



## 1. NOME COMERCIAL

Kit IBMP Biomol Chagas.

## 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 16:30 h (exceto feriados)

sac@ibmp.org.br | www.ibmp.org.br

## 3. APRESENTAÇÃO

O Kit IBMP Biomol Chagas contém o módulo de amplificação (componentes necessários para a realização da PCR em tempo real, incluindo os controles positivo e negativo), suficientes para 44 amostras em duplicata e os controles de reação necessários para uma placa de 96 poços.

## 4. FINALIDADE

Este produto destina-se a detecção qualitativa do material genético de *Trypanosoma cruzi* em DNA total extraído de amostras de sangue obtidas em serviços de diagnóstico de rotina ou vigilância epidemiológica, com o objetivo de auxiliar e/ou confirmar o diagnóstico clínico da doença de Chagas.

## PRODUTO PARA 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, em laboratórios com infraestrutura adequada para realização de testes moleculares.

## 6. CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO OU MANUSEIO

O módulo de amplificação do Kit IBMP Biomol Chagas deve ser transportado em gelo seco e armazenado entre -30°C e -15°C.

## 7. PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO

O Kit IBMP Biomol Chagas utiliza a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real, que permite a detecção de marcadores específicos do material genético do protozoário *Trypanosoma cruzi*. Esta detecção se dá pelo aumento, a cada ciclo de reação, do sinal de fluorescência emitido por uma sonda molecular específica quando o DNA-alvo está presente na amostra. O sucesso da reação é monitorado através de um segundo sinal de fluorescência, emitido por outra sonda na mesma reação, que aumenta na presença de um Controle Interno de Amplificação (IAC). Este alvo sintético é adicionado à amostra antes da extração de DNA, e a falha na sua detecção indica problemas no procedimento de extração de DNA das amostras e/ou na reação de amplificação, invalidando o resultado. O teste é qualitativo (atesta presença ou ausência do alvo na amostra), não sendo validado para quantificação.

## 8. TIPO DE AMOSTRAS OU MATRIZES APLICÁVEIS

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

O teste pode ser aplicado em DNA total extraído de sangue ou mistura de sangue total com uma solução de guanidina-EDTA, na proporção de 1:1, conforme instruções descritas adiante.

## 9. DESCRIÇÃO DO PRODUTO

Cada Kit IBMP Biomol Chagas contém:

- 01 tubo de Mistura de PCR contendo 1100 µL;
- 01 tubo de Oligomix contendo 110 µL;
- 01 tubo de Água RNase Free contendo 1000 µL;
- 01 tubo de controle interno (IAC) contendo 460 µL;
- 01 tubo de controle positivo (CP) contendo 90 µL;
- 01 tubo de controle negativo (CN) contendo 60 µL.

### 9.1. Materiais necessários não fornecidos com o produto

Para a realização dos testes, os seguintes materiais devem ser providenciados pelo usuário:

- Consumíveis para a coleta de sangue do paciente (agulha, tubo à vácuo com EDTA, seringa etc.);
- Solução de Guanidina-EDTA (cloreto de guanidina 6 M contendo EDTA 0,2 M e com pH 8,0) - quando aplicável;
- Kit DNA High Pure PCR Template Preparation (Roche Life Sciences);
- Centrifuga compatível com os requisitos do kit de extração;
- Cabine de segurança biológica;
- Agitador tipo vortex;
- Instrumento 7500 Real-Time PCR (Standard/Fast);
- Consumíveis para PCR em tempo real (placas de 96 poços compatíveis com o instrumento, adesivo selantes ópticos);
- Etanol Absoluto (Molecular Biology Grade);
- Isopropanol;
- Pipetas sorológicas;
- Pipetadores;
- Ponteiras;
- Tubos/microtubos de polipropileno (1,5 ou 2 mL e 50 mL);
- Equipamentos de proteção individual (luvas, máscara, toucas, jalecos etc.).

## 10. ESTABILIDADE DO PRODUTO EM USO

O produto pode ser utilizado até o quinto ciclo de descongelamento dos componentes. Eventuais sobras após este ciclo devem ser descartadas.

