

1. NOME COMERCIAL

Kit IBMP Biomol 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

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

O Kit IBMP Biomol Chagas contém um módulo de amplificação suficiente para 96 reações, sendo 44 amostras em duplicata e os controles de reação necessários (4 Controles Positivos, 2 Controles Internos e 2 Controles Negativos).

4. FINALIDADE

Este produto se destina a detecção qualitativa (presença/ausência) do material genético de *Trypanosoma cruzi* em DNA total extraído de amostras de sangue obtidas em serviços de diagnóstico de rotina ou vigilância epidemiológica. O resultado obtido pode ser utilizado, em conjunto com os dados clínicos e epidemiológicos do paciente, para auxiliar e/ou confirmar o diagnóstico da doença de Chagas.

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, 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 Chagas 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 amostras de sangue total com EDTA ou mistura de sangue total com Solução de Guanidina, a partir da avaliação de intensidade de fluorescência capturada ao final de cada ciclo da PCR.

O Kit IBMP Biomol Chagas permite a identificação do *Trypanosoma cruzi*, através da detecção do alvo molecular DNA satélite (satDNA), além de um controle interno de amplificação (IAC) exógeno. A detecção da presença de ácidos nucleicos do *T. cruzi* 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 IAC dentro das especificações fornecidas. A amplificação do IAC indica o funcionamento adequado da reação (reagentes e operador).

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 o alvo molecular. 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 o seguinte termociclador: 7500 Real-Time PCR (*Thermo Fisher Scientific*).

8. TIPO DE AMOSTRAS OU MATRIZES APLICÁVEIS

Amostras de DNA total extraído de sangue total com EDTA ou mistura de sangue total com Solução de Guanidina.

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

Sangue total obtido por punção venosa

A coleta deve ser realizada por métodos convencionais de venopunção em tubo com anticoagulante (EDTA). A amostra de sangue total deve ser utilizada imediatamente.

Mistura de sangue total com Solução de Guanidina

A coleta deve ser realizada por métodos convencionais de venopunção em tubo com anticoagulante (EDTA). O sangue



total deve ser misturado a Solução de Guanidina (não fornecida com o kit) em frasco adequado na razão amostra/solução 1:1. A mistura, chamada de GEB, deve ser aquecida a 95°C por 15 minutos e pode ser armazenada a 4°C por tempo indeterminado.

8.2. Extração de DNA

Antes da extração das amostras, 5 µL do Controle Interno de Amplificação (IAC 20x), fornecido no kit, devem ser adicionados a cada uma das amostras primárias a serem analisadas.

Deve-se realizar a extração do DNA das amostras primárias utilizando o kit de extração DNA *High Pure PCR Template Preparation* (Roche *Life Sciences*) utilizando o protocolo recomendado pelo fabricante com adaptações (apresentadas abaixo), o qual permite obter o DNA com a qualidade e integridade necessária para o atendimento aos critérios de análise estabelecidos no item 14.2 desta Instrução de Uso.

Sangue total obtido por punção venosa

Recomenda-se que a extração do DNA de sangue total obtido por punção venosa seja realizada conforme protocolo do fabricante do kit de extração DNA *High Pure PCR Template Preparation* (Roche *Life Sciences*), **exceto pelo uso de 100 µL de volume de eluição**, ao invés de 200 µL.

Mistura de sangue total com Solução de Guanidina

Deve-se realizar a extração de DNA da mistura GEB conforme protocolo do fabricante do kit de extração DNA *High Pure PCR Template Preparation* (Roche *Life Sciences*) com três adaptações: **deve-se utilizar um volume de amostra de 300 µL de GEB, diminuir o volume de Binding Buffer para 100 µL e eluir o DNA com 100 µL do tampão recomendado.**

8.3. Cuidados no armazenamento e manuseio do DNA extraído

- O DNA extraído deve ser armazenado entre -30°C 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 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 da amostra à mistura de reação, para evitar que haja contaminação cruzada entre as amostras.

9. DESCRIÇÃO DO PRODUTO



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

- 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 460 μL ;
- 01 tubo de controle positivo (CP) contendo 90 μL ;
- 01 tubo de controle negativo (CN) contendo 60 μL .

