

Instrução de Uso - Kit IBMP

Biomol Agro *T. cruzi*

IU-AGRO-001

Revisão 02

29/09/2023

1. NOME COMERCIAL

Kit IBMP Biomol Agro *T. cruzi*

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

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

Suporte e Assessoria Científica: 0800 400 4267

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

3. APRESENTAÇÃO

O Kit IBMP Biomol Agro *T. cruzi* é composto pelo módulo de amplificação contendo 4 tubos com os reagentes necessários para a realização da PCR em tempo real, incluindo os controles positivo e negativo, suficientes para 96 determinações.

4. FINALIDADE

Teste molecular recomendado para a detecção laboratorial qualitativa (presença/ausência), através da técnica de qPCR, do protozoário *Trypanosoma cruzi* em amostras de alimentos, e validado em amostras de açaí ou caldo de cana.

5. USUÁRIO PRETENDIDO

O teste deve ser realizado por profissionais com conhecimento específico em biologia molecular.

6. INDICAÇÕES DE ARMAZENAMENTO OU MANUSEIO

O Kit IBMP Biomol Agro *T. cruzi* deve ser transportado e armazenado entre -30 e -15 °C.

7. PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO

O Kit IBMP Biomol Agro *T. cruzi* utiliza a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real. Esta técnica permite a detecção de moléculas de DNA com sequências específicas na mistura de ácidos nucleicos purificada das amostras. Esta detecção se dá pelo registro do aumento da fluorescência emitida por sondas marcadas a cada ciclo de amplificação da PCR.



O Kit IBMP Biomol Agro *T. cruzi* permite a detecção do DNA do protozoário *Trypanosoma cruzi*, além do DNA vegetal que funciona como um controle interno (CI) da reação. O DNA do parasita e o CI são detectados com sondas marcadas com diferentes fluoróforos e, desta forma, sua detecção ocorre em canais distintos (FAM e VIC). Um sinal de amplificação para o CI indica que a amostra foi extraída corretamente e que as enzimas da reação funcionam adequadamente. Um sinal de amplificação do DNA do parasita indica contaminação da amostra com *Trypanosoma cruzi*. O Kit IBMP Biomol Agro *T. cruzi* destina-se a análises de caráter qualitativo.

8. TIPO DE AMOSTRAS OU MATRIZES APLICÁVEIS

O Kit IBMP Biomol Agro *T. cruzi* deve ser utilizado com DNA purificado de amostras vegetais com suspeita de contaminação com *T. cruzi*.

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

O kit foi desenvolvido para testar amostras de DNA purificado de polpa de açaí ou de cana-de-açúcar. O método de purificação de DNA utilizado deve assegurar que a extração seja eficiente na recuperação dos materiais genéticos tanto do vegetal quanto do parasita. O DNA purificado pode ser armazenado a -20 °C.

9. DESCRIÇÃO DO PRODUTO

O Kit IBMP Biomol Agro *T. cruzi* é composto por:

- 02 tubos de Mistura de PCR contendo 1300 µL;
- 01 tubo de Oligomix contendo 110 µL;
- 01 tubo de Água RNase Free contendo 1500 µL;
- 01 tubo de controle positivo (CP) contendo 15 µL;
- 01 tubo de controle negativo (CN) contendo 15 µL.

9.1. Materiais necessários não fornecidos com o produto

- Equipamento de proteção individual (jaleco, máscara descartável, óculos de segurança, luvas se pó descartáveis);
- Pipetas de 10, 100 e 1000 µL, devidamente calibrados;
- Tubos para diluição e armazenamento de amostras;
- Microtubos de 1,5 ou 2 mL;
- Kit de extração de DNA conforme protocolo do fabricante;
- Cabine de segurança biológica;
- Centrífuga para microtubos;
- Centrífuga para microplacas;

- Agitador tipo vórtex;
- 7500 Real-Time PCR Systems (Thermo Scientific);
- Adesivo óptico para placas de 96 poços, compatível com o instrumento de PCR em tempo real.

10. ESTABILIDADE DO PRODUTO EM USO

O Kit IBMP Biomol Agro *T. cruzi* é de uso único, sobras reagentes e controles não podem ser utilizados.

11. PROCEDIMENTOS A SEREM REALIZADOS ANTES DA UTILIZAÇÃO DO PRODUTO

- Os tubos devem ser centrifugados brevemente antes da utilização, de forma a sedimentar o líquido condensado nas paredes;
- As superfícies devem estar limpas e descontaminadas, preferencialmente com exposição a luz UV por no mínimo 10 minutos antes da manipulação do kit;
- O instrumento de PCR em tempo real deve estar devidamente calibrado e qualificado (incluindo normalização de background, corrida de RNaseP e calibração dos fluoróforos, de acordo com procedimento do fabricante).

12. RECOMENDAÇÕES PARA PROCEDIMENTOS DE CONTROLE DE QUALIDADE

- Cuidados com o CP: deve-se manusear o controle positivo com cuidado e atenção para evitar possíveis contaminações do CP nos poços de amostras, o que pode acarretar resultados falso-positivos;
- Cuidados para evitar contaminação cruzada: o kit deve ser manuseado dentro de cabines de manipulação de ácidos nucleicos, devidamente descontaminadas. Devem ser utilizadas técnicas corretas para evitar a contaminação entre amostras. O CI consiste em um gene vegetal conservado que ocorre em múltiplas cópias por genoma. Desta forma, a manipulação de outras amostras vegetais na mesma cabine sem a descontaminação adequada pode causar amplificação inespecífica deste alvo, o que pode acarretar resultado falso-negativo;
- Descarte: por se tratar da manipulação de amostras biológicas potencialmente patogênicas, os componentes do kit devem ser considerados como contaminantes após o uso e devem, portanto, ser descartados conforme legislação vigente e normas institucionais locais.