## 11. PROCEDIMENTOS A SEREM REALIZADOS ANTES DA UTILIZAÇÃO DO PRODUTO

Os recipientes de coleta de sangue e os tubos nos quais as amostras serão misturadas com a guanidina-EDTA devem ser devidamente identificados. As superfícies devem ser sanitizadas com etanol 70% ou solução comercial validada no laboratório.

## 12. RECOMENDAÇÕES PARA PROCEDIMENTOS DE CONTROLE DE QUALIDADE

- Cuidados com os controles positivos e com o controle interno: deve-se manusear os controles positivos e o IAC com cuidado e atenção para evitar possíveis contaminações nos poços de amostras e/ou no ambiente, o que pode gerar resultados falso-positivos;
- Cuidados de contaminação: para o bom funcionamento do Kit IBMP Biomol Chagas, o manuseio dos reagentes deve ser feito dentro de cabines de manipulação de reações de PCR, com as superfícies devidamente descontaminadas. O operador deve estar devidamente paramentado (máscara, touca, jaleco, luvas sem pó e protetores de barba). Devem ser utilizadas somente ponteiras com filtro;
- Para evitar a contaminação recomenda-se o uso de áreas segregadas para preparo da reação de PCR, pipetagem do DNA e corrida no equipamento;



- Os equipamentos utilizados devem estar devidamente calibrados.

### 13. PROCEDIMENTOS PARA O USO DO PRODUTO

#### 13.1 Processamento das Amostras

O Kit IBMP Biomol Chagas é compatível com o processamento de amostras de sangue total (quando o uso é imediato) ou sangue total misturado com a solução de guanidina-EDTA em um frasco adequado (razão amostra/guanidina 1:1) (GEB). A mistura (chamada de GEB) deve ser aquecida a 95°C por 15 minutos e pode, então, ser armazenada a 4°C por tempo indeterminado. Para a utilização com o Kit IBMP Biomol Chagas, 5 µL do Controle Interno de amplificação (IAC) devem ser adicionados à amostra antes da extração. Esta alíquota deve ser utilizada para a extração de DNA com o kit DNA *High Pure PCR Template Preparation (Roche Life Sciences)*, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante, exceto pelo uso de 100 µL de volume de eluição, ao invés de 200 µL.

Ao usar a mistura GEB, a Organização Pan-Americana da Saúde recomenda usar o volume de 300 µL de GEB para extração, e, na etapa em que se adiciona *Binding Buffer*, eluir o DNA com 100 µL do tampão recomendado, ao invés dos 200 µL do protocolo original.

#### 13.2 Diluição do Controle Positivo

O Controle Positivo é fornecido na concentração de 1.000 cópias/µL e deverá ser diluído para as concentrações, 100 e 10 cópias/µL em água (Água RNase Free fornecida com o kit), no momento do uso, seguindo as orientações a seguir:

- Identificar dois microtubos de 1,5 ou 2,0 mL como “100 cópias/µL” e “10 cópias/µL”;
- Adicionar 45 µL da água fornecida nos tubos “100 cópias/µL” e “10 cópias/µL”;
- Homogeneizar o tubo de Controle Positivo fornecido, agitar em vortex por aproximadamente 15 segundos e centrifugar por cerca de 5 segundos;
- Utilizar uma micropipeta, transferir 5 µL do Controle Positivo fornecido (item c), para o tubo identificado como “100 cópias/µL”;
- Agitar o tubo “100 cópias/µL” em vortex por aproximadamente 15 segundos e centrifugar por cerca de 5 segundos;
- Transferir 5 µL do tubo “100 cópias/µL” para o tubo identificado como “10 cópias/µL”. Agitar o tubo em vortex por aproximadamente 15 segundos e centrifugar por cerca de 5 segundos. As diluições deverão ser mantidas em gelo até o momento de utilização.

Nota 1: O controle positivo para o IAC deve ser feito diluindo-se o IAC fornecido na proporção 1:20 em água RNase free, usando 19 µL de Água RNase Free e 1 µL de IAC 20x. Esta diluição deve ser utilizada como um controle positivo para a reação do IAC (poços A3 e B3 no exemplo da figura no item 13.4 - a). Para controle da extração, utilizar o conteúdo do tubo IAC na concentração em que é fornecida – 20x).

