



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 contendo um módulo de amplificação suficiente para 96 determinações (para cada alvo: 46 amostras mais controles).

4. FINALIDADE

Este produto se destina à detecção qualitativa (presença/ausência) do material genético dos protozoários *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax*, extraído de amostras de sangue total de pacientes com suspeita de Malária. O resultado obtido pode ser utilizado, em conjunto com os dados clínicos e epidemiológicos do paciente para auxiliar o diagnóstico de Malária.

USO EM DIAGNÓSTICO IN VITRO.

5. USUÁRIO PRETENDIDO

O teste deve ser realizado por profissionais da área de saúde com conhecimento em biologia molecular, especificamente em testes diagnósticos baseados em PCR em tempo real.

6. CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO OU MANUSEIO

O armazenamento do produto deve ser feito entre -30° e -15°C. A temperatura indicada para manipulação do produto é entre 15°C e 30°C.

A manipulação do conteúdo do módulo de amplificação deve ser feita com luvas descartáveis sem pó.

7. PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO

O Kit IBMP Biomol Malária utiliza a técnica reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR).

A reação de qPCR permite a detecção de sequências nucleotídicas específicas no genoma dos patógenos em DNA extraído de amostras de sangue total de pacientes com

suspeita de malária, a partir da avaliação da intensidade de fluorescência capturada ao final de cada ciclo da PCR.

O Kit IBMP Biomol Malária permite a identificação dos protozoários *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax* além de um Controle Interno (CI) endógeno. A detecção da presença de ácidos nucleicos dos patógenos e do Controle Interno é feita através da utilização de sondas de hidrólise específicas para cada alvo molecular (oligonucleotídeos marcados com fluorescência).

O teste é realizado através do preparo de duas misturas de reação de para qPCR. Na reação 1 são pesquisados o alvo *P. falciparum* e o Controle Interno. Na reação 2 são pesquisados o alvo *P. vivax* e o Controle Interno.

A geração de uma curva de amplificação com formato típico para os alvos moleculares pesquisados demonstra uma reação com resultado detectável para a amostra. Amostras com resultados não detectáveis para os alvos moleculares devem apresentar amplificação apenas do CI. A amplificação do CI indica o funcionamento adequado da reação (reagentes e operador), além de refletir a qualidade do DNA extraído. Caso o CI não seja detectado, a amostra deve ter seu material genético extraído novamente. Entretanto, é importante ressaltar que amostras apresentando amplificação para os alvos moleculares dos patógenos devem ter seu resultado considerado válido independente da amplificação do CI.

O kit possui um Controle Positivo (CP) sintético biosseguro (que não oferece risco biológico aos operadores ou ao ambiente), que deve apresentar resultado detectável para todos os alvos moleculares pesquisados, incluindo o CI. O kit também possui um Controle Negativo (CN) que avalia as condições ambientais e experimentais e que deve apresentar resultado não detectável para todos os alvos pesquisados.

Esse kit foi desenvolvido para a realização de análises de perfil qualitativo, ou seja, avalia apenas a presença ou ausência do alvo molecular. O produto não é validado para análise quantitativa.

Produto validado para uso com os seguintes termocicladores: 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems) e Rotor-Gene Q (Qiagen).

8. TIPO DE AMOSTRAS OU MATRIZES APLICÁVEIS

Amostras de DNA extraído de sangue total coletado em tubo apropriado contendo anticoagulante EDTA.

8.1. Condições de coleta, manuseio, preparo e 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.

8.2. Extração de DNA

Deve-se realizar a extração de DNA das amostras primárias utilizando metodologia adequada para a matriz biológica preconizada para o teste, e que permita obter DNA cuja qualidade e integridade resulte no atendimento aos critérios de análise estabelecidos no item 14.2 desta Instrução de Uso.

8.3. Cuidados no armazenamento e manuseio do DNA extraído

- DNA extraído deve ser armazenado em freezer à -20°C;
- Usar sempre luvas descartáveis sem pó durante o manuseio do DNA para prevenir contaminação por nucleases. Mãos e partículas de poeira podem carrear bactérias e fungos, que são as fontes mais comuns desse tipo de contaminante;
- Manter os tubos contendo DNA fechados durante os procedimentos. Abrir um tubo de cada vez para realizar a adição à mistura de reação, para evitar que haja contaminação cruzada das amostras.

9. DESCRIÇÃO DO PRODUTO

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.

