

Instrução de Uso - Kit IBMP Biomol Rickettsiose

IU-IVD-018

Revisão 06 | 01/08/2024



1. NOME COMERCIAL

Kit IBMP Biomol Rickettsiose.

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 48 determinações.

4. FINALIDADE

Este produto se destina à detecção qualitativa (presença/ausência) do material genético de *Rickettsia rickettsii* e outras bactérias do gênero *Rickettsia* spp. extraído de amostras de sangue, soro ou coágulo de pacientes com suspeita de Febre Maculosa Brasileira (FMB).

O resultado obtido pode ser utilizado em conjunto com os dados clínicos e epidemiológicos do paciente para auxiliar o diagnóstico da Febre Maculosa Brasileira (FMB).

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 Rickettsiose 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 patógeno em DNA extraído de amostras de sangue, soro ou coágulo, a partir da avaliação da intensidade de fluorescência capturada ao final de cada ciclo da PCR.

O Kit IBMP Biomol Rickettsiose permite a identificação de *Rickettsia rickettsii* e outras bactérias do gênero *Rickettsia* spp., através da detecção dos alvos moleculares RRI6 e

PanR8, respectivamente, além de um Controle Interno (CI) endógeno (RNaseP). A detecção da presença de ácidos nucleicos de *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia* spp. 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.

O teste é realizado através do preparo de duas misturas de reação para qPCR multiplex que permitem a detecção dos patógenos. Na reação 1, são pesquisados os alvos PanR8 (*Rickettsia* spp.) e RNaseP (CI). Na reação 2, são pesquisados os alvos RRI6 (*Rickettsia rickettsii*) e RNaseP (CI).

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.

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.

Esse Kit foi desenvolvido para a realização de análises de perfil qualitativo, ou seja, avalia apenas a presença ou ausência de cada alvo molecular. O produto não é validado para análise quantitativa.

Produto validado para uso com os seguintes termocicladores: 7500 Fast e 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

8. TIPO DE AMOSTRAS OU MATRIZES APLICÁVEIS

Amostras de DNA extraído de sangue, soro ou coágulo de pacientes.

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

As amostras devem ser coletadas conforme métodos de rotina.

Após a coleta, as amostras devem ser transportadas e permanecer armazenadas entre 2°C a 8°C por até 24 horas. Após esse período, as amostras devem ser armazenadas em freezer 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 resultem 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 em freezer 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 dentre as amostras.

9. DESCRIÇÃO DO PRODUTO

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

- 01 microtubo de Mistura de PCR contendo 1100 µL.
- 01 microtubo de Oligomix RRI6 contendo 270 µL.
- 01 microtubo de Oligomix PanR8 contendo 270 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 tipo PCR *Workstation*.
- Caneta para marcação permanente em plástico.
- Centrífuga para microtubos de 1,5 a 2,0mL.
- Centrífuga para placa 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, toucas, luvas sem pó descartáveis, protetores de barba, óculos de segurança).
- Kit de extração de DNA.
- Micropipetas de precisão (0,5 a 10 µL, 10 a 100 µL e 100 a 1000 µL).
- Microtubos de 1,5 ou 2,0 mL estéreis e livres de nucleases.
- Placa de PCR (96 poços).
- Ponteiras livres de RNase e DNase com filtro (0,5 a 10 µL, 10 a 100 µL, 100 a 1000 µL).
- Recipientes para descarte de resíduos.
- Suporte/estante para tubos de 1,5 ou 2,0 mL.

Instrução de Uso - Kit IBMP Biomol Rickettsiose

IU-IVD-018

Revisão 06 | 01/08/2024



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, luvas em 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 para cada uma das misturas de reação (PanR8 e RRI6) 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 o preparo das misturas de reação RRI6 e PanR8 do Kit IBMP Biomol Rickettsiose.

Componente	Volume para uma reação
Mistura de PCR	10 µL
Oligomix RRI6 ou PanR8	5 µL
TOTAL	15 µL

- Em área física apropriada, identificar um microtubo de 1,5 ou 2,0 mL para o preparo da mistura de reação RRI6 e outro microtubo para o preparo da mistura de reação PanR8.
- Adicionar aos microtubos, devidamente identificados, os componentes e volumes listados na Tabela 1 respectivos para cada um dos alvos (RRI6 e PanR8), ajustados 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 RRI6 em cada poço de uma placa de PCR de 96 poços, seguindo o mapa da placa de reação.
- Distribuir 15 µL da mistura de reação PanR8 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 de reação, adicionar 5 µL de cada amostra de DNA extraído nos poços correspondentes de cada mistura (RRI6 e PanR8).
- Adicionar 5 µL do Controle Positivo (CP) no poço correspondente de cada mistura (RRI6 e PanR8) na placa de reação.
- Adicionar 5 µL de Controle Negativo (CN) no poço correspondente de cada mistura (RRI6 e PanR8) na placa de reação.
- Selar a placa de reação com adesivo ótico.
- 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 controle negativo.
- Configurar as fluorescências para cada canal conforme Tabela 2.

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

Alvo	Fluoróforo repórter	Quencher
RRI6	HEX/VIC	NONE
PanR8	FAM	NONE
RNaseP	Cy5	NONE

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

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

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

*Estágio para captura de fluorescência.

- Selecionar a referência passiva ou interna 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 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 os diferentes termocicladores.