13. PROCEDIMENTOS PARA O USO DO PRODUTO

13.1. Preparo da reação



- Retirar todos os componentes do freezer e aguardar o descongelamento completo;
- Homogeneizar cada componente e centrifugar brevemente (spin) todos os tubos fornecidos no kit;
- Preparar a mistura de reação conforme a tabela abaixo:

	Para 1 reação	Para 96 reações (com excesso)
Mistura de PCR 2X	25 µL	2500 µL
Oligomix 50 X	1 µL	100 µL
Água DNase/RNase-free	14 µL	1400 µL
Total	40 µL/poço	

- Adicionar 40 µL da mistura de reação preparada desta forma a cada um dos 96 poços da placa;
- Adicionar 10 µL de amostra, CP ou CN aos poços correspondentes, de acordo com o planejamento prévio;
- Selar a placa e centrifugar brevemente.

13.2. Programação do Instrumento de PCR em Tempo Real e início da PCR

- Ligar o computador e o 7500 Real-Time PCR System e introduzir na bandeja a placa preparada anteriormente;
- Abrir o software de operação 7500 software;
- Iniciar um novo protocolo;
- Incluir dois Targets conforme quadro abaixo:

Target Name	Reporter	Quencher
<i>T. cruzi</i>	FAM	None
CI	VIC	None

- Incluir a identificação das amostras que serão testadas, além do CP e CN;
- Associar os dois alvos com todos os poços da placa e cada amostra/controle aos poços correspondentes;
- Selecionar a referência passiva ou interna de equipamento como "ROX";
- Ajustar a ciclagem conforme o quadro abaixo:

Etapa	Temperatura	Tempo	Captura de fluorescência
Holding Stage	95 °C	10 minutos	NÃO
Cycling Stage (45x)	95 °C	15 s	NÃO
	60 °C	60 s	SIM

- Salvar o arquivo e iniciar a corrida.

14. ANÁLISE DOS RESULTADOS

14.1. Parâmetros de análise dos resultados

Os parâmetros baseline e threshold devem ser ajustados após a corrida, conforme os valores indicados no quadro abaixo:

Alvo	Baseline	Threshold
<i>T. cruzi</i>	AUTO	0,25
CI	AUTO	0,05

14.2. Interpretação dos resultados

- Para que a corrida seja válida, todas as seguintes condições devem ser atendidas:
 - O CP deve apresentar amplificação com Ct inferior a 35 para os dois alvos;
 - O CN não deve apresentar amplificação para nenhum dos dois alvos com Ct inferior a 35;
- A amostra será considerada positiva para DNA de *T. cruzi* quando todas as seguintes condições forem atendidas:
 - O CI apresentar amplificação com Ct entre 16 e 45 e;
 - T. cruzi* apresentar amplificação com Ct entre 16 e 45;
- A amostra será considerada negativa para DNA de *T. cruzi* quando todas as seguintes condições forem atendidas:
 - O CI apresentar amplificação com Ct entre 16 e 45 e;
 - T. cruzi* não apresentar amplificação;
- A amostra terá resultado inconclusivo quando o resultado não se enquadrar nas condições acima.

14.2.1. Guia de resolução de possíveis resultados fora de critério de aceitação

- Amostras com Ct de *T. cruzi* ou CI abaixo de 16: diluir o DNA extraído de 10 a 100 vezes e repetir o teste. O Ct muito baixo para o controle interno pode interferir na detecção do DNA de *T. cruzi*;
- Amostras sem amplificação do CI: repetir a corrida utilizando um volume de amostra de até 24 µL, descontado do volume de água mencionado no item 13.1, de forma que o volume final da reação continue sendo 50 µL. Caso não haja amplificação, é possível que tenha ocorrido degradação do DNA da amostra, que deve ser extraído novamente;
- Amplificação no CN com Ct inferior a 35: Verificar as condições de trabalho para assegurar que não há contaminação ambiental com DNA de *T. cruzi* ou DNA vegetal;
- Falha na amplificação no CP: Verificar as condições de armazenamento do kit e o prazo de validade.

15. SUBSTÂNCIAS INTERFERENTES OU LIMITAÇÕES DO PRODUTO

Substâncias presentes nas amostras em análise podem promover inibição da reação de PCR. Em caso de resultado fora da especificação, observar os procedimentos do item 14.2.1.

16. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

16.1. Sensibilidade

O teste foi capaz de detectar 0,038 genoma-equivalentes/reação em pelo menos 95% das repetições nesta concentração.

16.2. Especificidade

O kit não apresentou reações cruzadas com *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania guyanensis*, *Leishmania infantum*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Escherichia coli*, *Eimeria tenella*, *Eimeria acervulina*, *Eimeria faecalis*, *Eimeria cloacae*, *Eimeria faecium* ou *Cyclospora cayetanensis*, apresentando Especificidade de 100% nas condições testadas.

17. RISCOS RESIDUAIS IDENTIFICADOS

Não aplicável.

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

- O produto deve ser utilizado dentro do prazo de validade determinado pelo fabricante;
- O fabricante não se responsabiliza por resultados obtidos caso o usuário não siga corretamente as instruções de uso e 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;
- O Kit IBMP Biomol Agro *T. cruzi* foi validado usando amostras de açai e caldo de cana, processados utilizando o kit High Pure PCR Template Preparation (Roche Life Science, cat. 11796828001) utilizando o protocolo para



tecidos de mamíferos, com uma centrifugação adicional a velocidade máxima (aproximadamente 22.000 g) imediatamente após a adição de isopropanol, utilizando o sobrenadante para as etapas subsequentes.

