

1. NOME COMERCIAL

Kit NAT 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

SAC 0800 400 4267 | +55 41 3165 4247

Horário de atendimento: segunda à sexta-feira, das 8:30 às 16:30 (exceto feriados)

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

3. APRESENTAÇÃO

O Kit NAT 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 NAT Chagas deve ser transportado em gelo seco e armazenado entre -30 e -15°C.

7. PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO

O Kit NAT 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 uma mistura de sangue com uma solução de guanidina-EDTA, na proporção de 1:1, conforme instruções descritas mais adiante.

9. DESCRIÇÃO DO PRODUTO

Cada Kit NAT 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 530 µL;
- 01 tubo de controle positivo (CP) contendo 55 µL;
- 01 tubo de controle negativo (CN) contendo 40 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;
- Kit *DNA High Pure PCR Template Preparation (Roche Life Sciences)*;
- Centrífuga 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 NAT 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

Sangue total (0,5 a 10 mL) deve ser misturado com a solução de guanidina-EDTA (0,5 a 10 mL) em um frasco adequado (razão amostra/guanidina 1:1). Esta mistura (chamada de GEB) deve ser aquecida a 95°C por 15 minutos e pode ser, então, armazenada a 4°C por tempo indeterminado. Para a utilização com o Kit NAT Chagas, 5 µL do Controle Interno de amplificação (IAC) devem ser adicionados a 300 µL de GEB. Esta alíquota deve ser utilizada para a extração de DNA com o kit DNA *High Pure PCR Template Preparation (Roche Life Sciences)*, seguindo as alterações do protocolo do fabricante sancionadas pela Organização Pan-Americana da Saúde. Segue o protocolo modificado que deve ser realizado de acordo com as normas de Boas Práticas de Laboratório:

- Homogeneizar a mistura de GEB em vortex finalizando o processo com inversões;
- Adicionar 40 µL de proteinase K em um microtubo e em seguida adicionar 100 µL de *Binding Buffer* e 5 µL da solução de IAC 2 x 10⁶ cópias/µL;
- Adicionar ao microtubo 300 µL de mistura GEB e homogeneizar fortemente em vortex por 15 segundos, centrifugar brevemente para retirar gotículas da tampa do microtubo;
- Incubar a amostra a 70°C durante 10 minutos em banho seco e, centrifugar brevemente para retirar gotículas da tampa. Nesta etapa incubar uma alíquota contendo *Elution Buffer* em banho seco (esta será utilizada no final do processo para eluir o DNA extraído);
- Adicionar 100 µL de isopropanol à amostra, homogeneizar fortemente em vortex durante 15 segundos e centrifugar brevemente para retirar gotículas da tampa do microtubo;
- Aplicar toda a amostra em coluna de sílica previamente acoplada ao tubo coletor de 2 mL, centrifugar a 8000 x g durante 1 minuto;
- Transferir a coluna de extração para um novo tubo coletor de 2 mL e descartar o tubo contendo o filtrado;
- Adicionar 500 µL de *Inhibitor Removal Buffer* a coluna, centrifugar a 8000 x g durante 1 minuto, transferir a coluna de extração para um novo tubo coletor de 2 mL e descartar o tubo contendo o filtrado;
- Adicionar 500 µL de *Wash Buffer* a coluna e centrifugar a 8000 x g durante 1 minuto;
- Transferir a coluna de extração para um novo tubo (coletor ou microtubo) e descartar o tubo contendo o filtrado;
- Repetir os passos “i” e “j”;
- Centrifugar a velocidade máxima durante 10 segundos;
- Transferir a coluna de extração para um microtubo previamente identificado com o código da amostra, e descartar o tubo anterior;
- Adicionar 100 µL de *Elution Buffer* (pré-aquecido a 70°C);
- Centrifugar o tubo com a coluna a 8000 x g durante 1 minuto, para a eluição do DNA e descartar a coluna;
- Após a eluição do DNA, centrifugar novamente o microtubo, na velocidade máxima da centrífuga, por 30 segundos, para remoção dos resíduos de sílica provenientes da coluna e que podem inibir parcialmente a reação de PCR em tempo real;

- Transferir cuidadosamente o sobrenadante para um microtubo identificado com o código da amostra e armazenar entre -20°C e -35°C até o momento do uso.

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;
- Utilizando 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: Os tubos de diluição do CP não devem ser congelados ou reutilizados.

