

Instrução de Uso  
**Kit IBMP Biomol Hanseníase**  
 IU-IVD-006  
 Revisão 09  
 30/01/2024



## 1. NOME COMERCIAL

Kit IBMP Biomol Hanseníase.

## 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 h (exceto feriados)

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

## 3. APRESENTAÇÃO

O Kit IBMP Biomol Hanseníase contém um módulo de amplificação suficiente para a detecção de 94 amostras 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.

## 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 armazenamento do produto deve ser feito entre -30°C e -15°C. A temperatura indicada de 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 DO TESTE

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

### a. 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 armazenada 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) ou EXTRACTA kit DNA e RNA de Patógenos (Loccus, cat. #MPTA-SU01, MPTA-PU16 e MPTA-PV96), conforme orientações dos fabricantes. O DNA extraído deve ser armazenado a -20°C.

## 9. DESCRIÇÃO DO PRODUTO

O Kit IBMP Biomol 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 40 µL de Controle Negativo;**

**01 frasco com 40 µL de Controle Positivo.**

### a. 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).
- EXTRACTA Kit DNA e RNA de patógenos (Loccus);
- 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, adesivos 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 dos insumos antes do preparo da mistura de reação. Desta forma, sugere-se que quando não utilizado em sua totalidade, o Kit IBMP Biomol Hanseníase seja usado até após seis (06) descongelamentos. Não é recomendado o congelamento/descongelamento da mistura de reação após o preparo.

## 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 IBMP Biomol 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 dos fabricantes dos kits recomendados.

### 12.2 Preparo da Mistura para Reação

O Kit IBMP Biomol 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 IBMP Biomol 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;



d. Adicionar ao tubo os componentes listados na tabela a seguir na ordem em que se encontram:

Componente da mistura de reação	Volume para 1 reação	Volume p/ 96 reações com excesso de 5%
Água	10,67 µL	1075,5 µL
Oligomix Hanseniase 25X	1 µL	100,8 µL
Mistura de reação 3X IBMP	8,33 µL	840 µL

e. Agitar em vórtex por 3s em velocidade média e centrifugar brevemente para que todo o conteúdo esteja no fundo do tubo;

f. Distribuir 20 µL da mistura de reação por poço de uma placa de PCR de 96 poços;

g. 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

a. 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											
B	Amostra											
C	Amostra											
D	Amostra											
E	Amostra											
F	Amostra											
G	Amostra											
H	Amostra	CP	CN									

b. Aplicar 5 µL de cada amostra de DNA extraído nos poços correspondentes;

c. Selar a placa com selante adesivo óptico para PCR em tempo real, tomando cuidado para que as bordas dos poços estejam devidamente vedadas;

d. 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

a. Configurar no software do equipamento, conforme desenho de placa estabelecido, as amostras, o controle negativo e o controle positivo.

b. 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

c. Na seção *Define Samples*, clicar no botão *Add New Sample* até que o número de amostras chegue na quantidade desejada (máximo de 94 amostras e 2 controles). Nomear as amostras e controles de forma a facilitar a análise;

d. Clicar na aba *Assign Targets and Samples*;

e. Selecionar todos os poços da seção *View Plate Layout*, marcar os três alvos (16SrRNA, RLEP e 18SrRNA) em todos os poços;

f. Selecionar os poços com amostras e selecionar U para todos os alvos;

g. Selecionar os poços com controles positivos e selecionar S para todos os alvos;

h. Selecionar os poços com controles negativos e selecionar N para todos os alvos;

i. Para cada amostra ou controle, selecionar os poços correspondentes e marcar o nome correspondente na seção *Assign sample(s) to the selected wells*;

j. Na seção *Select the dye to use as the passive reference*, seleccione ROX.

k. Selecionar o menu *Run Method*. Na aba *Graphical View*, alterar o valor do campo *Reaction Volume Per Well* para 25 µL.

l. No campo *Number of Cycles* inserir o valor 45;

m. 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.

n. Salvar o arquivo e iniciar a corrida no equipamento;

o. Proceder para a análise dos resultados.

### 13. ANÁLISE DOS RESULTADOS

#### a. 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	0,025	AUTO	AUTO

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

#### b. 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: <b>17,40</b> RLEP: <b>19,25</b> 18SrRNA: <b>13,10</b>	16SrRNA: <b>29,10</b> RLEP: <b>30,75</b> 18SrRNA: <b>23,40</b>
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 Ct maior que



10 e menor que 30. Caso  $Ct \geq 30$  ou  $Ct \leq 10$ , o resultado para esta amostra deve ser considerado inválido;  
d. Para as amostras com amplificação válida do alvo 18SrRNA ( $10 < Ct < 30$ ), a interpretação do resultado deverá obedecer ao seguinte algoritmo:

- i. 16SrRNA  $< 35,5$  e RLEP  $< 34,5$  Positiva para DNA de *M. leprae*
- ii. 16SrRNA  $< 35,5$  e RLEP  $\geq 34,5$  Negativa para DNA de *M. leprae*
- iii. 16SrRNA  $\geq 35,5$  e RLEP  $< 34,5$  Equivocal
- iv. 16SrRNA  $\geq 35,5$  e RLEP  $\geq 34,5$  Negativa para DNA de *M. leprae*

#### 14. SUBSTÂNCIAS INTERFERENTES OU LIMITAÇÕES DO PRODUTO

- Os resultados obtidos com o Kit IBMP Biomol Hanseníase devem ser interpretados em conjunto com informações clínicas, epidemiológicas e laboratoriais do paciente. Um resultado 'Não detectável' não exclui a possibilidade de infecção por *M. leprae*;
- A falta de rígido controle ambiental poderá acarretar contaminações no Controle Negativo da reação;
- Amostras de pacientes Paucibacilares, por apresentarem poucas lesões, lesões irregulares e/ou contagem baixa de bacilos, podem gerar resultados falso-negativos, recomenda-se a testagem em triplicata. Uma única réplica que atenda aos critérios de positividade é suficiente para considerar a amostra positiva.

#### 15. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

O Kit IBMP Biomol Hanseníase apresentou sensibilidade e especificidade de 89 e 97%, respectivamente, frente a 97 amostras clínicas caracterizadas (53 amostras confirmadas como hanseníase pela histopatologia e 44 negativas com diagnóstico de patologias de pele sem contato com pacientes diagnosticados com 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 IBMP Biomol Hanseníase é aproximadamente 3.800 fg/ $\mu$ L para 16S e 55 fg/ $\mu$ L 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*), ou seja, não foi observada reação cruzada com nenhum dos organismos para as reações testadas com o Kit IBMP 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 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 IBMP Biomol Hanseníase foi validado utilizando os kits de extração de DNA *DNeasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen) e *EXTRACTA Kit DNA e RNA de Patógenos* (Loccus), 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.