9.1. Materiais necessários não fornecidos com o produto

- Adesivo não-óptico;
- Adesivo óptico;
- Agitador tipo vórtex;
- Banho de gelo ou estante refrigerada para microtubos de 1,5 ou 2,0mL;
- Cabine tipo PCR *Workstation*;
- Caneta para marcação permanente em plástico;
- Centrifuga para microtubos de 1,5 a 2,0mL;
- Centrifuga para placas de 96 posições;
- Consumíveis e materiais para coleta e armazenamento da amostra primária;
- Equipamento de PCR em tempo real;



- Equipamentos de proteção individual (jaleco, máscara descartável, touca, óculos de segurança, luvas sem pó descartáveis, protetores de barba);
- Kit de extração de DNA;
- Micropipetas de precisão (0,5-10 µL; 2,0-20 µL; 10-100 µL e 100-1000 µL);
- Microtubos de 1,5 ou 2,0 mL estéreis;
- Placa de PCR (96 poços) ou tubos 0,2 mL;
- Ponteiras esterilizadas livres de RNases e DNases, com filtro (0,5-10 µL; 2,0-20 µL; 10-100 µL e 100-1000 µL);
- Recipientes para descarte de resíduos;
- Suporte/estante para microtubos de 1,5 a 2,0mL.

10. ESTABILIDADE DO PRODUTO EM USO

Este é um produto de uso múltiplo.

O estudo de estabilidade demonstrou que o produto mantém sua qualidade por até cinco ciclos de descongelamento, após os quais eventuais sobras de reagentes devem ser descartadas.

Não é recomendado o congelamento/descongelamento da mistura de reação após o preparo.

11. PROCEDIMENTOS A SEREM REALIZADOS ANTES DA UTILIZAÇÃO DO PRODUTO

No momento do uso, os reagentes e amostras de DNA extraído devem ser descongelados, centrifugados brevemente e mantidos sob refrigeração utilizando banho de gelo ou estante refrigerada.

12. PROCEDIMENTOS DE CONTROLE DE QUALIDADE

- Utilizar equipamentos de proteção individual (EPI) tais como jaleco, máscara descartável, touca, luvas sem pó descartáveis, protetores de barba e óculos de segurança para manipulação de amostras e reagentes;
- Não comer, beber, fumar, aplicar cosméticos ou manusear lentes de contato nas áreas laboratoriais;
- Não utilizar componentes do teste que estejam vencidos.
- A utilização das micropipetas deve respeitar a faixa de operação do instrumento;
- Evitar abrir a placa de PCR após a reação de amplificação para reduzir riscos de contaminação do ambiente;
- Realizar a manipulação de reagentes e amostras de DNA no interior de cabines tipo PCR *Workstation*.

13. PROCEDIMENTOS PARA O USO DO PRODUTO

13.1. Preparo da mistura de reação

- Identificar o número de reações a serem realizadas, considerando a necessidade de inclusão de pelo menos um controle positivo e um controle negativo para cada um dos alvos (*P. falciparum* e *P. vivax*) em cada corrida;
- Elaborar mapa da placa de reação, identificando os poços a serem utilizados e a posição de cada amostra, do controle positivo e do controle negativo;
- Calcular conforme valores apresentados na Tabelas 1 e 2, os volumes necessários para a realização da corrida;
- Na área física apropriada, identificar dois microtubos de 1,5 ou 2,0 mL para o preparo da mistura de reação 1 e mistura de reação 2, de cada um dos alvos (*P. falciparum* e *P. vivax*, respectivamente);
- Adicionar aos microtubos, devidamente identificados os componentes e volumes listados nas Tabelas 1 e 2, ajustados ao número de reações a serem realizadas e para cada reação;

OBS: os volumes indicados não contemplam eventual perda durante o processo de pipetagem.

Tabela 1. Receita para o preparo da mistura de reação para o alvo *P. falciparum* do kit IBMP Biomol Malária.

REAGENTE	1 reação VOLUME (µL)
Mistura de PCR	8,34
OligoMix FAL	1
Água RNase Free	10,66
TOTAL	20

Tabela 2. Receita para o preparo da mistura de reação para o alvo *P. vivax* do kit IBMP Biomol Malária.

REAGENTE	1 reação VOLUME (µL)
Mistura de PCR	8,34
OligoMix VIVAX	1
Água RNase Free	10,66
TOTAL	20

- Homogeneizar gentilmente por vórtex suave, pipetagem ou tamborilando e centrifugar brevemente (*spin*);
- Distribuir 20,0 µL do mix de reação em cada poço de uma placa de PCR de 96 poços (ou microtubo, no caso do

equipamento Rotor-Gene), seguindo mapa de placa de reação, para cada reação;

- Selar a placa, se aplicável, com adesivo não-óptico para transferi-la até área de manipulação de amostras de ácidos nucleicos.

