

1. NOME COMERCIAL

KIT NAT HANSENIASE

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

SAC 0800 400 4267 | +55 41 3165 4247

Horário de atendimento: segunda à sexta-feira, das 8:30 às 16:30 h (exceto feriados)

sac@ibmp.org.br | www.ibmp.org.br

3. APRESENTAÇÃO

O Kit NAT Hanseníase contém um módulo de amplificação suficiente para a detecção de 31 amostras em triplicata e controles de reação.

4. FINALIDADE E MODO DE USO

Este produto se destina à detecção qualitativa do material genético de *Mycobacterium leprae* em DNA total extraído de amostras de biópsia de pele ou nervo obtidas em serviços de diagnóstico de rotina ou vigilância epidemiológica, com o objetivo de auxiliar e/ou confirmar o diagnóstico clínico de Hanseníase.

PRODUTO PARA 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, em laboratórios com infraestrutura adequada para realização de testes moleculares

6. CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO OU MANUSEIO

O módulo de amplificação do Kit NAT Hanseníase deve ser transportado em gelo seco e armazenado entre -30 e -15°C. Este é um produto de uso único e não pode ser utilizado de forma fracionada. Sobras de reagentes devem ser descartadas.

7. PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO DO TESTE

O Kit NAT Hanseníase utiliza a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real, que permite a detecção de marcadores específicos do material genético de *Mycobacterium leprae*. Esta detecção se dá pelo aumento, a cada ciclo de reação, do sinal de fluorescência emitido por duas sondas moleculares específicas quando o DNA-alvo está presente na amostra. O sucesso da reação é monitorado através de um sinal de fluorescência, emitido por uma terceira sonda na mesma reação, que aumenta na presença de DNA humano e válida o resultado da reação de amplificação. O teste é qualitativo (atesta presença ou ausência do alvo na amostra), não sendo validado para quantificação.

8. TIPO DE AMOSTRAS OU MATRIZES APLICÁVEIS

O Kit NAT Hanseníase deve ser utilizado com DNA extraído de biópsia de pele ou de nervos, processados de acordo com as instruções a seguir:

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

A coleta de amostra de biópsia de pele deve ser feita através de *punch* de 2-6 mm e conservadas em etanol 70% e armazenadas a -20°C até o momento da extração de DNA. A extração deve ser realizada utilizando o kit *DNeasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen, cat. #69504 ou #69506), conforme orientações do fabricante. O DNA extraído deve ser armazenado a -20°C.

9. DESCRIÇÃO DO PRODUTO

O Kit NAT Hanseníase é composto por:

01 frasco com 1100 µL de Água RNase Free;

01 frasco com 900 µL de Mistura de PCR;

01 frasco com 110 µL de OligoMix;

01 frasco com 20 µL de Controle Negativo

01 frasco com 20 µL de Controle Positivo.

9.1. Materiais necessários não fornecidos com o produto

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

- Consumíveis para a coleta de biópsia do paciente (agulha, puncher, seringa, etc.);
- Kit *DNeasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen);
- Centrífuga compatível com os requisitos do kit de extração;
- Cabine de segurança biológica;
- Agitador tipo vórtex;
- Instrumento 7500 Real-Time PCR;
- Consumíveis para PCR em tempo real (placas de 96 poços compatíveis com o instrumento, adesivo selantes ópticos);
- Etanol Absoluto (Molecular Biology Grade);
- Pipetas sorológicas;
- Pipetadores;
- Ponteiras;
- Tubos de polipropileno de 1,5, 2 e 50 mL;
- Equipamentos de proteção individual (luvas, máscara, toucas, jalecos, etc.)

10. ESTABILIDADE DO PRODUTO EM USO

O estudo apresentou desempenho satisfatório mesmo após seis ciclos de descongelamento. Desta forma, sugere-se que quando não utilizado em sua totalidade, o Kit NAT HANS seja usado até após seis (06) descongelamentos.

11. PROCEDIMENTOS A SEREM REALIZADOS ANTES DA UTILIZAÇÃO DO PRODUTO

- Cuidados com os controles positivos: deve-se manusear os controles positivos com cuidado e atenção para evitar possíveis contaminações nos poços de amostras e/ou no ambiente, evitando assim, a geração de resultados falso-positivos;
- Cuidados de contaminação: para o bom funcionamento do Kit NAT Hanseníase, o manuseio dos reagentes deve ser feito dentro de cabines de manipulação de reações de PCR, com as superfícies devidamente descontaminadas.
- O operador deve estar devidamente paramentado (máscara, touca, jaleco, luvas sem pó e protetores de barba). Devem ser utilizadas somente ponteiras com filtro;
- Esse produto deve ser manipulado por profissionais de acordo com estas instruções de uso e utilizando equipamentos de medição calibrados;
- As superfícies devem ser sanitizadas com etanol 70% ou solução comercial validada no laboratório.

