



## 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 8h30 às 16h30 (exceto feriados).

Suporte e Assessoria Científica: 0800 400 4267

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 do protozoário *Trypanosoma cruzi*, extraído de amostras de alimentos, como açaí e caldo de cana.

**PRODUTO PARA USO AGROPECUÁRIO, NÃO PASSÍVEL DE REGULARIZAÇÃO. PROIBIDO O USO EM DIAGNÓSTICO HUMANO.**

## 5. USUÁRIO PRETENDIDO

O teste deve ser realizado por profissionais devidamente habilitados, com conhecimento específico em biologia molecular, especificamente em testes 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 do módulo de amplificação deve ser feita com luvas descartáveis sem pó.

## 7. PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO

O Kit IBMP Biomol Agro *T. cruzi* utiliza a técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR). A reação de qPCR permite a detecção de sequências nucleotídicas específicas do genoma do protozoário *Trypanosoma cruzi*, em DNA extraído de amostras de açaí e caldo de cana, a partir da avaliação da intensidade de fluorescência capturada ao final de cada ciclo da PCR.

O Kit IBMP Biomol Agro *T. cruzi* permite a identificação do protozoário *Trypanosoma cruzi*, além da detecção de um Controle Interno (CI) da reação. A detecção da presença de ácidos nucleicos do *T. cruzi* e do CI é feita através do uso de sondas de hidrólise específicas para cada alvo molecular

(oligonucleotídeos marcados com fluorescência), em uma reação multiplex. A geração de uma curva de amplificação com formato típico para o alvo molecular pesquisado demonstra uma reação com resultado detectável para a amostra. Amostras com resultados não detectáveis para o alvo molecular pesquisado 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.

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 experimentais e ambientais e que deve apresentar resultado não detectável para todos os alvos, incluindo o CI.

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

Produto validado para uso no seguinte termociclador: 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

## 8. TIPO DE AMOSTRAS OU MATRIZES APLICÁVEIS

Amostras de DNA extraído de açaí e caldo de cana.

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

A coleta deve ser realizada conforme métodos de coleta de rotina para a matriz preconizada, com cuidado, a fim de evitar contaminação com outras amostras coletadas simultaneamente.

### 8.2. Extração do DNA

Deve-se realizar a extração do 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

– Caso seja necessário, o armazenamento do DNA extraído deve ser realizado entre -30°C e -15°C.

– Ciclos de congelamento e descongelamento do DNA extraído devem ser evitados para prevenir a degradação do material genético.

– Usar sempre luvas descartáveis sem pó durante o manuseio do DNA extraído a fim de prevenir contaminação por nucleases. Mãos e partículas podem carrear microrganismos, que são as fontes mais comuns destes contaminantes.

– Manter os tubos contendo DNA fechados durante os procedimentos. Abrir um tudo 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 Agro *T. cruzi* é composto por um módulo de amplificação contendo:

- 02 microtubos de Mistura de PCR contendo 1300 µL;
- 01 microtubo de Oligomix contendo 110 µL;
- 01 microtubo de Água RNase Free contendo 1500 µL;
- 01 microtubo de Controle Positivo (CP) contendo 60 µL;
- 01 microtubo de Controle Negativo (CN) contendo 60 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;
- Canetas 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 mL, estéreis e livres de nucleases;
- Placa de PCR (96 poços);
- Ponteiras esterilizadas livres de nucleases com filtro (0,5-10 µL, 10-100 µL, 100-1000 µL);
- Recipientes para descarte de resíduos;
- Suporte/estante para microtubos 1,5 a 2,0 mL.

## 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 usando 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 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. Volumes para preparo da mistura de reação do Kit IBMP Biomol Agro *T. cruzi*.

Componente	Volume para uma reação
Mistura de PCR	25 µL
Oligomix	1 µL
Água RNase Free	14 µL
<b>Total</b>	<b>40 µL</b>

- Em área física apropriada, identificar um microtubo de 1,5 ou 2,0 µL para o preparo da mistura de reação;
- Adicionar ao microtubo, devidamente identificado, os componentes e volumes listados na Tabela 1, ajustados ao número de reações a serem realizadas;
- Homogeneizar gentilmente por vórtex suave, pipetagem ou tamborilando e centrifugar brevemente (*spin*);
- Distribuir 40 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 10 µL de cada amostra de DNA extraído nos poços correspondentes na placa de reação;
- Adicionar 10 µL do Controle Positivo (CP) no poço correspondente na placa de reação;
- Adicionar 10 µL do Controle Negativo (CN) no poço correspondente na placa de reação;
- Selar a placa com adesivo óptico;
- Centrifugar a placa brevemente (*spin*).

### 13.3. Configurações de detecção e termociclagem

- Configurar o software do equipamento conforme mapa de reação estabelecido pelo usuário, identificando a posição de cada amostra, do CP e do CN;
- Configurar as fluorescências para cada canal conforme descrito na Tabela 2.

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

Alvo	Fluoróforo repórter	Quencher
<i>T. cruzi</i>	FAM	None
CI	VIC	None

- Configurar os parâmetros de termociclagem da reação conforme descrito na Tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros de termociclagem para o Kit IBMP Biomol Agro *T. cruzi*.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo	Número de ciclos
Etapa 1	95	10 minutos	1
Etapa 2	95	15 segundos	45
	60*	60 segundos	

\* Etapa para captura de fluorescência.

