

Instrução de Uso
Kit IBMP Biomol Hanseníase
 IU-IVD-006
 Revisão 13 | 25/02/2025



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

Kit contendo um módulo de amplificação suficiente para 96 determinações.

4. FINALIDADE

Este produto se destina à detecção qualitativa (presença/ausência) do material genético de *Mycobacterium leprae*, extraído de amostras de biópsia de pele ou de nervo em pacientes com suspeita de Hanseníase. O resultado obtido pode ser utilizado em conjunto com os dados clínicos e epidemiológicos do paciente, para auxiliar o diagnóstico da Hanseníase.

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 Hanseníase 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 biópsia de pele ou de nervo, a partir da avaliação da intensidade de fluorescência capturada ao final de cada ciclo da PCR.

O Kit IBMP Biomol Hanseníase permite a identificação da bactéria *Mycobacterium leprae*, através da detecção dos

alvos moleculares RLEP e 16S rRNA, 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 uma 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 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 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, exceto CI.

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 os seguintes termocicladores: 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) e CFX96 Real Time PCR Detection System (Bio-Rad).

8. TIPO DE AMOSTRAS OU MATRIZES APLICÁVEIS

Amostras de DNA extraído de biópsia de pele ou de nervo.

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

A coleta da biópsia de pele deve ser feita através de um *punch* de 2 a 6 mm da lesão. A conservação deve ser feita imergindo a amostra em etanol 70%.

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

- O DNA extraído deve ser armazenado 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 entre as amostras.
- Homogeneizar tubos contendo DNA gentilmente, sem vórtex, evitando a formação de aerossóis.

9. DESCRIÇÃO DO PRODUTO

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

- 01 microtubo de Água RNase *Free* contendo 1100 µL;
- 01 microtubo de Mistura de PCR contendo 900 µL;
- 01 microtubo de OligoMix contendo 110 µL;
- 01 microtubo de Controle Negativo (CN) contendo 40 µL;
- 01 microtubo de Controle Positivo (CP) contendo 40 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 posições;
- 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);
- Hipoclorito de sódio 0,1% (v/v) ou outra solução descontaminante de DNA adequada;
- 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 esterilizadas 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 seis 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

- As superfícies devem ser sanitizadas com hipoclorito de sódio 0,1% (v/v) ou outra solução descontaminante de DNA validada no laboratório;
- No momento do uso, os reagentes e amostras de DNA extraído devem ser descongelados, homogeneizados sem vórtex, 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 a 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 Hanseníase.

Componente	Volume para uma reação
Água	10,67 µL
Oligomix	1 µL
Mistura de PCR	8,33 µL
Total	20 µL

- Em 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, ajustados ao número de reações a serem realizadas;
- Homogeneizar gentilmente por vórtex suave, pipetagem ou tamborilando e centrifugar brevemente (*spin*);
- Distribuir 20 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 local apropriado para manipulação de DNA, homogeneizar gentilmente (sem vórtex) as amostras e controles, evitando a formação de aerossóis. Em seguida centrifugá-los brevemente (*spin*);
- Seguindo o mapa da placa de reação, aplicar 5 µL de cada amostra de DNA extraído nos poços correspondentes na placa de reação;
- Adicionar 5 µL do Controle Positivo (CP) no poço correspondente na placa de reação;
- Adicionar 5 µL do 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 a Tabela 2.

Tabela 1. Alvos e fluorescências/canais a serem configurados para análise.

Alvo	Fluoróforo	Quencher
16S rRNA	FAM	None
RLEP	VIC	None
CI	Cy5	None

- Selecionar a referência passiva do equipamento como ROX, quando aplicável;
- Configurar os parâmetros de termociclagem conforme a Tabela 3.

Tabela 2. Parâmetros de termociclagem para o Kit IBMP Biomol Hanseníase.

Etapa	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 3. Parâmetros analíticos a serem utilizados para os diferentes termocicladores.

