



1. NOME COMERCIAL

Kit IBMP 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 – 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 32 determinações.

4. FINALIDADE

Este produto se destina à detecção qualitativa (presença/ausência) do material genético da bactéria *Chlamydia trachomatis*, extraído de amostras de esfregaço conjuntival (*swab* ocular) obtidas de pacientes com suspeita de tracoma.

O resultado obtido pode ser utilizado em conjunto com os dados clínicos e epidemiológicos do paciente, para auxiliar o diagnóstico de tracoma.

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 Tracoma utiliza a técnica de 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 *swab* ocular, a partir da avaliação da intensidade de fluorescência capturada ao final de cada ciclo da PCR.

O Kit IBMP Biomol Tracoma permite a detecção da bactéria *Chlamydia trachomatis*, através da detecção do alvo molecular CRYP, além de um Controle Interno (CI) endógeno. A detecção da presença de ácidos nucleicos do patógeno 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 resultado não detectável 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 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 System (Applied Biosystems).

8. TIPO DE AMOSTRAS OU MATRIZES APLICÁVEIS

Amostras de DNA extraído de esfregaço conjuntival coletado com kit contendo *swab* estéril de nylon e meio de conservação compatível com amostras de citologia cervical.

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

A coleta por esfregaço conjuntival deve ser feita por profissional da área da saúde treinado e através da utilização de kit de coleta para citologia em meio líquido contendo *swab* estéril de nylon com haste flexível e tubo com meio de preservação compatível com biologia molecular.

A coleta deve ser feita em cada olho individualmente e o *swab* deve ser retornado imediatamente ao tubo com meio de preservação.

O transporte e armazenamento da amostra coletada deve ser feito segundo as orientações do fabricante do kit de coleta.

De modo geral, após a coleta, as amostras devem ser transportadas vedadas e podem permanecer armazenadas em temperatura ambiente por até duas semanas. Após esse

período, as amostras devem ser armazenadas entre 2°C e 8°C por mais uma semana, ou por até três meses, se mantidas 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 a temperatura de -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 à mistura de reação, para evitar que haja contaminação cruzada entre as amostras.

9. DESCRIÇÃO DO PRODUTO

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

- 02 microtubos de Mistura de PCR contendo 150 µL;
- 02 microtubos de Oligomix contendo 30 µL;
- 02 microtubos de Água RNase Free contendo 150 µL;
- 02 microtubos de Controle Positivo (CP) contendo 15 µL;
- 02 microtubos de Controle Negativo (CN) contendo 15 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 poços;
- 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 livres 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 2 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 Tracoma.

Componente	Volume para uma reação
Mistura de PCR	6,7 µL
Oligomix	1 µL
Água Rnase Free	7,3 µL
Total	15 µL

- 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;
- 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 de 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 Tabela 2;

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

Alvo	Fluoróforo repórter	Quencher
Tracoma	FAM	NONE

Alvo	Fluoróforo repórter	Quencher
CI	VIC/HEX	NONE

- Selecionar a referência passiva do equipamento como ROX;
- Configurar os parâmetros de termociclagem da reação conforme Tabela 3;

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

Etapas	Temperatura (°C)	Tempo	Número de ciclos
Estágio 1	95	10 minutos	01
Estágio 2	95	15 segundos	45
	60*	60 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.

Equipamento	Alvo	Threshold	Baseline
7500 Real-Time PCR System	Tracoma	0,3	Automático
	CI	0,2	Automático

14.2. Interpretação dos resultados

- Para que uma corrida seja considerada válida, o Controle Positivo (CP) deve apresentar amplificação para o alvo Tracoma ($22,2 < Ct < 27,8$) e para o alvo CI ($23,9 < Ct < 29,1$);
- Para que uma corrida seja considerada válida, o Controle Negativo (CN) não deve apresentar amplificação para nenhum alvo;
- Para que uma amostra seja considerada negativa, não deve apresentar amplificação no alvo Tracoma, e deve apresentar amplificação do CI ($13 < Ct < 38$);
- Para que uma amostra seja considerada positiva, deve apresentar amplificação com curva de perfil típico para o alvo Tracoma ($17 < Ct < 39$) e amplificação do CI ($13 < Ct < 38$); Os critérios para interpretação de resultados estão descritos na Tabela 5.