12. RECOMENDAÇÕES PARA PROCEDIMENTOS DE CONTROLE DE QUALIDADE

12.1 Processamento das Amostras

As amostras devem ser obtidas e armazenadas como descrito no item 8.1. A extração de DNA deve seguir rigorosamente as instruções do fabricante do kit recomendado.

12.2 Preparo da Mistura para Reação

O Kit NAT Hanseníase inclui reagentes suficientes para 96 reações de 25 µL, dos quais 5 µL correspondem à amostra a ser testada (ou controle). A mistura de reação deve ser preparada conforme procedimento abaixo:

- Retirar os componentes do módulo de amplificação do Kit NAT Hanseníase do freezer e deixar descongelando em temperatura ambiente;
- Agitar cada componente em vórtex com potência média por 3s e centrifugar brevemente para que todo o conteúdo esteja no fundo dos tubos;
- Separar um tubo de 2,0 mL e identificar claramente;
- Adicionar ao tubo os componentes listados na tabela a seguir na ordem em que se encontram:

Componente da mistura de reação	Volume p/ 96 reações (31 amostras em triplicatas e 3 poços-controle) com excesso de 5%
Água	1075,5 µL
Oligomix Hanseníase 25X	100,8 µL

Mistura de reação 3X IBMP	840 µL
---------------------------	--------

- Agitar em vórtex por 3s em velocidade média e centrifugar brevemente para que todo o conteúdo esteja no fundo do tubo;
- Distribuir 20 µL da mistura de reação por poço de uma placa de PCR de 96 poços;
- Se aplicável, selar a placa para transferi-la para a área de manipulação de amostras.

12.3 Aplicação das Amostras de DNA e dos controles

- Em local apropriado para a manipulação de DNA, aplicar 5 µL de cada controle nos poços correspondentes da placa de PCR (com a mistura de reação). Uma sugestão de mapa da placa é mostrada na figura abaixo;

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Amostra 1	Amostra 1	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 2	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 3	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 4	Amostra 4
B	Amostra 5	Amostra 5	Amostra 5	Amostra 6	Amostra 6	Amostra 6	Amostra 7	Amostra 7	Amostra 7	Amostra 8	Amostra 8	Amostra 8
C	Amostra 9	Amostra 9	Amostra 9	Amostra 10	Amostra 10	Amostra 10	Amostra 11	Amostra 11	Amostra 11	Amostra 12	Amostra 12	Amostra 12
D	Amostra 13	Amostra 13	Amostra 13	Amostra 14	Amostra 14	Amostra 14	Amostra 15	Amostra 15	Amostra 15	Amostra 16	Amostra 16	Amostra 16
E	Amostra 17	Amostra 17	Amostra 17	Amostra 18	Amostra 18	Amostra 18	Amostra 19	Amostra 19	Amostra 19	Amostra 20	Amostra 20	Amostra 20
F	Amostra 21	Amostra 21	Amostra 21	Amostra 22	Amostra 22	Amostra 22	Amostra 23	Amostra 23	Amostra 23	Amostra 24	Amostra 24	Amostra 24
G	Amostra 25	Amostra 25	Amostra 25	Amostra 26	Amostra 26	Amostra 26	Amostra 27	Amostra 27	Amostra 27	Amostra 28	Amostra 28	Amostra 28
H	Amostra 29	Amostra 29	Amostra 29	Amostra 30	Amostra 30	Amostra 30	Amostra 31	Amostra 31	CP hans	CN	CN	CN

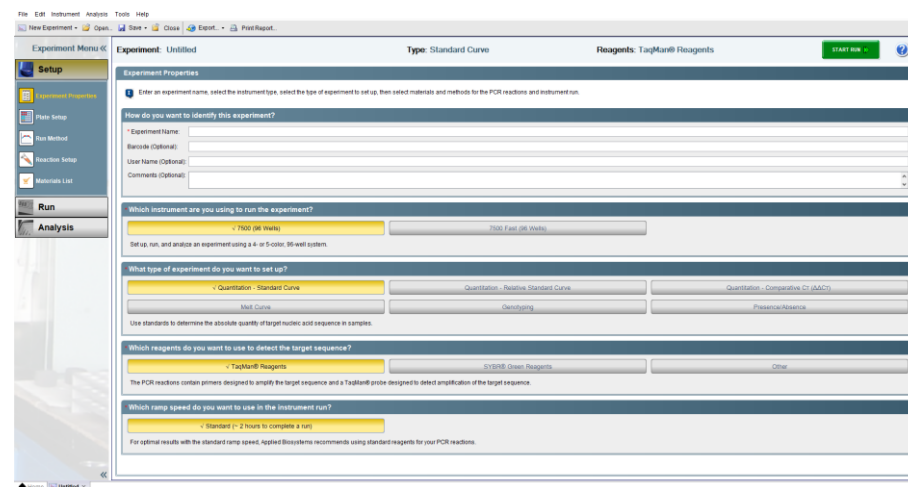
- Aplicar 5 µL de cada amostra de DNA extraído nos poços correspondentes;
- Selar a placa com selante adesivo óptico para PCR em tempo real, tomando cuidado para que as bordas dos poços estejam devidamente vedadas;
- Centrifugar a placa por 30s a 1000 x G e manter ao abrigo da luz até o momento da PCR em tempo real.

