

Instrução de Uso
Kit IBMP Biomol Leishmaniose
 IU-IVD-033
 Revisão: 01

1. NOME COMERCIAL

Kit IBMP Biomol Leishmaniose.

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 (exceto feriados).
sac@ibmp.org.br | www.ibmp.org.br

3. APRESENTAÇÃO

Kit contendo um módulo de amplificação suficiente para 96 determinações.

4. FINALIDADE

Este produto se destina à detecção qualitativa (presença/ausência) do material genético de *Leishmania infantum* e outras espécies do gênero *Leishmania* spp., extraído de amostras de sangue total obtidas de pacientes com suspeita de infecção por este parasita. O resultado obtido pode ser utilizado, em conjunto com os dados clínicos e epidemiológicos do paciente, para auxiliar o diagnóstico de leishmaniose visceral americana (LVA).

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°C e -15°C. A temperatura indicada para manipulação do produto é entre 15°C e 30°C.

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

7. PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO

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

A reação de qPCR permite a detecção de sequências nucleotídicas específicas no genoma do patógeno, em DNA extraído de sangue total a partir da avaliação da intensidade de fluorescência capturada ao final de cada ciclo da PCR.



O Kit IBMP Biomol Leishmaniose permite a identificação de *Leishmania infantum* bem como de outras espécies do gênero *Leishmania*, através da detecção dos alvos moleculares para *Leishmania* spp., *L. infantum*, além de um controle interno (CI) endógeno. A detecção da presença de ácidos nucleicos de *Leishmania* spp., *L. infantum* e do Controle Interno é feita através da utilização de sondas de hidrólise específicas para cada alvo molecular (oligonucleotídeos marcados com fluorescência), em reação multiplex.

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 pesquisados 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 da amostra. 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 do patógeno 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, exceto CI.

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 System (Applied Biosystems), 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) em módulo *Standard*, QuantStudio 5 (Applied Biosystems), Amplio96 (Loccus) e CFX 96 (Bio-Rad).

8. TIPO DE AMOSTRAS OU MATRIZES APLICÁVEIS

Amostras de DNA extraído de sangue total.

8.1. Condições para coleta, manuseio, preparo e preservação de amostras

As amostras devem ser coletadas conforme métodos convencionais de punção venosa em tubo com anticoagulante (EDTA).

Após a coleta, as amostras de sangue devem ser transportadas e permanecer armazenadas entre 2°C e 8°C por até 7 dias. Após esse período, as amostras devem ser armazenadas a -20°C.

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 a -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 microrganismos, 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 entre as amostras.

9. DESCRIÇÃO DO PRODUTO

O Kit IBMP Biomol Leishmaniose é composto por um módulo de amplificação contendo:

- 01 microtubo de Tampão de Reação contendo 550 µL;
- 01 microtubo de Oligomix contendo 1000 µL;
- 01 microtubo de Enzima Taq contendo 50 µL;
- 01 microtubo de Controle Positivo (CP) contendo 30 µL;
- 01 microtubo de Controle Negativo (CN) contendo 30 µL.

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 2,0 mL;
- Cabine do tipo PCR Workstation;
- Caneta para marcação permanente em plástico;
- Centrífuga para microtubos de 1,5 a 2,0 mL;
- Centrífuga 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, luvas descartáveis sem pó, protetores de barba, óculos de segurança);
- Kit de extração de DNA;
- Micropipetas de precisão (0,5-10 µL, 10-100 µL e 100-1000 µL);
- Microtubos de 1,5 ou 2,0 mL, estéreis e livres de nucleases;
- Placa de PCR (96 poços);
- Ponteiras esterilizadas livre de RNases e DNases, com filtro (0,5-10 µL, 10-100 µL e 100-1000 µL);
- Recipientes para descarte de resíduos;
- Suporte/estante para microtubos de 1,5 a 2,0 mL.

10. ESTABILIDADE DO PRODUTO EM USO

Esse é um produto de uso múltiplo.

O estudo de estabilidade demonstrou que o produto mantém sua qualidade por até 5 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 e luvas sem pó descartáveis, protetores de barba e óculos de segurança para a 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 em cada corrida;

- Elaborar o mapa da placa de reação, identificando os poços a serem utilizados e a posição de aplicação de cada amostra, do controle positivo e do controle negativo;
- Calcular, conforme os volumes apresentados na Tabela 1, os volumes necessários para realização da corrida.

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

Tabela 1. Receita para preparo da mistura de reação do Kit IBMP Biomol Leishmaniose.