Equipamento	Alvo	Threshold	Baseline
7500 Real Time PCR System	16S rRNA	0,15	AUTO
	RLEP	0,2	AUTO
	CI	0,025	AUTO
CFX96 Real Time PCR Detection System	16S rRNA	30	AUTO
	RLEP	60	AUTO
	CI	AUTO	AUTO

14.2. Interpretação dos resultados

– Para que uma corrida seja considerada válida, o Controle Positivo (CP) deve apresentar amplificação para todos os alvos com Ct dentro dos intervalos descritos abaixo:

- Alvo 16S rRNA com valor de $17,40 \leq Ct \leq 29,10$;
- Alvo RLEP com valor de $19,25 \leq Ct \leq 30,75$;
- Alvo CI com valor de $13,10 \leq Ct \leq 23,40$.



- Para que uma corrida seja considerada válida, o Controle Negativo não deve apresentar amplificação para os alvos bacterianos (RLEP e 16S rRNA), e deve apresentar amplificação do CI com valor de $15,64 \leq Ct \leq 19,64$;
 - Para que uma amostra seja considerada negativa, não deve apresentar amplificação nos alvos bacterianos (RLEP e 16S rRNA), e deve apresentar amplificação do CI com valor de $10 < Ct < 30$. A amostra também será considerada negativa caso apresente $Ct \geq 34,5$ para o alvo RLEP, independentemente do Ct do alvo 16S rRNA;
 - Para que uma amostra seja considerada positiva, deve apresentar amplificação do CI com valor de $10 < Ct < 30$, do alvo RLEP com valor de $Ct < 34,5$ e do alvo 16S rRNA com valor de $Ct < 35,5$;
 - Uma amostra será considerada com resultado equivocal quando apresentar amplificação do CI com valor de $10 < Ct < 30$, do alvo RLEP com valor de $Ct < 34,5$ e do alvo 16S rRNA com valor de $Ct \geq 35,5$.
- A Figura 1 apresenta um fluxograma de interpretação dos resultados baseado nos valores de Ct de cada alvo bacteriano.

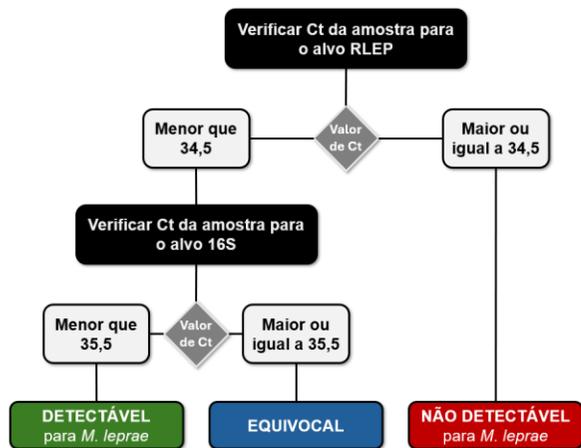


Figura 1. Fluxograma de interpretação dos resultados.

- Os critérios para interpretação de resultados estão descritos na Tabela 5.

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

Amostra			CP	CN*	Resultado
16S rRNA	RLEP	CI			
+	+	+	+	-	<i>M. leprae</i> detectável
+/-	-	+	+	-	<i>M. leprae</i> não detectável
-	+	+	+	-	Equivocal
+/-	+/-	-	+	-	Amostra inválida
+/-	+/-	+/-	-	+/-	Ensaio inválido
+/-	+/-	+/-	+/-	+	Ensaio inválido

* O sinal '-' refere-se à ausência de amplificação nos alvos RLEP e 16S rRNA. O controle interno deve apresentar amplificação dentro dos valores de Ct descritos no item 14.2.