12.4 Configuração do 7500 Real-Time PCR para corrida

- Ligar o equipamento 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems) e seu computador e inserir a placa no instrumento, orientada como indicado na bandeja;
- Abriu o programa (7500 Software) e fazer o login utilizando as credenciais apropriadas;
- Inserir a placa no equipamento com as posições dos poços dispostas como no desenho esquemático apresentado anteriormente;
- No programa, selecionar *New Experiment* conforme indicado na figura abaixo:



- No menu *Setup* (do lado esquerdo da tela), submenu *Experiment Properties*, inserir o nome do experimento no campo *Experiment Name*;
- No campo “Which instrument are you using to run the experiment?”, selecionar 7500 (96 Wells);
- No campo “What type of experiment do you want to set up?”, selecionar *Quantitation - Standard Curve*;
- No campo “Which reagents do you want to use to detect the target sequence?”, selecionar *Taqman® Reagents*;
- Por fim, no campo “Which ramp speed do you want to use in the instrument run?”, selecionar *Standard (~2 hours to complete a run)*. As configurações desta página do software são mostradas na figura a seguir:



- Ainda no menu *Setup*, selecionar o submenu *Plate Setup*;
- Clicar na aba *Define Targets and Samples*;
- Na seção *Define Targets*, adicionar dois alvos (clcando no botão *Add New Target*). Incluir os alvos 16SrRNA, RLEP e 18SrRNA de acordo com a tabela a seguir:

Target Name	Reporter	Quencher
16SrRNA	FAM	NFQ-MGB
RLEP	VIC	NFQ-MGB
18SrRNA	Cy5	NFQ-MGB

- m. Na seção *Define Samples*, clicar no botão *Add New Sample* até que o número de amostras chegue na quantidade desejada (máximo de 31 amostras e 2 controles - 33 amostras). Nomear as amostras e controles de forma a facilitar a análise;
- n. Clicar na aba *Assign Targets and Samples*;
- o. Selecionar todos os poços da seção *View Plate Layout*, marcar os três alvos (16SrRNA, RLEP e 18SrRNA) em todos os poços;
- p. Selecionar os poços com amostras e selecionar U para todos os alvos;
- q. Selecionar os poços com controles positivos e selecionar S para todos os alvos;
- r. Selecionar os poços com controles negativos e selecionar N para todos os alvos;
- s. Para cada amostra ou controle, selecionar os poços correspondentes e marcar o nome correspondente na seção *Assign sample(s) to the selected wells*;
- t. Na seção *Select the dye to use as the passive reference*, selecione ROX;
- u. No lado esquerdo da tela, selecionar o menu *Run Method*. Na aba *Graphical View*, alterar o valor do campo *Reaction Volume Per Well* para 25 µL;
- v. No campo *Number of Cycles* inserir o valor 45;
- w. No diagrama de temperaturas, inserir os estágios, temperaturas e tempos de acordo com a tabela abaixo:

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

*Certificar-se de que a captura de fluorescência ocorra neste estágio.

- x. No lado esquerdo, selecionar o menu *Run*. No topo da tela, clicar no botão verde *Start Run*. Se a corrida ainda não tiver sido salva, uma caixa de diálogo será aberta para salvar o arquivo. eds resultante da corrida. Uma vez salvo, a corrida terá início e a reação seguirá o programa determinado;
- y. Ao término do programa, remover a placa do equipamento e descartar em local apropriado. O produto de PCR gerado nos poços pode contaminar reações futuras e, portanto, deve-se evitar remover o adesivo selante da placa após a reação;
- z. Proceder para a análise dos resultados.