Componente	Volume para uma reação
Tampão de Reação	5 µL
Enzima Taq	0,4 µL
Oligomix	9,6 µL
TOTAL	15 µL

- Em área física apropriada, identificar um microtubo de 1,5 ou 2,0 mL para preparo da mistura de reação;
- Adicionar ao microtubo, devidamente identificado, os componentes e volumes listados na Tabela 1, ajustado ao número de reações a serem realizadas;
- Homogeneizar gentilmente por vórtex suave, pipetagem ou tamborilando e centrifugar brevemente (*spin*);
- Distribuir 15 µL da mistura de reação em cada poço de uma placa de PCR de 96 poços, seguindo o mapa da placa de reação;
- Selar a placa com adesivo não-óptico para transferi-la até a 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 µL de cada amostra de DNA extraído nos poços correspondentes na placa de reação;
- Adicionar 5 µL do Controle Positivo (CP) no poço correspondente na placa de reação;
- Adicionar 5 µL de Controle Negativo (CN) no poço correspondente na placa de reação;
- Selar a placa de reação com adesivo óptico;
- Centrifugar a placa brevemente (*spin*).

13.3. Configurações 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 a Tabela 2.

Tabela 2. Alvos e fluorescências/canais a serem configurados para a análise.

Alvo	Fluoróforo repórter	Quencher
<i>Leishmania</i> spp.	FAM	None
<i>L. infantum</i>	VIC	None
CI	Cy5	None

- Selecionar a referência passiva do equipamento como NONE, quando aplicável;
- Configurar os parâmetros de termociclagem da reação conforme Tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros de termociclagem para o Kit IBMP Biomol Leishmaniose.

Etapas	Temperatura (°C)	Tempo	Número de ciclos
Estágio 1	95	10 minutos	01
Estágio 2	95	15 segundos	40
	60*	30 segundos*	

*Estágio para captura de fluorescência.

- Salvar arquivo e iniciar a corrida no equipamento.

14. ANÁLISE DOS RESULTADOS

14.1. Parâmetros de análise dos resultados

Para a análise de resultados, devem ser adotados os parâmetros descritos na Tabela 4, de acordo com o equipamento utilizado.

Tabela 4. Parâmetros analíticos a serem utilizados para os diferentes termocicladores.

Equipamento	Alvo	Threshold	Baseline
-7500 -7500 Fast (em módulo Standard) -QuantStudio 5 (Applied Biosystems)	<i>Leishmania</i> spp.	30.000	6 – 15
	<i>L. infantum</i>	20.000	6 – 15
	CI	40.000	6 – 15
Amplio96 (Loccus)	<i>Leishmania</i> spp.	130	6 – 15
	<i>L. infantum</i>	80	6 – 15
	CI	200	6 – 15
CFX96 (Bio-Rad)	<i>Leishmania</i> spp.	120	6 – 15



Equipamento	Alvo	Threshold	Baseline
	<i>L. infantum</i>	70	6 – 15
	CI	120	6 – 15

14.2. Interpretação dos resultados

– Para que uma corrida seja considerada válida, o Controle Positivo (CP) deve apresentar amplificação para os três alvos avaliados, apresentando $Ct \leq 35$;

– Para que uma corrida seja considerada válida, o Controle Negativo (CN) não deve apresentar amplificação para os alvos *Leishmania* spp. e *L. infantum*, e deve apresentar amplificação do Controle Interno com $Ct \leq 35$;

– Para que uma amostra seja considerada negativa, não deve apresentar amplificação dos alvos *Leishmania* spp. e *L. infantum*, e deve apresentar amplificação do Controle Interno com $Ct \leq 35$;

– Para que uma amostra seja considerada positiva para *Leishmania infantum*, deve apresentar amplificação com curva de perfil típico para o alvo *L. infantum*, mesmo que não haja amplificação do Controle Interno e/ou do alvo *Leishmania* spp.;

– Para que uma amostra seja considerada positiva outras espécies de *Leishmania* spp., exceto *L. infantum*, deve apresentar amplificação com curva de perfil típico apenas para o alvo *Leishmania* spp., mesmo que não haja amplificação do Controle Interno.

Os critérios para interpretação de resultados estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5. Critérios para interpretação de resultados do Kit IBMP Biomol Leishmaniose.

Amostra			CP	CN	Resultado
<i>Leishmania</i> spp.	<i>L. infantum</i>	CI			
+	-	+/-	+	-	<i>Leishmania</i> spp. detectável (exceto <i>L. infantum</i>)
+/-	+	+/-	+	-	<i>L. infantum</i> detectável
-	-	+	+	-	<i>Leishmania</i> spp. e <i>L. infantum</i> não detectáveis
-	-	-	+	-	Amostra inválida
+/-	+/-	+/-	+/-	+	Ensaio inválido
+/-	+/-	+/-	-	+/-	Ensaio inválido

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

– Amostras sem amplificação para os alvos patogênicos e com amplificação do CI fora dos critérios de aceitação indicados no item 14.2 são consideradas inválidas e o processo deve ser repetido desde a extração;

– Ensaios que não apresentem amplificação para algum dos alvos do CP são inválidos e devem ser repetidos;

– Ensaios que não apresentem amplificação do CI no poço correspondente ao CN são inválidos e devem ser repetidos.