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

Amostra		CP	CN	Resultado
Tracoma	CI			
+	+	+	-	Tracoma detectável
-	+	+	-	Tracoma não detectável
+/-	-	+	-	Amostra inválida
+/-	+/-	-	+/-	Ensaio inválido
+/-	+/-	+/-	+	Ensaio inválido

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

– A ausência de amplificação do controle interno da reação pode indicar um problema no processo de extração e, nesses casos, recomenda-se testar a amostra novamente;
 – Excesso de DNA na reação pode inibir a amplificação do Controle Interno e, nesses casos, recomenda-se diluir a amostra (1:10 e/ou 1:100) e realizar uma nova amplificação.

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 esfregaço conjuntival coletado com kit para citologia em meio líquido podem ser utilizadas com o Kit IBMP Biomol Tracoma. O uso de outras matrizes biológicas não foi validado com o Kit IBMP Biomol Tracoma;
 – Os resultados obtidos com o Kit IBMP Biomol Tracoma devem ser interpretados em conjunto com informações clínicas, epidemiológicas e laboratoriais do paciente. Um resultado “Não detectável” não exclui a possibilidade de infecção por *Chlamydia trachomatis*.

16. CARACTERÍSTICA DE DESEMPENHO

16.1. Sensibilidade analítica

Para a determinação do limite mínimo de detecção, DNA extraído foi serialmente diluído, e cada diluição foi avaliada em triplicata com o Kit IBMP Biomol Tracoma. O limite mínimo de detecção do Kit IBMP Biomol Tracoma, com confiança de 95%, é de 2,84 genoma-equivalentes/reação ou 10 cópias/μL para o alvo CRYP (Tracoma).

16.2. Especificidade analítica

O kit não apresentou detecção cruzada frente a análise de amostras conhecidamente positivas para os seguintes

patógenos: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Burkholderia multivorans*, *Acinetobacter baumannii*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella oxytoca*, *Morganella morganii*, *Streptococcus pyogenes*, *Listeria monocytogenes*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Aspergillus fumigatus*, *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania guyanensis*, *Leishmania amazonenses*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania infantum*, *Bordetella pertussis* e *Bordetella parapertussis*.

O kit apresentou detecção cruzada frente a análise de amostras conhecidamente positivas para *Burkholderia cepacia* e *Burkholderia stabilis*. A detecção foi tardia (Ct > 39) e em somente uma das réplicas.

16.3. Precisão

Testes de repetibilidade e reprodutibilidade foram realizadas por três operadores distintos, através de dois experimentos independentes, os quais resultaram em coeficientes de variação inferiores a 10%.

16.4. Desempenho diagnóstico

O desempenho diagnóstico do teste foi determinado através da análise de 50 amostras clínicas de esfregaço conjuntival coletado com kit para citologia em meio líquido, previamente caracterizadas utilizando PCR em Tempo Real. Os resultados estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6. Desempenho diagnóstico do Kit IBMP Biomol Tracoma.

		Método de Referência		
		Detectável	Não detectável	TOTAL
Kit IBMP Biomol Tracoma	Detectável	29	1	30
	Não detectável	1	19	20
	TOTAL	30	20	50

O teste apresenta sensibilidade diagnóstica de 97% (IC95% ± 3,27%) e especificidade diagnóstica de 95% (IC95% ± 4,90%). O índice *kappa* calculado é de 92%.

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 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 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 Tracoma. 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 esfregaço conjuntival coletado com kit para citologia em meio líquido do tipo “Female Swab Specimen Collection Kit”. O uso de DNA extraído de outras matrizes biológicas não foi validado para o Kit IBMP Biomol Tracoma;

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