13.2. Adição de amostras e controles

- Em área física apropriada e seguindo o mapa da placa de reação, adicionar 5,0 µL de cada amostra de DNA extraído nos poços correspondentes na placa de reação (ou microtubo, no caso do equipamento Rotor-Gene);
- Adicionar 5,0 µL do Controle Positivo (CP) nos poços correspondentes, na placa de reação;
- Adicionar 5,0 µL do Controle Negativo (CN) nos poços correspondentes, na placa de reação;
- Selar a placa de reação, se aplicável, com adesivo ótico;
- Centrifugar a placa brevemente (*spin*).

13.3. Configuração de detecção e termociclagem

- Configurar o software do equipamento conforme mapa da placa de reação estabelecido pelo usuário, identificando a posição de cada amostra, do controle positivo e do controle negativo;
 - Configurar as fluorescências para cada canal conforme Tabela 3;
- Tabela 3. Alvos e fluorescências/canais a serem configuradas para análise.

Nome do alvo (<i>Target</i>)	Reporter	Quencher
Falciparum	FAM	NFQ-MGB
Vivax	FAM	NFQ-MGB
CI	VIC	NFQ-MGB

- Configurar os parâmetros de termociclagem da reação conforme Tabela 4;

Tabela 4. Parâmetros de ciclagem para o kit IBMP Biomol Malária.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo	Número de ciclos
<i> Holding Stage </i>	95	10 minutos	01
<i> Cycling Stage </i>	95	15 segundos	45
	60*	60 segundos	

*Estágio de Captura de fluorescência.



- Selecionar a referência passiva como **ROX**, de acordo com as instruções de cada equipamento;
- Salvar arquivo e iniciar a corrida no equipamento.

14. ANÁLISE DOS RESULTADOS

14.1. Parâmetros de análise de resultados

Para a análise de resultados, devem ser adotados os parâmetros descritos na Tabela 5, de acordo com o equipamento utilizado.

Tabela 5. Parâmetros analíticos a serem utilizados para os diferentes termocicladores.

Equipamento	Alvo	Threshold	Baseline
7500 Real Time PCR	<i>P. falciparum</i>	0,5	5 – 15
	<i>P. vivax</i>	0,4	5 – 15
	CI	0,15	5 – 15
RotorGene	<i>P. falciparum</i>	0,07	AUTO
	<i>P. vivax</i>	0,09	AUTO
	CI	0,07	AUTO

14.2. Interpretação dos resultados

- Para que uma corrida seja considerada válida, o Controle Positivo (CP) deve apresentar amplificação para os dois alvos (*P. falciparum* ou *P. vivax* e Controle Interno), apresentando Ct entre 21 e 27 no equipamento 7500. No caso do equipamento RotorGene o CP deve apresentar amplificação no canal *Green* com Ct entre 18 – 26 e amplificação no canal *Yellow* com Ct entre 20 – 23;
- Para que uma corrida seja considerada válida, o Controle Negativo (CN) não deve apresentar amplificação para nenhum dos alvos;
- Para que uma amostra seja considerada negativa, não deve apresentar amplificação nos alvos *P. falciparum* e *P. vivax* e deve apresentar amplificação no Controle Interno com Ct ≤ 32;
- Para que uma amostra seja considerada positiva, deve apresentar amplificação com perfil típico para os alvos *P. falciparum* ou *P. vivax*, mesmo se não houver amplificação do Controle Interno.

Os critérios para interpretação de resultados estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6. Tabela para interpretação dos resultados do kit IBMP Biomol Malária.

Amostra			CP	CN	Resultado
<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	CI			
+	-	+/-	+	-	Detectável para <i>P. falciparum</i>
-	+	+/-	+	-	Detectável para <i>P. vivax</i>
-	-	+	+	-	Não Detectável para <i>P. falciparum</i> e <i>P. vivax</i>
-	-	-	+	-	Amostra inválida
+/-	+/-	+/-	+/-	+	Ensaio inválido
+/-	+/-	+/-	-	+/-	Ensaio inválido