Nota 2: Os tubos de diluição do CP e do IAC não devem ser congelados ou reutilizados.

#### 13.3. Preparo da mistura de reação

O Kit IBMP Biomol Chagas inclui reagentes suficientes para 96 reações de 20 µL, dos quais 5 µL correspondem à amostra a ser testada (ou controle). A mistura de reação deve ser preparada de acordo com o número de amostras a se testar (mais os 4 controles positivos, 2 controles negativos e 2 controles de IAC fornecidos no kit), todos em duplicata, seguindo o procedimento abaixo:

- Retirar os componentes do módulo de amplificação do Kit IBMP Biomol Chagas do freezer e deixar descongelando em temperatura ambiente;
- Agitar cada componente em vortex com potência média por 3s e centrifugar brevemente para que todo o conteúdo esteja no fundo dos tubos;
- Separar um tubo de 2,0 mL e identificar claramente;

- Adicionar ao tubo os componentes listados na tabela a seguir, nesta ordem, com os ajustes necessários para o planejamento definido pelo usuário;

Componente da mistura de reação	Volume p/ 1 reação	Volume p/ 96 reações com excesso de 5%
Água RNase Free	4 µL	403,2 µL
Oligomix Chagas 20X	1 µL	100,8 µL
Mix Biomol Chagas 2X	10 µL	1008 µL

- Agitar em vortex por 3s em velocidade média e centrifugar brevemente para que todo o conteúdo esteja no fundo do tubo;
- Distribuir 15 µL da mistura de reação por poço de uma placa de PCR de 96 poços;
- Se aplicável, selar a placa para transferi-la para a área de manipulação de amostras.

#### 13.4. Aplicação das amostras de DNA e dos controles:

Um Kit IBMP Biomol Chagas é suficiente para testar 44 amostras extraídas, bem como os 4 controles de reação fornecidos.

- Aplicar 5 µL de cada controle (CP 1.000 cópias/µL; CP 10 cópias/µL; IAC 1:20 (ver item 13.2, nota 1) e CN, em duplicatas) nos poços correspondentes da placa de PCR (com a mistura de reação). Uma sugestão de mapa da placa é mostrada na figura abaixo;

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CP 1.000 cópias/µL	CP 10 cópias/µL	IAC	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6	Amostra 7	Amostra 8	Amostra 9
B	CP 1.000 cópias/µL	CP 10 cópias/µL	IAC	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6	Amostra 7	Amostra 8	Amostra 9
C	Amostra 10	Amostra 11	Amostra 12	Amostra 13	Amostra 14	Amostra 15	Amostra 16	Amostra 17	Amostra 18	Amostra 19	Amostra 20	Amostra 21
D	Amostra 10	Amostra 11	Amostra 12	Amostra 13	Amostra 14	Amostra 15	Amostra 16	Amostra 17	Amostra 18	Amostra 19	Amostra 20	Amostra 21
E	Amostra 22	Amostra 23	Amostra 24	Amostra 25	Amostra 26	Amostra 27	Amostra 28	Amostra 29	Amostra 30	Amostra 31	Amostra 32	Amostra 33
F	Amostra 22	Amostra 23	Amostra 24	Amostra 25	Amostra 26	Amostra 27	Amostra 28	Amostra 29	Amostra 30	Amostra 31	Amostra 32	Amostra 33
G	Amostra 34	Amostra 35	Amostra 36	Amostra 37	Amostra 38	Amostra 39	Amostra 40	Amostra 41	Amostra 42	Amostra 43	Amostra 44	CN
H	Amostra 34	Amostra 35	Amostra 36	Amostra 37	Amostra 38	Amostra 39	Amostra 40	Amostra 41	Amostra 42	Amostra 43	Amostra 44	CN

- Aplicar 5 µL de cada amostra de DNA extraído nos poços correspondentes;
- Selar a placa com selante adesivo óptico para PCR em tempo real, tomando cuidado para que as bordas dos poços estejam devidamente vedadas;
- Centrifugar a placa por 30s a 1000 x g e manter ao abrigo da luz até o momento da PCR em tempo real.

