

1. NOME COMERCIAL

KIT BIOMOL TRACOMA

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 - PARANA - 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

Embalagem contendo 2 x 5 tubos com os reagentes necessários para a reação de PCR em tempo real e os devidos controles, em quantidade suficiente para 32 reações.

4. FINALIDADE

Teste molecular para detecção qualitativa (presença ou ausência) da bactéria *Chlamydia trachomatis* em amostras de swab ocular através da técnica de PCR em tempo real.

PRODUTO DESTINADO PARA DIAGNÓSTICO *IN VITRO*

5. USO PRETENDIDO

O teste deve ser realizado por profissionais da área de saúde com conhecimento específico em biologia molecular.

6. COMPOSIÇÃO

O Kit Biomol Tracoma é composto por:

- 02 microtubos contendo 150 µL de Água RNase Free;
- 02 microtubos contendo 150 µL de Mistura de PCR;
- 02 microtubos contendo 30 µL de OligoMix;
- 02 microtubos contendo 15 µL de Controle Negativo;
- 02 microtubos contendo 15 µL de Controle Positivo.

7. MATERIAIS NECESSÁRIOS NÃO FORNECIDOS COM O PRODUTO

- Equipamento de proteção individual (jaleco, máscara descartável, óculos de segurança, luvas sem pó descartáveis);
- Tubos para diluição e armazenamento de amostras;
- Microtubos de 1,5 ou 2,0 mL para o preparo da reação;
- Micropipetas de precisão (0,5-10 µL; 2,0-20 µL; 10-100 µL e 100-1000 µL);
- Placas de 96 poços para Real-Time PCR;
- Adesivos ópticos para Real-Time PCR;
- Kit para extração de ácidos nucleicos;
- Material para coleta de amostra (*swab*);
- Etanol absoluto;
- Cabine de segurança biológica;
- Centrífuga para microtubos;
- Centrífuga para microplacas;

- Agitador tipo vórtex;
- 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems).

8. DESCRIÇÃO DO PRINCÍPIO DE AÇÃO

O Kit Biomol Tracoma utiliza a técnica de PCR em Tempo Real (PCR - Reação em Cadeia pela Polimerase). A reação de PCR em Tempo Real permite a detecção de sequências específicas em uma amostra de DNA extraído a partir da captura de intensidade de fluorescência, durante o andamento da reação.

O Kit Biomol Tracoma permite a detecção da bactéria *Chlamydia trachomatis* além do Controle Interno (CI) da reação. A detecção da presença de ácidos nucleicos do patógeno e do Controle Interno é feita pelo uso de sondas (oligonucleotídeos marcados com fluorescência) específicas para cada alvo molecular. O teste é realizado em uma única reação, utilizando um conjunto de sondas, uma para o alvo molecular Tracoma, marcada com FAM e outra para Controle Interno, marcada com HEX (mesmo comprimento do Fluoróforo VIC). A amplificação do Controle Interno (HEX/VIC) indica o funcionamento adequado da reação (reagentes e operador) e a qualidade do DNA extraído. Em resultados negativos, apenas o Controle Interno é detectado. Em caso de não amplificação do CI, a amostra deve ser testada novamente.

Já a amplificação para os dois alvos moleculares (patógeno e CI) indica a presença de DNA bacteriano na amostra.

Esse Kit foi desenvolvido para a realização de análises de perfil qualitativo, ou seja, avalia apenas a presença ou ausência do alvo molecular.

9. CARACTERÍSTICA DE DESEMPENHO

O Kit Biomol Tracoma apresentou sensibilidade de 100% e especificidade de 95% frente a 50 amostras clínicas validadas por metodologia analiticamente compatível.

Especificidade Analítica

- Os perfis de amplificação foram analisados conforme as instruções de uso do kit. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram amplificação do alvo bacteriano e do controle interno. Foram consideradas negativas as amostras que apresentam amplificação somente do controle interno.
- Das 35 espécies avaliadas, somente uma cepa de *Burkholderia cepacea* das duas testadas apresentou amplificação (1 replicata detectada de duas testadas, com Ct de 39). Esta espécie não é conhecida por colonizar as mucosas oculares. Além disto, como a amplificação foi pouco robusta, com um Ct alto e em somente uma replicata de apenas uma cepa, consideramos que não seja uma reação cruzada relevante,
- Não houve presença de amplificação do alvo CRYP (Tracoma). Isso indica que não houve interferência das amostras empregadas nesse estudo, que pudesse gerar uma identificação equivocada para o alvo CRYP (Tracoma). Para o controle negativo não houve presença de amplificação nem do alvo CRYP nem do controle interno-1852. Para os controles positivos verifica-se a presença de amplificação dos dois alvos, também atendendo aos critérios de aceitação estabelecidos.

Sensibilidade Analítica

- O limite de detecção do teste (com confiança de 95%) é de 2,84 genoma-equivalentes/reação ou 10 cópias/µL para alvo CRYP (Tracoma).

10. CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE DO PRODUTO

O transporte do Módulo de Amplificação Kit Biomol Tracoma deve ser realizado em gelo seco (aproximadamente -80 °C) e o armazenamento deve ser feito entre -30 °C e -15 °C. Sugere-se que quando não utilizado em sua totalidade, o módulo de amplificação Kit Biomol Tracoma seja usado até dois (02) descongelamentos.

11. PRECAUÇÕES, CUIDADOS ESPECIAIS E RISCOS RELACIONADOS AO PRODUTO

- Utilizar equipamentos de proteção individual (EPI), tais como jaleco, luvas descartáveis sem pó e máscara cirúrgica durante o uso deste produto;
- Não utilizar reagentes vencidos;
- A temperatura do ambiente indicada para manipulação deste produto é entre 15 °C e 25 °C;
- As reações possuem, como alvo de detecção, um Controle Interno humano, sendo assim, é necessário manipular o produto com as precauções devidas para evitar contaminações das reações com material genético dos operadores. Medidas como realizar a limpeza adequada do ambiente, bancadas e dos equipamentos onde o produto será manipulado, além do uso de tubos e plásticos estéreis,
- RNase/DNase *Free* e descartáveis, bem como, utilização de EPIs como luvas e máscaras reduzem o risco de contaminação do produto com material genético não oriundo da amostra;
- O Controle Positivo deve ser tratado como uma amostra positiva. Embora não apresente risco de contaminação para humanos, este produto deve ser manipulado com extremo cuidado para que não ocorra contaminação de amostras manipuladas em paralelo, evitando assim, resultado falso positivo;
- Para reduzir o risco de contaminação de reagentes, amostras e reações, recomenda-se realizar os processos de extração de ácidos nucleicos, preparo de reações e PCR em áreas distintas;
- A etapa de extração de DNA é de extrema importância para a eficiência da reação, portanto, é imprescindível seguir as instruções do fabricante do Kit de extração;
- Ao término da reação evitar abrir as placas, para reduzir risco de contaminação do ambiente com produtos de PCR;
- Realizar a manipulação de reagentes e amostras em cabines de segurança biológica;
- Evitar congelar e descongelar os reagentes repetidamente;
- 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;
- Esse produto deve ser manipulado por profissionais de acordo com estas instruções de uso e utilizando equipamentos de medição calibrados;
- A coleta das amostras de *swab* ocular deve ser realizada com kit apropriado e armazenadas de acordo com instruções do fabricante e atendendo aos protocolos estabelecidos pelo Ministério da Saúde.

12. PROCEDIMENTOS PARA O USO DO PRODUTO

Importante: Descongelar os reagentes e centrifugá-los. Manter os reagentes a temperatura ambiente por até 2h, ou em gelo se o procedimento durar mais tempo.

12.1. PREPARO DA MISTURA DE REAÇÃO

O Kit contém os reagentes necessários para 32 determinações incluindo Controles Negativo e Positivo.

12.1.1. Identificar um tubo de 1,5 ou 2,0 mL para o preparo da reação. É necessário preparar um volume suficiente para no mínimo 18 reações. Adicionar no tubo, devidamente identificado, os volumes conforme tabela abaixo:

REAGENTE	VOLUME (µL) - 1 reação	VOLUME (µL) - 18 reações
Mistura de PCR	6,7	120,6
OligoMix	1	18
Água RNase <i>Free</i>	7,3	131,4
TOTAL	15	270

12.1.2. Misturar os reagentes por inversão. Após o preparo das misturas de reação centrifugar os tubos e distribuir **15,0 µL** do mix de reação em cada poço da placa, conforme o esquema sugerido abaixo na figura 1.

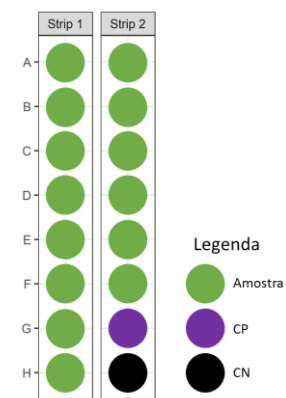


Figura 1 - Representação esquemática da organização das amostras e controles nos poços dos strips de 8 tubos. Poços verdes representam amostras. CP - Controle Positivo. CN - Controle Negativo.

12.1.3. Se necessário, aplicar adesivo selante (não-óptico) para vedar os poços durante transferência da placa para a sala de aplicação de amostras.