- Selecionar a referência passiva do equipamento como ROX;
- Salvar o arquivo e iniciar a corrida no equipamento.

## 14. ANÁLISE DOS RESULTADOS

### 14.1. Parâmetros de análise dos resultados

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

Tabela 4. Parâmetros analíticos a serem utilizados para cada termociclador.

Equipamento	Alvo	Threshold	Baseline
7500 Real-Time PCR System	<i>T. cruzi</i>	0,25	AUTO
	CI	0,05	AUTO

### 14.2. Interpretação dos resultados

- Para que uma corrida seja considerada válida, o CP deve apresentar amplificação para os alvos *T. cruzi* e CI com  $Ct < 35$ ;
- Para que uma corrida seja considerada válida, o CN não deve apresentar amplificação para nenhum dos dois alvos;
- Para que uma amostra seja considerada negativa, não deve apresentar amplificação para o alvo *T. cruzi* e deve apresentar amplificação do CI com  $16 < Ct < 45$ ;
- Para que uma amostra seja considerada positiva, deve apresentar amplificação com perfil típico para os alvos *T. cruzi* e CI com  $16 < Ct < 45$ ;
- Os critérios para interpretação de resultados estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5. Critérios de interpretação dos resultados do Kit Biomol Agro *T. cruzi*.

Amostra		CP	CN	Resultado
<i>T. cruzi</i>	CI			
-	+	+	-	<i>T. cruzi</i> não detectado
+	+	+	-	<i>T. cruzi</i> detectado
+/-	-	+	-	Amostra inválida
+/-	+/-	-	+/-	Ensaio inválido
+/-	+/-	+/-	+	Ensaio inválido

#### 14.2.1. Guia de resolução de possíveis resultados fora dos critérios de aceitação

- Caso o CP não apresente amplificação para os alvos esperados, o ensaio é considerado inválido e os resultados das amostras não são interpretáveis;
- Caso o CN apresente amplificação dos alvos *T. cruzi* ou CI, o ensaio é considerado inválido e os resultados das amostras não são interpretáveis;
- A amplificação dos alvos *T. cruzi* ou CI no CN é indicativo de contaminação do ensaio e este deve ser repetido. Nesses casos, considere a adoção de protocolos de descontaminação mais eficientes;
- Amplificações dos alvos do CP com Cts tardios ( $Ct > 35$ ) podem indicar falhas operacionais, contaminação por inibidores ou degradação dos insumos. Nesses casos considere utilizar protocolos de armazenamento e manuseio mais cuidadosos;



– Em amostras com amplificação dos alvos *T. cruzi* ou CI com Ct < 16, orienta-se diluir o DNA extraído e repetir o teste. O Ct muito baixo para o CI pode interferir na detecção do alvo *T. cruzi*;

– A ausência de amplificação do CI nas amostras pode indicar problemas no processo de coleta e armazenamento, ou no processo de extração. Nesses casos, recomenda-se testar a amostra novamente utilizando um volume de DNA extraído de até 24 µL, descontado do volume de Água RNase Free previsto na Tabela 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.

## 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 (para mais detalhes, consultar o item 8 desta Instrução de Uso);

– Amostras de açaí e caldo de cana podem ser utilizadas com o Kit IBMP Biomol Agro *T. cruzi*. O uso com outras matrizes biológicas não foi validado com este produto;

– Os resultados obtidos com o Kit IBMP Biomol Agro *T. cruzi* devem ser interpretados em conjunto com informações epidemiológicas e laboratoriais. Um resultado “Não detectável” não exclui a possibilidade de contaminação por *Trypanosoma cruzi*;

– O alvo do Controle Interno 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 levar a resultados falso-negativos.

– As amostras devem ser coletadas conforme métodos de coleta de rotina para testes moleculares seguindo as recomendações do Ministério da Saúde/Ministério da Agricultura ou respectivas Secretarias de Saúde.

## 16. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

### 16.1. Sensibilidade analítica

Para determinação do limite mínimo de detecção do kit, foram testadas seis diluições de DNA extraído de células de *Trypanosoma cruzi* diluído em DNA extraído de açaí.

O limite mínimo de detecção do Kit IBMP Biomol Agro *T. cruzi*, com confiança de 95%, é de 0,038 genoma-equivalentes/reação para *Trypanosoma cruzi*.

### 16.2. Especificidade analítica

O Kit IBMP Biomol Agro *T. cruzi* não apresentou detecção cruzada frente a análise de amostras conhecidamente positivas para *Leishmania amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L.*

*infantum*, *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *Escherichia coli*, *Eimeria tenella*, *E. acervulina*, e *Cyclospora cayetanensis*.

## 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 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 e 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 podem 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

– 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 as 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 Agro *T. cruzi*. 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 matrizes biológicas descritas no item 8. O uso de DNA extraído de outras matrizes biológicas não foi validado para o Kit IBMP Biomol Agro *T. cruzi*;

– O produto foi validado com os equipamentos constantes do item 7 desta Instrução de Uso;

– O Kit IBMP Biomol Agro *T. cruzi* foi validado usando amostras de açaí 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 em velocidade máxima (aproximadamente 22.000 g) imediatamente após a adição de isopropanol, utilizando o sobrenadante para as etapas subsequentes.

– O Kit IBMP Biomol Agro *T. cruzi* não é destinado para uso em diagnóstico humano. Por se tratar de um produto para uso em amostras de açaí e caldo de cana, este produto não é sujeito a regularização da ANVISA, não sendo passível de registro.