15. SUBSTÂNCIAS INTERFERENTES OU LIMITAÇÕES DO PRODUTO

- O kit IBMP Biomol Malária não foi validado para a detecção de infecções mistas (fornecer resultado Detectável tanto para *P. falciparum* quanto para *P. vivax*). Em caso de suspeita de infecção mista, outras metodologias deverão ser empregadas para a confirmação diagnóstica;
- O desempenho deste ensaio depende da coleta, conservação e transporte adequados da amostra para o local do ensaio (consulte a seção TIPO DE AMOSTRAS E MATRIZES APLICÁVEIS nesta Instrução de Uso);
- Amostras de sangue total coletadas com EDTA podem ser utilizadas com o kit IBMP Biomol Malária. O uso de outras matrizes biológicas não foi validado com o kit IBMP Biomol Malária;
- Os resultados obtidos com o kit IBMP Biomol Malária devem ser interpretados em conjunto com informações clínicas, epidemiológicas e laboratoriais do paciente. Um resultado “Não detectável” não exclui a possibilidade de infecção por *P. falciparum* ou *P. vivax*.

16. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

16.1. Sensibilidade Analítica

Os limites de detecção com confiança de 95% (LoD₉₅) para o Kit IBMP Biomol Malária, foram calculados para os dois alvos buscando mimetizar amostras reais e estão apresentados abaixo:

- Para o 7500 Real-Time PCR System: 120 cópias/μL para *P. falciparum* e 111 cópias/μL para *P. vivax*;

- Para o Rotor-Gene Q: 100 cópias/μL para *P. falciparum* e 343 cópias/μL para *P. vivax*.

16.2. Especificidade analítica

O kit não apresentou detecção cruzada frente a análise de amostras conhecidamente positivas para 59 espécies de microrganismos.

16.3. Precisão

Testes de repetibilidade e reprodutibilidade foram realizadas por três operadores diferentes em dois experimentos independentes. Os resultados de Repetibilidade e Reprodutibilidade demonstraram desvio padrão relativo inferiores a 25%, portanto, considerados satisfatórios.

16.4. Desempenho diagnóstico

O Kit IBMP Biomol Malária apresentou sensibilidade clínica (relativo à microscopia) de 100% para as duas plataformas. A especificidade clínica foi de 99,2% para o equipamento 7500 Applied Biosystems e de 100% para o Rotor-Gene Q.

17. RISCOS RESIDUAIS IDENTIFICADOS

- Os procedimentos descritos nessa Instrução de Uso visam minimizar o risco de contaminação cruzada ou ambiental pelo produto amplificado. No entanto, o risco de contaminação com ácido nucleico proveniente de outras fontes deve ser mitigado por meio da adoção de boas práticas de laboratório;
- O Controle Positivo deve ser tratado como uma amostra positiva. Mesmo não apresentando risco biológico para humanos, o Controle Positivo deve ser manipulado com extremo cuidado para que não ocorra contaminação acidental de amostras ou do ambiente, o que pode levar a resultados falso-positivos;
- Realizar a descontaminação periódica de ambientes, bancadas e instrumentos, utilizando agente descontaminante apropriado para áreas de trabalho em Biologia Molecular;
- Realizar os procedimentos de extração de ácidos nucleicos, o preparo de misturas de reação e a etapa de PCR em áreas físicas distintas para reduzir o risco de contaminação de reagentes, amostras e ambiente;
- Recomenda-se realizar o monitoramento periódico das instalações laboratoriais para garantir que não haja contaminação ambiental por ácidos nucleicos ou produtos de PCR que possam levar a resultados falso-positivos.



18. DESCARTE DE RESÍDUOS

Os resíduos gerados após o uso do produto devem ser descartados em locais apropriados e destinados ao tratamento adequado de acordo com a legislação vigente local.

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

- O produto deve ser utilizado dentro do prazo da validade determinado pelo fabricante;
- O fabricante não se responsabiliza pelos resultados obtidos, caso o usuário não siga corretamente as instruções de uso e condições de armazenamento dos insumos;
- Devem ser utilizados instrumentos de medição e detecção calibrados e/ou qualificados, sempre que aplicável;
- As condições de coleta e armazenamento de amostras impactam diretamente na qualidade do resultado obtido pelo kit IBMP Biomol Malária. Amostras coletadas e armazenadas em desacordo com o preconizado no item 8 desta Instrução de Uso podem gerar resultados falsos;
- Os parâmetros de desempenho apresentados nessa Instrução de Uso são aplicáveis para a análise de amostras de DNA obtidas de amostras de sangue total. O uso de DNA extraído de outras matrizes biológicas não foi validado para o Kit IBMP Biomol Malária e pode comprometer o resultado do teste;
- O produto pode ser utilizado com os equipamentos constantes no item 7 desta Instrução de Uso.