#### 13.5. Configuração do 7500 Real-Time PCR para a corrida:

- Ligar o equipamento 7500 Real-Time PCR, *standard ou Fast (Applied Biosystems®)*, EUA) e seu computador e inserir a placa no instrumento, orientada como indicado na bandeja;
- Abriu 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;
- No programa, selecionar *New Experiment*.



- e. No menu *Setup* (do lado esquerdo da tela), submenu *Experiment Properties*, inserir o nome do ensaio utilizado no campo *Experiment Name*;
- f. No campo “*Which instrument are you using to run the experiment?*”, selecionar 7500 (96 Wells);
- g. No campo “*What type of experiment do you want to set up?*”, selecionar *Quantitation – Standard Curve*;
- h. No campo “*Which reagents do you want to use to detect the target sequence?*”, selecionar *Taqman® Reagents*;
- i. Por fim, no campo “*Which ramp speed do you want to use in the instrument run?*”, selecionar *Standard (~2 hours to complete a run)*.
- j. Ainda no menu *Setup*, selecionar o submenu *Plate Setup*;
- k. Clicar na aba *Define Targets and Samples*;
- l. Na seção *Define Targets*, adicionar dois alvos (clicando no botão *Add New Target*). Incluir os alvos *T. cruzi* e *IAC* de acordo com a tabela a seguir:

Target Name	Reporter	Quencher
<i>T. cruzi</i>	FAM	NFQ-MGB
<b>IAC</b>	HEX (VIC)	NFQ-MGB

- m. Na seção *Define Samples*, clicar no botão *Add New Sample* até que o número de amostras chegue na quantidade desejada (máximo de 44 amostras e 4 controles – 48 amostras). No menu as amostras e controles de forma a facilitar a análise;
- n. Clicar na aba *Assign Targets and Samples*;
- o. Selecionar todos os poços da seção *View Plate Layout*, marcar os dois alvos (*T. cruzi* e *IAC*) em todos os poços;
- p. Selecionar os poços com amostras e selecionar **U** para ambos os alvos;
- q. Selecionar os poços com controles positivos e selecionar **S** para ambos os alvos;
- r. Selecionar os poços com controle negativo e selecionar **N** para ambos os alvos;
- s. Para cada amostra ou controle, selecionar os poços correspondentes e marcar o nome correspondente na seção *Assign sample(s) to the selected wells*;
- t. Na seção *Select the dye to use as the passive reference*, selecione *ROX*;
- u. No lado esquerdo da tela, selecionar o menu *Run Method*. Na aba *Graphical View*, alterar o valor do campo *Reaction Volume Per Well* para 20 µL;
- v. No campo *Number of Cycles* inserir o valor 45;
- x. No diagrama de temperaturas, inserir os estágios, temperaturas e tempos de acordo com a tabela abaixo:

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo
<i>Holding Stage</i>	95	10:00
<i>Cycling Stage</i>	95	00:15
	60*	01:00

\*Certificar-se de que a captura de fluorescência ocorra neste estágio.

- a. No lado esquerdo, selecionar o menu *Run*. No topo da tela, clicar no botão verde *Start Run*. Se a corrida ainda não tiver sido salva, uma caixa de diálogo será aberta para salvar o arquivo .eds resultante da corrida. Uma vez salvo, a corrida terá início e a reação seguirá o programa determinado;

- b. Ao término do programa, remover a placa do equipamento e descartar em local apropriado. O produto de PCR gerado nos poços pode contaminar reações futuras e, portanto, deve-se evitar remover o adesivo selante da placa após a reação;
- c. Proceder para a análise dos resultados.

## 14. ANÁLISE DOS RESULTADOS

### 14.1. Parâmetros de análise dos resultados

Terminada a corrida o painel de análise do experimento deve se abrir automaticamente. Caso isto não ocorra, basta clicar no menu *Analysis*, à esquerda da tela. Seguir as instruções abaixo para a análise dos dados:

- a. Clicar no botão *Analysis Settings*, no canto superior direito do painel de análise;
- b. Inserir os valores de *Threshold*, *Baseline Start* e *Baseline End* como indicados na tabela abaixo:

Target	Threshold	Baseline Start	Baseline End
<i>T. cruzi</i>	0,2	AUTO	AUTO
<b>IAC</b>	0,02	AUTO	AUTO

- c. Clicar no botão *Apply Analysis Settings* para aplicar os ajustes e, em seguida, clicar em *Reanalyze*.