13. ANÁLISE DOS RESULTADOS

13.1. Parâmetros de análise dos resultados

Terminada a corrida o painel de análise do experimento deve se abrir automaticamente. Caso isto não ocorra, basta clicar no menu *Analysis*, à esquerda da tela. Seguir as instruções abaixo para a análise dos dados:

- a. Clicar no botão *Analysis Settings*, no canto superior direito do painel de análise;
- b. Inserir os valores de *Threshold*, *Baseline Start* e *Baseline End* como indicados na tabela abaixo:

Alvo	Threshold	Baseline Start	Baseline End
16SrRNA	0,15	AUTO	AUTO

RLEP	0,2	AUTO	AUTO
18SrRNA	0,16	AUTO	AUTO

- c. Clicar no botão *Apply Analysis Settings* para aplicar os ajustes e, em seguida, clicar em *Reanalyse*.

13.2. Interpretação dos resultados

Após os ajustes dos parâmetros de análise:

- a. Os Cts obtidos para os controles devem ser inspecionados. Para que a corrida seja válida, os Cts dos controles positivo (CP Hans) e negativo (CN) devem estar dentro das seguintes faixas:

Controle	Ct mínimo aceitável	Ct máximo aceitável
CP Hans	16SrRNA: 17,40 RLEP: 19,25 18SrRNA: 11,00	16SrRNA: 29,10 RLEP: 30,75 18SrRNA: 45,00
CN	Nenhuma Amplificação	Nenhuma Amplificação

- b. O Controle Negativo não deve apresentar amplificação em nenhum dos três canais. Caso haja amplificação, o teste deverá ser repetido;
- c. Para cada amostra, o alvo 18SrRNA (Controle Interno de Amplificação, canal Cy5) deve amplificar com Cts entre 13 e 32. Caso esta condição não seja atendida, o resultado para esta amostra deve ser considerado inválido;
- d. Para as amostras com amplificação válida do alvo 18SrRNA (Cts entre 13 e 32), a interpretação do resultado deverá obedecer ao seguinte algoritmo:

- | | |
|-----------------------------------|---------------------------------------|
| i. 16SrRNA < 35,5 e RLEP < 34,5 | Positiva para DNA de <i>M. leprae</i> |
| ii. 16SrRNA < 35,5 e RLEP ≥ 34,5 | Negativa para DNA de <i>M. leprae</i> |
| iii. 16SrRNA ≥ 35,5 e RLEP < 34,5 | Equívocal |
| iv. 16SrRNA ≥ 35,5 e RLEP ≥ 34,5 | Negativa para DNA de <i>M. leprae</i> |

14. SUBSTÂNCIAS INTERFERENTES OU LIMITAÇÕES DO PRODUTO

Não foram identificadas substâncias interferentes ou limitações de desempenho do produto.

15. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

O KIT BIOMOL Hanseníase apresentou sensibilidade e especificidade de 91 e 100%, respectivamente, frente a 97 amostras clínicas caracterizadas, sendo 53 amostras confirmadas como hanseníase pela histopatologia e 44 negativas com diagnóstico de patologias de pele sem contato com pacientes diagnosticados com hanseníase, das quais, 14 tiveram contato doméstico com portadores de hanseníase. Amostras classificadas como “equivocais” foram consideradas negativas nos cálculos de sensibilidade e de especificidade.

O limite de detecção calculado com 95% de probabilidade (LOD95) para o KIT BIOMOL Hanseníase é aproximadamente 3.800 fg/µL para 16S e 55 fg/µL para RLEP. Para fins de testes no controle de qualidade, os limites de detecção obtidos utilizando o controle sintético para 16S e RLEP foram, respectivamente, 204 e 194,5 cópias/reação.

A especificidade analítica foi de 100% em estudo realizado com DNA extraído de 21 micro-organismos que produzem infecções de pele (*L. amazonenses*; *L. braziliense*; *M. avium*; *M. gordonae*; *M. manteni*; *M. africanum subtipo I*; *M. africanum subtipo II*; *M. bovis*; *M. bovis (BCG)*; *M. canettii*; *M. fortuitum*; *M. gordonae*; *M. intracellulare*; *M. kansasii*; *M. microti*; *M. pinnipedii*; *M. simiae*; *M. tuberculosis*; *M. fragae*; *M. kyroniense* e *Nocardia sp*), onde não foi observada reação cruzada com nenhum dos organismos para as reações descritas no KIT BIOMOL Hanseníase.

16. RISCOS RESIDUAIS IDENTIFICADOS

Nenhum risco residual foi identificado

17. DESCARTE DE RESÍDUOS

Os resíduos das extrações de amostras devem ser considerados infectantes e descartados como tais. Os reagentes fornecidos devem ser descartados como substâncias tóxicas, de acordo com a legislação vigente e regulamentos locais aplicáveis.

18. TERMOS E CONDIÇÕES DE GARANTIA DA QUALIDADE DO PRODUTO

- O produto deve ser utilizado dentro do prazo da validade determinado pelo fabricante;
- O Kit NAT Hans foi validado utilizando o kit de extração de *DNA DNeasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen), 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 ou as 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.