12.2. APLICAÇÃO AS AMOSTRAS E CONTROLES

12.2.1. Adicionar **5,0 µL** do DNA de amostra de pacientes previamente extraídas em cada poço, de acordo com disposição nos tubos previamente planejada;

12.2.2. Para o Controle Positivo, adicionar **5,0 µL** do Controle Positivo fornecido com o kit aos poços correspondentes, conforme desenho esquemático (item 11.1.2);

12.2.3. Para o Controle Negativo, adicionar **5,0 µL** do Controle Negativo fornecido nos poços correspondentes, conforme desenho esquemático;

12.2.4. Fechar os tubos com as tampas ópticas adequadas para qPCR.

12.3. PCR EM TEMPO REAL

12.3.1. Ligar o equipamento 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems) e seu computador;

12.3.2. Abrir o programa (7500 *software*) e fazer o login utilizando as credenciais apropriadas;

12.3.3. Inserir os strips no equipamento com as posições dos poços dispostas como no desenho esquemático apresentado anteriormente. Certificar-se de que o suporte da gaveta é apropriado para tubos (não para placas);

- 12.3.4. Na tela inicial do programa, selecionar **New Experiment**;
12.3.5. Na tela que é mostrada, no menu **Setup**, submenu **Experiment Properties**, inserir o nome do experimento em **“Experiment Name”**, seguindo o descrito a seguir:

Selecionar **7500 (96 Wells)** em **“Which instrument are you using to run the experiment?”**;
Selecionar **Quantitation - Standard Curve** em **“What type of experiment do you want to set up?”**;
Selecionar **Taqman® Reagents** em **“Which reagents do you want to use to detect the target sequence?”**;
Selecionar **Standard (~2 hours to complete a run)** em **“Which ramp speed do you want to use in the**

12.3.6. Assinalar a amostra aos poços correspondentes clicando nas caixas de seleção no grupo **Assign sample(s) to the selected wells**;

12.3.7. Marcar poços contendo CN como “NTC”, clicando no botão N no grupo **Assign target(s) to selected wells**

12.3.8. Selecionar **ROX** em **Select the dye to use as the passive reference**;

12.3.9. No submenu **Run Method**, aba **Graphical View**, alterar o volume de reação para 20 µL em **Reaction Volume Per Well**;

12.3.10. Alterar o número de ciclos para **45** em **Number of Cycles**. No gráfico, alterar a temperatura e o tempo de cada estágio, para os seguintes valores:

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo
<i> Holding Stage </i>	95	10:00
<i> Cycling Stage </i>	95	00:15
	60*	01:00

*Captura de fluorescência (Data Collection On).

12.3.11. No menu **Run**, clicar em **START RUN**. Uma janela será aberta e o usuário deverá digitar o nome do arquivo da corrida que será salvo em formato “.eds”.

13. ANÁLISE DOS RESULTADOS

No menu **Analysis**, selecionar **Analysis Setting**. Uma janela de configurações de análise abrirá (conforme figura 8). Nessa janela, na aba **Ct settings**, desafixar os itens **Use Default Settings**, **Automatic Threshold** e **Automatic Baseline** para cada alvo e inserir os valores conforme tabela a seguir. Clicar em **Apply Analysis Settings** e, em seguida, **Reanalyze**

Target	Threshold	Baseline Start	Baseline End
Tracoma	0,3	AUTO	AUTO
CI	0,2	AUTO	AUTO

13.1 Interpretação dos Resultados

Para que os resultados obtidos sejam válidos, os seguintes critérios devem ser obtidos na análise dos resultados:

Controle Negativo (CN):

- Não deve apresentar amplificação (ultrapassar o threshold) no canal FAM ou HEX/VIC;

Controle Positivo (CP) - 10⁴ cópias/µL:

- Deve apresentar amplificação no canal FAM, Ct entre 22,2 e 27,8;

- Deve apresentar amplificação no canal HEX/VIC, Ct entre 23,9 e 29,1.

Amostras:

Os seguintes valores de *Cycle threshold* (Ct) podem ser usados para a determinação qualitativa dos resultados:

RESULTADO	Ct
POSITIVO	TRACOMA: entre 17 e 39 CI: entre 13 e 38
INDETERMINADO	TRACOMA: Ct ≥ 39 CI: Ct ≥ 38
NEGATIVO	TRACOMA: ausência de amplificação CI: entre 13 e 38

- Excesso de ruído ou sinal de fluorescência muito baixo nos gráficos de amplificação indicam que pode ter ocorrido degradação do DNA da amostra. A ausência de amplificação do controle interno da reação pode indicar um problema no processo de extração, recomenda-se repetir o processo e testá-la novamente;
- A falta de sinal de amplificação também pode ser causada por ausência de amostra no poço, recomenda-se repetir o teste certificando-se que a amostra foi adicionada;
- Excesso de DNA na reação pode inibir a amplificação do Controle Interno, recomenda-se fazer uma diluição da amostra (1:10 e/ou 1:100) e realizar uma nova amplificação.

14 TERMOS E CONDIÇÕES DE GARANTIA DA QUALIDADE DO PRODUTO

- O produto deve ser utilizado dentro do prazo da validade determinado pelo fabricante;
- O Kit Biomol Tracoma foi validado usando kit de coleta de amostras **“Female Swab Specimen Collection Kit”** e kit para extração de DNA **“QIAamp DNA Blood”**, seguindo estritamente os protocolos recomendados pelos respectivos fabricantes;
- O fabricante não se responsabiliza pelos resultados obtidos, caso o usuário não siga corretamente as instruções de uso e 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;
- Para o kit de extração de ácidos nucleicos, seguir corretamente as instruções conforme indicado pelo fabricante;
- Para o kit coletor, seguir corretamente os protocolos recomendados pelo Ministério da Saúde.