15. SUBSTÂNCIAS INTERFERENTES OU LIMITAÇÕES DO PRODUTO

– O desempenho deste ensaio depende da coleta, conservação e transporte adequados da amostra para o local do ensaio (consulte a seção TIPOS DE AMOSTRAS E MATRIZES APLICÁVEIS nesta Instrução de Uso);

– Amostras de sangue total podem ser utilizadas com o Kit IBMP Biomol Leishmaniose. O uso de outras matrizes biológicas não foi validado com o kit;

– Os resultados obtidos com o Kit IBMP Biomol Leishmaniose devem ser interpretados em conjunto com informações clínicas, epidemiológicas e laboratoriais do paciente. Um resultado “Não detectável” não exclui a possibilidade de infecção por *Leishmania* spp.

16. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

16.1. Sensibilidade analítica

Para a determinação do limite mínimo de detecção (LoD), foram testadas 8 diluições, com um mínimo de 5 replicatas cada, de material genético extraído de culturas de *L. amazonensis*, *L. (Viannia) guyanensis*, *L. (Viannia) braziliensis* e *L. infantum*. A contagem do número de parasitas para estabelecimento da concentração das curvas foi feita em câmara de Neubauer através de microscopia óptica.

O LoD do Kit IBMP Biomol Leishmaniose, com confiança de 95%, é 0,58 parasitas/reação (CI95% 0,36 – 1,34) para *Leishmania* spp. e de 0,16 parasitas/reação (CI95% 0,11 – 0,3) para *L. infantum*.

16.2. Especificidade analítica

O Kit IBMP Biomol Leishmaniose não apresentou detecção cruzada frente à análise de amostras conhecidamente positivas para os seguintes patógenos: *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Crithidia deanei* e *Plasmodium falciparum*. Além disso, o kit não apresentou detecção cruzada no alvo *L. infantum* frente à análise de amostras de material genético extraído de culturas ou amostras clínicas infectadas por

Leishmania amazonensis, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Viannia) shawi*.

16.3. Precisão

Os testes de repetibilidade com três operadores distintos apresentaram Desvio Padrão Relativo abaixo de 5% para o alvo *Leishmania* spp. e abaixo de 9% para o alvo *L. infantum*. Os testes de reprodutibilidade em três termocicladores do modelo 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) diferentes apresentaram Desvio Padrão Relativo igual ou abaixo de 5,06% para os alvos *Leishmania* spp e *L. infantum*.

16.4. Desempenho diagnóstico

O desempenho diagnóstico do teste foi determinado através da análise de um painel de 124 amostras clínicas de sangue total previamente caracterizadas, sendo 74 amostras conhecidamente positivas para LVA e 50 amostras de indivíduos saudáveis, assintomáticos e provenientes de área não endêmica para LVA. Os resultados estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6. Desempenho diagnóstico do Kit IBMP Biomol Leishmaniose para leishmaniose visceral americana.

LVA		Método de Referência		
		Pacientes com LVA	Indivíduos Saudáveis	TOTAL
Kit IBMP Biomol Leishmaniose	Detectável	72	0	72
	Não Detectável	2	50	52
	TOTAL	74	50	124

O teste apresenta sensibilidade diagnóstica de 97,3% (IC95% 90,6 – 99,7%), especificidade diagnóstica de 100% (IC95% 92,9 – 100%), valor preditivo positivo de 100% (IC95% 95,0 – 100%) e valor preditivo negativo de 96,15% (IC95% 86,4 – 99,0%) para leishmaniose visceral americana.

O Kit IBMP Biomol Leishmaniose também foi testado 40 amostras clínicas de biópsia de pele conhecidamente positivas para *Leishmania* spp, obtidas de pacientes com confirmação diagnóstica de leishmaniose tegumentar americana. Dentre as amostras testadas, 17 foram positivas para *L. (V.) braziliensis*, 19 para *L. (V.) shawi*, 1 para *L. amazonensis* e 3 para *Leishmania* spp. O Kit IBMP Biomol Leishmaniose detectou a presença de *Leishmania* spp. em 39 das 40 amostras, resultando em uma concordância diagnóstica de 97,5%.



17. RISCOS RESIDUAIS IDENTIFICADOS

- Os procedimentos descritos nesta Instrução de Uso visam minimizar o risco de contaminação cruzada ou ambiental pelo produto amplificado. No entanto, o risco de contaminação com ácido nucléico 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 processos 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 do 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 de 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 Leishmaniose. 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 nesta Instrução de Uso são aplicáveis para a análise de amostras de DNA obtidas de sangue total. O uso DNA extraído de outras matrizes biológicas não foi validado para o Kit IBMP Biomol Leishmaniose;

- O produto pode ser utilizado com os equipamentos constantes no item 7 desta Instrução de Uso.