Equipamentos	Alvo	Threshold	Baseline
7500 Fast e 7500 Real-Time PCR System	PanR8	0,1	AUTO
	RRI6	0,02	AUTO
	RNaseP	0,02	AUTO

14.2. Interpretação dos resultados

- Para que uma corrida seja considerada válida, os poços de Controle Positivo (CP) devem apresentar amplificação para os três alvos avaliados: PanR8, RRI6 e Controle Interno, apresentando Ct ≤ 30.
 - Para que uma corrida seja considerada válida, os poços de Controle Negativo (CN) não devem apresentar amplificação para os alvos PanR8 e RRI6, e não devem apresentar amplificação do Controle Interno com Ct < 33.
 - Para que uma amostra seja considerada negativa, não deve apresentar amplificação nos alvos PanR8 e RRI6 e deve apresentar amplificação no Controle Interno.
 - Para que uma amostra seja considerada positiva, deve apresentar amplificação com perfil típico para os alvos PanR8 e/ou RRI6 e 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 Rickettsiose.

Amostra		CP	CN	Resultado
Mistura PanR8	Mistura RRI6			

Instrução de Uso - Kit IBMP Biomol Rickettsiose

IU-IVD-018

Revisão 06 | 01/08/2024



PanR8	CI	RRi6	CI			
+/-	+	+	+	+	-	<i>Rickettsia rickettsii</i> detectável
+	+	-	+	+	-	<i>Rickettsia</i> spp. detectável
-	+	-	+	+	-	Não detectável
+/-	-	+/-	-	+	-	Amostra inválida
+/-	+/-	+/-	+/-	-	-	Ensaio inválido
+/-	+/-	+/-	+/-	+	+	Ensaio inválido

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

- Caso a amostra tenha resultado inválido, repetir a extração e PCR da amostra.
- Caso o Controle Positivo não amplifique nos alvos esperados, repetir o teste.
- Caso exista amplificação dos alvos no Controle Negativo repetir o teste.

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 DNA extraído de sangue, soro ou coágulo de pacientes podem ser utilizadas com o Kit IBMP Biomol Rickettsiose. O uso de outras matrizes biológicas não foi validado com o Kit IBMP Biomol Rickettsiose.
- Os resultados obtidos com o Kit IBMP Biomol Rickettsiose devem ser interpretados em conjunto com informações clínicas, epidemiológicas e laboratoriais do paciente. Um resultado "Não detectável" não exclui a possibilidade de infecção por *Rickettsia rickettsii* ou outras bactérias do gênero *Rickettsia* spp.
- Este teste pode ser utilizado como ferramenta auxiliar de diagnóstico somente na fase aguda da doença. Não há um intervalo de tempo definido para a efetividade do teste baseado em PCR. O tratamento com antibióticos pode reduzir a sensibilidade deste teste.

16. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

16.1. Sensibilidade analítica

Para determinação do limite mínimo de detecção foram testadas 8 diluições de DNA sintético. Os dados foram

ajustados ao modelo Probit para determinar a diluição na qual se espera obter detecções em 95% das replicatas. Os dados baseiam-se em amostras com resultado detectado (amplificação) e não detectado (não amplificação) para os alvos PanR8/RNaseP e RRI6/RNaseP. O limite mínimo de detecção do kit IBMP Biomol Rickettsiose, com confiança de 95% é de 206,5 cópias/reacção para bactérias do gênero *Rickettsia* spp. (PanR8) e 21,8 cópias/reacção para *Rickettsia rickettsii* (RRI6).

16.2. Especificidade analítica

O kit não apresentou detecção cruzada frente a análise de 140 amostras conhecida positivamente para Bartonelose, Febre Q e Coxiella.

16.3. Precisão

Para a definição da precisão de medição foram testadas diluições seriadas do DNA sintético, com o objetivo de calcular a repetibilidade e reprodutibilidade para cada alvo. Os valores de desvio padrão relativo da repetibilidade e reprodutibilidade do Kit IBMP Biomol Rickettsiose foram menores que 25% e considerados satisfatórios.

16.4. Desempenho Diagnóstico

O desempenho diagnóstico do teste foi determinado através da análise de um painel de 198 amostras clínicas (DNA extraído de soro ou coágulo de pacientes) previamente caracterizadas em laboratório de referência. Os resultados estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6. Desempenho diagnóstico do Kit IBMP Biomol Rickettsiose.

		Método de referência		
		Detectável	Não detectável	TOTAL
Kit IBMP Biomol Rickettsiose	Detectável	53	3	56
	Não detectável	5	137	142
	TOTAL	58	140	198

O teste apresenta sensibilidade diagnóstica de 91,4% (CI95 81,0% – 97,1%), especificidade diagnóstica de 97,9% (CI 93,9% – 99,6%), valor preditivo positivo de 94,6% (CI 85,2% – 98,2%) e valor preditivo negativo de 96,5% (CI95 92,2% – 98,5%) para detecção *Rickettsia rickettsii*.

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

- 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 ou 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 Rickettsiose. Amostras coletadas e armazenadas em desacordo com o preconizado nesta Instrução de Uso podem gerar resultados falsos.

- Os parâmetros de desempenho apresentados nessa Instrução de Uso são aplicáveis para a análise de amostras de DNA obtidas de amostras de sangue, soro ou coágulo de pacientes. O uso de DNA extraído de outras matrizes biológicas não foi validado para Kit IBMP Biomol Rickettsiose.

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