUTO

13.1. Em equipamentos 7500 Real-Time PCR system

13.1.1. Preparo da reação

- Identificar dois tubos de 1,5 ou 2,0 mL para o preparo das reações.
- No caso de utilização do kit em sua totalidade é necessário preparar um volume suficiente para 50 reações para cada alvo (*P. falciparum* e *P. vivax*). Adicionar aos tubos, devidamente identificados, os volumes conforme tabela abaixo:

REAGENTE	50 reações VOLUME (µL)	1 reação VOLUME (µL)
Mistura de PCR	417	8,34
OligoMix FAL OU OligoMix VIVAX	50	1
Água RNase Free	533	10,66
TOTAL	1.024	20

IMPORTANTE. Este kit é composto por dois Oligomix, específicos para detectar cada um dos *Plasmodium* alvo. O kit é composto pelo Oligomix *Falciparum* e Oligomix *P. Vivax*. Sendo assim, é necessário preparar um tubo de mistura de reação para cada um dos alvos, conforme tabela acima.

- Misturar os reagentes por inversão. Após o preparo das misturas de reação centrifugar os tubos e distribuir 20,0 µL do mix de reação em cada poço da placa, sugerindo-se que a metade da placa nas colunas de 1 a 6 (em azul) seja destinada à reação de *P. falciparum* e nas colunas de 7 a 12 (alaranjado) à reação de *P. vivax* conforme o esquema sugerido abaixo:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CN	P07	P15	P23	P31	P39	CN	P07	P15	P23	P31	P39
B	CP	P08	P16	P24	P32	P40	CP	P08	P16	P24	P32	P40
C	P01	P09	P17	P25	P33	P41	P01	P09	P17	P25	P33	P41
D	P02	P10	P18	P26	P34	P42	P02	P10	P18	P26	P34	P42
E	P03	P11	P19	P27	P35	P43	P03	P11	P19	P27	P35	P43
F	P04	P12	P20	P28	P36	P44	P04	P12	P20	P28	P36	P44
G	P05	P13	P21	P29	P37	P45	P05	P13	P21	P29	P37	P45
H	P06	P14	P22	P30	P38	P46	P06	P14	P22	P30	P38	P46

- Adicionar 5,0 µL do DNA de amostra de pacientes previamente extraídas em cada poço, de acordo com o desenho da placa. Cada amostra deve ser testada em duplicata (uma réplica para cada alvo).
- Adicionar 5,0 µL do Controle Positivo (CP) nos poços correspondentes, conforme desenho esquemático.
- Adicionar 5,0 µL do Controle Negativo (CN) nos poços correspondentes, conforme desenho esquemático.

13.1.2 Programação do equipamento de PCR em tempo real

- Ligar o equipamento 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems) e seu computador.
- Abrir o programa (7500 software) e fazer o login utilizando as credenciais apropriadas.
- Inserir a placa no equipamento com as posições dos poços dispostas como no desenho esquemático apresentado anteriormente.
- Na aba **Define Targets and Samples**, seção **Define Targets**, adicionar 02 alvos clicando no botão **Add New Target**. Incluir nessa seção os dados conforme a tabela a seguir:

Target Name	Reporter	Quencher	Colour
Falciparum	FAM	NFQ-MGB	Blue
Vivax	FAM	NFQ-MGB	Green
CI	VIC	NFQ-MGB	Red

e. Na seção **Define Samples**, adicionar os campos para cada amostra e controles, clicando no botão **Add New Sample**. Identificar os campos correspondente de acordo com a posição na placa.

f. Na aba **Assign Targets and Samples**, em **View Plate Layout**, selecionar todos os poços na figura de representação da placa e atribuir a amostra que correspondem àquele poço na seção **Assign sample(s) to the selected wells**;

g. Selecionar **ROX** em **Select the dye to use as the passive reference**.

h. No submenu **Run Method**, aba **Graphical View**, alterar o volume de reação para **25 µL** em **Reaction Volume Per Well**;

i. Alterar o número de ciclos para **45** em **Number of Cycles**. No gráfico, alterar a temperatura e o tempo de cada estágio, para os seguintes valores:

Etapas	Temperatura (°C)	Tempo
Holding Stage	95	10:00
Cycling Stage	95	00:15
	60*	01:00

*Captura de fluorescência (Data Collection On).

j. No menu **Run**, clicar em **START RUN**. Uma janela será aberta e o usuário deverá digitar o nome do arquivo da corrida que será salvo em formato **“.eds”**.