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

- Caso haja amplificação dos alvos RLEP e 16S rRNA no Controle Negativo, todo o ensaio deve ser repetido;
- Amostras que apresentarem amplificação do CI com $Ct \geq 30$, ou que não apresentarem amplificação para este alvo, possuem resultado inválido e devem ser retestadas, preferencialmente, desde a extração;
- Nos casos de resultado equivocal, recomenda-se que o paciente seja acompanhado clinicamente e uma nova amostra seja testada conforme manejo clínico da instituição médica.

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 biópsia de pele ou de nervo podem ser utilizadas com o Kit IBMP Biomol Hanseníase. O uso de outras matrizes biológicas não foi validado com o kit;
- 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” ou “equivocal” 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 e, nesses

casos, recomenda-se a testagem da amostra em triplicata. Uma única réplica que atenda aos critérios de positividade é suficiente para considerar a amostra positiva.

16. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

16.1. Sensibilidade analítica

Para determinação do limite mínimo de detecção, diluições seriadas de DNA extraído a partir de raspado de pele de camundongos infectados com *M. leprae* foram testadas com o Kit IBMP Biomol Hanseníase, e avaliadas de acordo com os critérios de interpretação estabelecidos. As probabilidades de detecção foram inferidas destes testes, e um modelo proibit foi ajustado e utilizado para predição da massa de DNA que confere 95% de probabilidade de detecção (LoD95%). O LoD95% para os alvos bacterianos 16S rRNA e RLEP foram de 3800 e 55 fg/reação, respectivamente.

16.2. Especificidade analítica

O Kit IBMP Biomol Hanseníase não apresentou detecção cruzada frente à análise de amostras conhecidamente positivas para os seguintes patógenos: *Leishmania amazonensis*, *L. braziliensis*, *Mycobacterium avium*, *M. gordonae*, *M. mantenii*, *M. africanum* subtipo I, *M. africanum* subtipo II, *M. bovis*, *M. bovis* (BCG), *M. canetti*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. simiae*, *M. tuberculosis*, *M. fragae*, *M. kyorinense* e *Nocardia spp.*

16.3. Precisão

Testes de repetibilidade e reprodutibilidade foram realizados por três operadores diferentes a partir de curvas de diluição do controle positivo do Kit IBMP Biomol Hanseníase. Os coeficientes de variação obtidos foram menores que 25% e foram considerados satisfatórios.

16.4. Sensibilidade clínica

O desempenho diagnóstico do teste foi determinado através da análise de um painel com 97 amostras clínicas de biópsia de pele, previamente caracterizadas por avaliação clínico-patológica (53 amostras positivas, confirmadas como Hanseníase por histopatologia, e 44 amostras negativas, com diagnóstico de outras patologias de pele sem contato com pacientes diagnosticados com Hanseníase). Amostras com resultado “equivocal” foram consideradas negativas nos cálculos de sensibilidade e especificidade. Os resultados estão descritos na Tabela 6.



Tabela 6. Desempenho diagnóstico do Kit IBMP Biomol Hanseníase.

		Método de Referência		
		Detectável	Não detectável	Total
Kit IBMP Biomol Hanseníase	Detectável	48	0	48
	Não detectável	5	44	49
	Total	53	44	97

O teste apresenta sensibilidade diagnóstica de 89%, especificidade diagnóstica de 97%.

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;
- Realizar descontaminação periódica de ambientes, bancadas e instrumentos, utilizando agente descontaminante apropriado para áreas de trabalho de Biologia Molecular;
- Realizar os processos de extração de ácidos nucléicos, o preparo de mistura 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 falsos-positivos;
- O Controle Positivo deve ser manuseado com cuidado, a fim de evitar a contaminação das amostras avaliadas.

18. DESCARTE DE RESÍDUOS

Os resíduos gerados após o uso do produto devem ser descartados em locais apropriados e destinado 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 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 Hanseníase. 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 biópsia de pele ou de nervo. O uso de DNA extraído de outras matrizes biológicas não foi validado para o Kit IBMP Biomol Hanseníase;
- 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 produto pode ser utilizado com os equipamentos constantes no item 7 desta Instrução de Uso.