13.3. Preparo do Controle Interno (IAC)

O IAC fornecido com o kit deverá ser diluído 20X em água (fornecida) para obtenção do IAC, no momento do uso, seguindo as orientações a seguir:

- Identificar 1 microtubo de 1,5 ou 2,0 mL como “IAC”;
- Adicionar 95 µL da água (fornecida) no tubo;
- Homogeneizar o tubo IAC fornecido, agitar em vortex por aproximadamente 15 segundos e centrifugar por cerca de 5 segundos;
- Utilizando uma micropipeta, transferir 5 µL do IAC fornecido (item c), para o tubo identificado como IAC”;
- Agitar o tubo “IAC” em vortex por aproximadamente 15 segundos e centrifugar por cerca de 5 segundos.

Nota: O tubo contendo o IAC não deve ser congelado ou reutilizado.

13.4. Preparo da mistura de reação

O Kit NAT 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 fornecidos no kit), todos em duplicata, seguindo o procedimento abaixo:

- Retirar os componentes do módulo de amplificação do Kit NAT 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 (44 amostras e 4 controles, em duplicata) com excesso de 5%
Água RNase Free	4 µL	403,2 µL
Oligomix Chagas 20X	1 µL	100,8 µL
Mix NAT 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.

13.5. Aplicação das amostras de DNA e dos controles:

Um Kit NAT 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 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	CP	IAC	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6	Amostra 7	Amostra 8	Amostra 9
B	1.000 cópias/µL CP	10 cópias/µL CP	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.

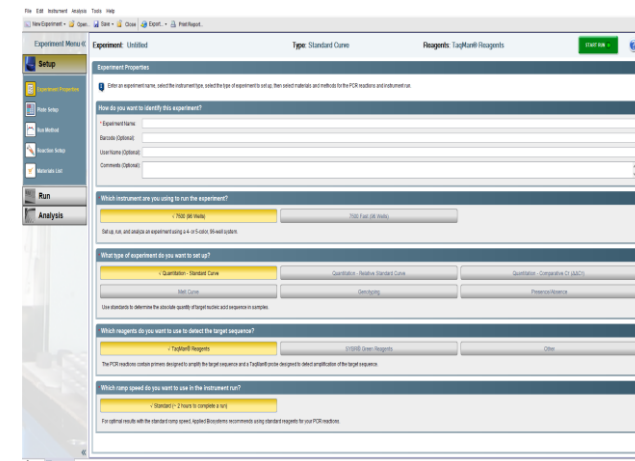
13.6. Configuração do 7500 Real-Time PCR para a corrida:

- 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;
- 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;

- No programa, selecionar *New Experiment* conforme indicado na figura abaixo:



- No menu *Setup* (do lado esquerdo da tela), submenu *Experiment Properties*, inserir o nome do ensaio utilizado no campo *Experiment Name*;
- No campo “Which instrument are you using to run the experiment?”, selecionar 7500 (96 Wells);
- No campo “What type of experiment do you want to set up?”, selecionar *Quantitation - Standard Curve*;
- No campo “Which reagents do you want to use to detect the target sequence?”, selecionar *Taqman® Reagents*;
- Por fim, no campo “Which ramp speed do you want to use in the instrument run?”, selecionar *Standard (~2 hours to complete a run)*. As configurações desta página do software são mostradas na figura a seguir:



- 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
IAC	HEX	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). Nomear 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
IAC	0,02	AUTO	AUTO

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

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 (alto)	Não restrito	30	Não deve haver amplificação no canal VIC
CP (baixo)	Não restrito	40	Não deve haver amplificação no canal VIC
IAC	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. Caso a amostra não apresente amplificação para o IAC, o teste deverá ser repetido;
d. A amostra será considerada positiva para DNA de *Trypanosoma cruzi* se a mesma apresentar amplificação do alvo *T. cruzi* (canal FAM) com Ct entre 17 e 45, com amplificação concomitante do alvo IAC (canal VIC);
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.

15. SUBSTÂNCIAS INTERFERENTES OU LIMITAÇÕES DO PRODUTO

O Kit NAT Chagas pode apresentar resultado falso-positivo na presença de DNA de *Toxoplasma gondii* na amostra.

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. Quando o teste foi comparado ao teste sorológico* padrão, a sensibilidade e especificidade diagnósticas foram de 59,4% e 100%, respectivamente.

* O teste sorológico permite dizer que o paciente já foi exposto ao parasita, e não indica, necessariamente, a sua presença no momento do teste.

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 da 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 NAT 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.