9.1. Materiais necessários não fornecidos com o produto

Para a realização dos testes, os seguintes materiais devem ser providenciados pelo usuário:

- Consumíveis e materiais para coleta e armazenamento da amostra primária;
- Solução de Guanidina (cloreto de guanidina 6 M contendo EDTA 0,2 M e com pH 8,0) - quando aplicável;
- Kit de extração de DNA (Kit *DNA High Pure PCR Template Preparation* da Roche Life Sciences);
- Banho de gelo ou estante refrigerada para microtubos de 1,5 ou 2,0 mL;
- Centrífuga para microtubos de 1,5 a 2,0 mL;
- Centrífuga para placas de 96 posições;
- Cabine do tipo PCR *Workstation*;
- Agitador tipo vortex;
- Equipamento de PCR em tempo real;
- Adesivo óptico;
- Adesivo não-óptico;
- Caneta para marcação permanente em plástico;
- Placa de PCR (96 poços);
- Etanol Absoluto (para biologia molecular);
- Isopropanol;
- Pipetas sorológicas e pipetadores;
- Micropipetas de precisão;
- Ponteiras esterilizadas livre de RNAses e DNAses, com filtro;
- Microtubos de 1,5 ou 2,0 mL, estéreis e livres de nucleases;
- Equipamentos de proteção individual (luvas descartáveis sem pó, máscara, toucas, jalecos, protetores de barba, óculos de segurança);
- Suporte/estante para microtubos de 1,5 a 2,0 mL;
- Recipientes para descarte de resíduos.

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 descongelamentos, após os quais eventuais sobras de reagentes devem ser descartadas.

As diluições dos componentes Controle Positivo e IAC 20x devem ser consumidas em sua totalidade, eventuais sobras das diluições destes componentes devem ser descartadas.

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

11. PROCEDIMENTOS A SEREM REALIZADOS ANTES DA UTILIZAÇÃO DO PRODUTO

Para a utilização com o Kit IBMP Biomol Chagas, 5 μL do Controle Interno de Amplificação (IAC 20x), fornecido no kit, devem ser adicionados à amostra primária antes da extração.

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 talco 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 uma duplicata de Controle Positivo 1000 cópias/ μL , uma duplicata de Controle Positivo 10 cópias/ μL , uma duplicata de Controle Interno de Amplificação (IAC 1x) e uma duplicata de Controle Negativo;
- Elaborar o mapa da placa de reação, identificando os poços a serem utilizados e a posição de aplicação de cada amostra, dos Controle Positivos, do IAC 1x e do Controle Negativo;
- Calcular, conforme os volumes apresentados na Tabela 1, os volumes necessários para a realização da corrida;
- Na 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;

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

Tabela 1 - Preparo da mistura de reação do Kit IBMP Biomol Chagas.

Componente	Volume para uma reação
Água RNase Free	4 μL
Oligomix Chagas 20X	1 μL
Mix Biomol Chagas 2X	10 μL

- 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 e transferir até a área de manipulação de amostras de ácidos nucleicos.

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:

- Em área física apropriada para manipulação de ácidos nucleicos, 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 e centrifugar brevemente;
- Utilizando uma micropipeta, transferir 5 μL do Controle Positivo fornecido, para o tubo identificado como "100 cópias/ μL ";
- Agitar o tubo "100 cópias/ μL " em vortex e centrifugar brevemente;
- Transferir 5 μL do tubo "100 cópias/ μL " para o tubo identificado como "10 cópias/ μL ". Agitar o tubo em vortex e centrifugar brevemente.
- As diluições deverão ser mantidas em gelo até o momento de utilização.
- Eventuais sobras do Controle Positivo 100 e 10 cópias/ μL devem ser descartadas.

13.3. Diluição do Controle Interno de Amplificação 20x

O Controle Interno de Amplificação é fornecido na concentração de 20x e deve ser utilizado diretamente nas amostras antes da extração, de acordo com o item 8.2 desta Instrução de Uso.



Como parâmetro de análise de qualidade, dois poços da placa deverão ser preparados com IAC 1x como controle da reação do IAC.

O IAC 20x deverá ser diluído no momento do uso para a concentração 1x em água (Água RNase free fornecida com o kit), seguindo as orientações a seguir:

- Em área física apropriada para manipulação de ácidos nucleicos, identificar um microtubo de 1,5 ou 2,0 mL como "IAC 1x";
- Adicionar 19 μ L da água fornecida no tubo;
- Homogeneizar o tubo fornecido, agitar em vortex por aproximadamente 15 segundos e centrifugar por cerca de 5 segundos;
- Utilizando uma micropipeta, transferir 1 μ L do Controle Interno de Amplificação, para o tubo identificado como "IAC 1x";
- A diluição obtida deverá ser mantida em gelo até o momento de utilização;
- Eventuais sobras do IAC 1x devem ser descartadas.