### 14.2. Interpretação dos resultados

Após os ajustes dos parâmetros de análise:

- a. Os Cts obtidos para os controles devem ser inspecionados. Para que a corrida seja válida, os Cts dos controles positivos devem estar dentro das seguintes faixas:

Controle	Ct mínimo aceitável	Ct máximo aceitável	Obs.
CP (1000 cópias/µL)	Não restrito	30	Não deve haver amplificação no canal VIC
CP (10 cópias/µL)	Não restrito	40	Não deve haver amplificação no canal VIC
<b>IAC</b>	17,8	24,3	Não deve haver amplificação no canal FAM

- b. O Controle Negativo não deve apresentar amplificação em nenhum dos dois canais. Caso haja amplificação, resultados positivos são inválidos nesta corrida;
- c. Para cada amostra, avaliar a amplificação do alvo *IAC* (canal VIC). Para que a reação seja válida, este alvo deve apresentar amplificação dentro da faixa apresentada na tabela acima.
- d. A amostra será considerada positiva para DNA de *Trypanosoma cruzi* se apresentar amplificação do alvo *T. cruzi* (canal FAM) com Ct entre 17 e 45, com amplificação concomitante do alvo *IAC* (canal VIC), inclusive para os casos em que apenas 1 reação dentro das replicatas apresente amplificação;
- e. A amostra será considerada negativa para DNA de *T. cruzi* caso não haja amplificação no canal FAM, mas haja amplificação do alvo *IAC* (canal VIC);
- f. Caso ocorra amplificação do alvo *T. cruzi* ou *IAC* com Ct abaixo do limite inferior, esta amostra deverá ser diluída e novamente testada;
- g. Amostras extraídas simultaneamente devem apresentar Ct para o *IAC* com desvio de  $\pm 1$  dentro do conjunto. Caso alguma amostra se apresente fora dessa especificação, deve ser reprocessada.



#### 15. SUBSTÂNCIAS INTERFERENTES OU LIMITAÇÕES DO PRODUTO

O Kit IBMP Biomol Chagas apresentou reação positiva na presença de DNA extraído de células de *Toxoplasma gondii* cultivadas *in vitro*, porém com resultados não lineares ao longo de diluições seriadas do mesmo DNA.

#### 16. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

O teste foi capaz de detectar 0,096 parasita-equivalentes/reação em pelo menos 95% das repetições nesta concentração. A sensibilidade e a especificidade diagnósticas foram de 100% quando o teste foi comparado com método molecular analiticamente compatível. Estes dados foram obtidos de uma coorte específica e serão revisados à medida em que dados de utilização em centros de referência sejam coletados e analisados.

#### 17. RISCOS RESIDUAIS IDENTIFICADOS

Nenhum risco residual identificado.

#### 18. DESCARTE DE RESÍDUOS

Os resíduos das extrações de amostras devem ser considerados infectantes e descartados como tais. Os reagentes fornecidos devem ser descartados como substâncias tóxicas, de acordo com a legislação vigente e regulamentos locais aplicáveis.

#### 19. TERMOS E CONDIÇÕES DE GARANTIA DA QUALIDADE DO PRODUTO

- O produto deve ser utilizado dentro do prazo de validade determinado pelo fabricante. O fabricante não se responsabiliza pelos resultados obtidos caso o usuário utilize o produto fora do prazo de validade estabelecido.
- O Kit IBMP Biomol Chagas foi validado utilizando o kit de extração de *DNA High Pure PCR Template Preparation (Roche Life Sciences)* de acordo com as modificações propostas pela Organização Pan-Americana de Saúde. O fabricante não se responsabiliza pelos resultados obtidos caso o usuário utilize kit de extração diferente do que foi validado.
- O fabricante não se responsabiliza pelos resultados obtidos caso o usuário não siga corretamente as instruções de uso ou as condições de armazenamento dos insumos;
- Para um melhor desempenho do teste é necessária a utilização de instrumentos de medição e detecção devidamente calibrados e/ou qualificados, quando aplicável.