13.1.3 Análise dos resultados

No menu **Analysis**, selecionar **Analysis Setting**. Uma janela de configurações de análise abrirá. Nessa janela, na aba **Ct settings**, desafixar os itens **Use Default Settings**, **Automatic Threshold** e **Automatic Baseline** para cada alvo e inserir os valores conforme tabela a seguir:

Target	Threshold	Baseline Start	Baseline End
Falciparum	0,5	5	15
Vivax	0,4	5	15
CI	0,15	5	15

Clicar em **Apply Analysis Settings** e, em seguida, **Reanalyse**.



13.1.4 Interpretação dos resultados

Para que os resultados obtidos sejam válidos, os seguintes critérios devem ser obtidos na análise dos resultados:

Controle Negativo (CN): Não deve apresentar amplificação (ultrapassar o threshold) para nenhum dos alvos.

Controles Positivos (CP): Deve apresentar amplificação para os dois alvos: Ct entre 21 – 27.

Amostras: Os seguintes valores de *Cycle threshold* (Ct) podem ser usados para a determinação qualitativa dos resultados:

RESULTADO	Ct
POSITIVO	Alvo " <i>P. falciparum</i> " ou " <i>P. vivax</i> ": presença de amplificação Alvo "CI": entre 16 e 32 (reação de <i>P. falciparum</i>) Alvo "CI": 18 e 32 (reação de <i>P. vivax</i>)
INDETERMINADO	Alvo "CI": Ct > 32
NEGATIVO	Alvo " <i>P. falciparum</i> " ou " <i>P. vivax</i> ": ausência de amplificação Alvo "CI": entre 16 e 32 (reação de <i>P. falciparum</i>) Alvo "CI": 18 e 32 (reação de <i>P. vivax</i>)

13.2. Em equipamentos ROTOR-GENE Q

13.2.1. Preparo da reação

- Identificar dois tubos de 1,5 ou 2,0 mL para o preparo das reações.
- No caso de utilização do kit em sua totalidade é necessário preparar um volume suficiente para 50 reações para cada alvo (*P. falciparum* e *P. vivax*). Adicionar aos tubos, devidamente identificados, os volumes conforme tabela abaixo:

REAGENTE	50 reações VOLUME (µL)	1 reação VOLUME (µL)
Mistura de PCR	417	8,34
OligoMix FAL OU OligoMix VIVAX	50	1
Água RNase Free	533	10,66
TOTAL	1.024	20

IMPORTANTE. Este kit é composto por dois Oligomix, específicos para detectar cada um dos *Plasmodium* alvo. O kit é composto pelo Oligomix *Falciparum* e Oligomix *P. Vivax*. Sendo assim, é necessário preparar um tubo de mistura de reação para cada um dos alvos, conforme tabela acima.

- Misturar os reagentes por inversão. Após o preparo das misturas de reação centrifugar os tubos e distribuir 20,0 µL do mix de reação em cada tubo do Rotor-Gene Q (0,2 mL para o rotor vermelho ou 0,1 µL para o azul). Sugere-se que a metade da capacidade do rotor seja destinada à reação de *P. falciparum* e metade à reação de *P. vivax*;
- Adicionar 5,0 µL do Controle Positivo (CP) nos tubos correspondentes.
- Adicionar 5,0 µL do Controle Negativo (CN) nos tubos correspondentes.
- Adicionar 5,0 µL do DNA de amostra de pacientes previamente extraídas em cada tubo, posicionar no rotor e registrar a posição utilizada para cada amostra e para cada alvo. Cada amostra e cada controle deve ser testada em uma única replicata para cada alvo;
- Posicionar o anel de travamento no rotor e encaixar o rotor no Rotor-Gene Q.

13.2.2 Programação do equipamento de PCR em tempo real

- Ligar o equipamento *Rotor-Gene Q* (Qiagen) e seu computador.
- Abrir o programa de operação do Rotor-Gene.
- Na aba 2. *Confirm Profile*, selecionar *Cycling*. Selecionar a fase de extensão e modificar o tempo para 60 seconds. Ajustar o número de ciclos da reação para 45, certificar-se de que os canais *Green* e *Yellow* e *Orange* estão ativados e clicar em *Start Run*.
- Enquanto a corrida ocorre, é possível registrar as amostras no software. Preencher os campos de forma a identificar o alvo e a amostra correspondentes à cada posição do rotor. Isto facilita a análise posterior dos dados.

13.2.3 Análise dos resultados

- Uma vez concluída a corrida, selecionar o canal *Green* (*Cycling A. Green*) na barra *Channels*.
- Na janela seguinte, clicar em *Options > Normalise to Cycling A. Orange* para normalizar a fluorescência pela referência passiva. Fechar a janela *Raw Channel*.