13.4. Adição de amostras e controles

- Em área física apropriada e seguindo o mapa da placa de reação, adicionar 5 μ L de cada amostra de DNA extraído nos poços correspondentes na placa de reação;
- Adicionar 5 μ L do Controle Positivo 1000 cópias/ μ L em duplicata nos poços correspondentes na placa de reação;
- Adicionar 5 μ L do Controle Positivo 10 cópias/ μ L em duplicata nos poços correspondentes na placa de reação;
- Adicionar 5 μ L do IAC 1x em duplicata nos poços correspondentes na placa de reação;
- Adicionar 5 μ L do Controle Negativo em duplicata nos poços correspondentes na placa de reação;
- Selar a placa de reação com adesivo óptico;
- Centrifugar a placa brevemente (*spin*).

13.5. 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 negativo e do controle positivo;
 - Configurar as fluorescências para cada canal conforme Tabela 2;
- Tabela 2 - Alvos e fluorescências/canais a serem configurados para a análise.

Target Name	Reporter	Quencher
<i>T. cruzi</i>	FAM	NFQ-MGB
IAC	HEX (VIC)	NFQ-MGB

- Configurar os parâmetros de ciclagem da reação conforme Tabela 3;

Tabela 3 - Parâmetros de termociclagem para o Kit IBMP Biomol Chagas.

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 para captura de fluorescência.

- Selecionar a referência passiva do equipamento como ROX;
- 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.

Tabela 4 - Parâmetros analíticos a serem utilizados.

Equipamento	Target	Threshold	Baseline
7500 Real-Time PCR System (Thermo Fisher)	<i>T. cruzi</i>	0,2	AUTO
	IAC	0,02	AUTO

14.2. Interpretação dos resultados

- Para que uma corrida seja considerada válida, o Controle Positivo (CP) de 1000 cópias/ μ L deve apresentar amplificação somente para o alvo *T. cruzi*, apresentando $Ct \leq 30$ e o CP de 10 cópias/ μ L deve apresentar amplificação para o alvo *T. cruzi*, apresentando $Ct \leq 40$;
- Para que uma corrida seja considerada válida, o poço de IAC 1x deve apresentar amplificação somente para IAC com Ct entre 17,8 e 24,3 ($17,8 < Ct \leq 24,3$);
- Para que uma corrida seja considerada válida, o Controle Negativo (CN) não deve apresentar amplificação para nenhum dos alvos (*T. cruzi* e IAC);
- Para que uma amostra seja considerada negativa, não deve apresentar amplificação do alvo *T. cruzi* e deve apresentar amplificação do alvo IAC no canal VIC;
- Para que uma amostra seja considerada positiva, deve apresentar amplificação com curva de perfil típico para o alvo *T. cruzi*, com Ct entre 17 e 45 ($17 < Ct \leq 45$), com amplificação concomitante do alvo IAC no canal VIC, inclusive

para os casos em que apenas 1 reação dentro das replicatas apresente amplificação;

- Amostras extraídas simultaneamente devem apresentar Ct para o IAC com desvio de ± 1 Ct dentro do conjunto. Caso alguma amostra se apresente fora dessa especificação, deve ser reprocessada.

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

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

Amostra		CP	CN	IAC	Resultado
<i>T. cruzi</i>	IAC				
+	+	+	-	+	Detectável para <i>T. cruzi</i>
-	+	+	-	+	Não detectável para <i>T. cruzi</i>
+/-	-	+	-	+	Amostra inválida
+/-	+/-	+/-	+	+/-	Ensaio inválido
+/-	+/-	-	+/-	+/-	Ensaio inválido
+/-	+/-	+/-	+/-	-	Ensaio inválido

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

- 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 IBMP Biomol Chagas apresentou reação positiva na presença de DNA extraído de células de *Toxoplasma gondii* cultivadas *in vitro*, porém com resultados não lineares ao longo de diluições seriadas do mesmo DNA;
- 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 nestas Instruções de Uso);

- Amostras de DNA total extraído de sangue ou mistura de sangue total com Solução de Guanidina podem ser utilizadas com o Kit IBMP Biomol Chagas. O uso de outras matrizes biológicas não foi validado com o kit;

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

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. Estes dados foram obtidos de uma coorte específica e serão revisados à medida em que dados de utilização em centros de referência sejam coletados e analisados.

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 falsos-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 falsos-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 Chagas. Amostras coletadas e armazenadas em desacordo com o preconizado no item 8 desta Instrução de Uso podem gerar resultados falsos-negativos;

- Os parâmetros de desempenho apresentados nessa Instrução de Uso são aplicáveis para a análise de amostras de DNA total extraído de sangue ou mistura de sangue total com Solução de Guanidina. O uso de DNA extraído de outras matrizes biológicas não foi validado para o Kit IBMP Biomol Chagas;

- O produto pode ser utilizado com o equipamento constante no item 7 dessa Instrução de Uso.