- Repetir as etapas a. e b, agora para o canal *Yellow*.
- Clicar em *Analysis*. Analisar os canais normalizados (*Cycling A.Green/Cycling A.Orange* e *Cycling A.Yellow/Cycling A.Orange*), dando um duplo clique em cada.
- Cada alvo normalizado deve aparecer em um conjunto de janelas posicionado lado a lado. Nas janelas que apresentam as curvas de amplificação, selecionar a opção *Slope Correct*. Em seguida clicar em *Ignore First* e, na caixa a seguir, digitar 2 e clicar em OK.
- Para cada alvo, ajustar o *threshold* de acordo com a tabela abaixo:

Target	Threshold	Baseline Start	Baseline End
Falciparum	0,07	AUTO	AUTO
Vivax	0,09	AUTO	AUTO
CI	0,07	AUTO	AUTO

13.2.4 Interpretação dos resultados

Para que os resultados obtidos sejam válidos, os seguintes critérios devem ser obtidos na análise dos resultados:

Controle Negativo (CN): Não deve apresentar amplificação (ultrapassar o threshold) nos canais *Green* e *Yellow* (sem amplificação para nenhum dos alvos).

Controles Positivos (CP): Deve apresentar amplificação no canal *Green* com Ct entre 18 – 26 e amplificação no canal *Yellow* com Ct entre 20 – 23 (amplificação para os dois alvos).

Amostras: Os seguintes valores de *Cycle threshold* (Ct) podem ser usados para a determinação qualitativa dos resultados:

RESULTADO	Ct
POSITIVO	Alvo " <i>P. falciparum</i> " ou " <i>P. vivax</i> ": presença de amplificação Alvo "CI": Ct entre 16 e 32
INDETERMINADO	Alvo "CI": Ct > 32
NEGATIVO	Alvo " <i>P. falciparum</i> " ou " <i>P. vivax</i> ": ausência de amplificação Alvo "CI": Ct entre 16 e 32



14 SUBSTÂNCIAS INTERFERENTES OU LIMITAÇÕES DO PRODUTO

- Excesso de ruído ou sinal de fluorescência muito baixo nos gráficos de amplificação indicam que pode ter ocorrido degradação do DNA da amostra. A ausência de amplificação do controle interno da reação pode indicar um problema no processo de extração, recomenda-se repetir o processo e testá-la novamente.
- A falta de sinal de amplificação também pode ser causada por ausência de amostra no poço, recomenda-se repetir o teste certificando-se que a amostra foi adicionada.
- Excesso de DNA na reação pode inibir a amplificação do Controle Interno, recomenda-se fazer uma diluição da amostra (1:10 e/ou 1:100) e realizar uma nova amplificação.

15 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

O Kit IBMP Biomol Malária apresentou sensibilidade (relativo à microscopia) de 100% para as duas plataformas. A especificidade foi de 99% para os equipamentos da série 7500 Applied Biosystems e de 100% para o Rotor-Gene Q. Os limites de detecção (LoD_{95}) para o Kit IBMP Biomol Malária, calculado com o controle sintético, foram os seguintes:

- Para o 7500 Real-Time PCR System: 120 cópias do alvo/ μ L para *P. falciparum* o que corresponde a 0,012 parasitos/ μ L*; e 111 cópias do alvo/ μ L para *P. vivax*; o que corresponde a 0,011 parasitos/ μ L*.
- Para o Rotor-Gene Q: foi definido 343 cópias do alvo/ μ L para *P. vivax*; o que corresponde a 0,034 parasitos/ μ L*. Não tendo sido definido para *P. falciparum*, uma vez que todas as concentrações avaliadas foram sempre 100% positivas (Dessa forma, considerou-se menor ou igual a 0,01 parasitos/ μ L ou menor ou igual a 100 cópias/ μ L).

*Relação teórica calculada, inferida a partir do número médio de cópias do alvo que é cerca de 10.000 cópias/genoma do parasito.

Não foi observada reação cruzada com nenhuma das 59 espécies de microrganismos testados com o Kit IBMP Biomol Malária

16 RISCOS RESIDUAIS IDENTIFICADOS

Não aplicável.

17 DESCARTE DE RESÍDUOS

Os componentes do kit devem ser descartados conforme legislação vigente e normas da instituição.

18 TERMOS E CONDIÇÕES DE GARANTIA DA QUALIDADE DO PRODUTO

- O produto deve ser utilizado dentro do prazo de validade determinado pelo fabricante.
- Para um melhor desempenho do teste é necessária a utilização de instrumentos de medição e detecção devidamente calibrados e/ou qualificados, quando aplicável.
- O Kit IBMP Biomol Malária foi validado para amostras coletadas em tubos de coleta de sangue contendo EDTA e processadas para extração de DNA com o Kit QIAamp DNA Blood Mini (QIAGEN).
- O fabricante não se responsabiliza pelos resultados obtidos, caso o usuário não siga corretamente as instruções de uso e condições de armazenamento dos insumos.