

**NOTA TÉCNICA - SES - Gerência de Vigilância Laboratorial das Doenças
Transmissíveis e da Triagem Neonatal**

Laboratório Central de Saúde Pública de Pernambuco - LACEN/PE

Nº 007/2024

Recife, 29 de julho de 2024

ASSUNTO: Orientações para realização do teste de hibridização com sonda em linha (LPA), utilizado no âmbito laboratorial para avaliação de genes de resistência aos antimicrobianos utilizados no tratamento da Hanseníase.

Frente a importância de ações estratégicas para a ampliação e o fortalecimento da rede de diagnóstico laboratorial e vigilância da hanseníase no país, em atenção à NOTA TÉCNICA Nº 46/2024-CGLAB/SVSA/MS, o Laboratório Central de Saúde Pública de Pernambuco vem, por meio desta Nota Técnica Informativa divulgar as recomendações para a utilização do teste de hibridização de sonda em linha (LPA – do inglês Line Probe Assay) para identificação de genes associados a resistência, no âmbito do SUS.

1. DESCRIÇÃO

O LPA é um teste qualitativo utilizado para avaliação da resistência antimicrobiana (RAM) por amplificação de DNA e hibridização reversa em fita de nitrocelulose. Este teste é capaz de detectar o *Mycobacterium leprae* e, simultaneamente, mutações associadas com a resistência à rifampicina, ao ofloxacino e à dapsona em amostras de biópsia de pele com baciloscopia positiva. A detecção de resistência é realizada pela identificação das mutações mais significantes no gene *rpoB* (que codifica a subunidade- β da RNA polimerase) para rifampicina, no gene *gyrA* (que codifica a subunidade-A da DNA girase) para ofloxacino e outras fluoroquinolonas, e no gene *folP1* (que codifica a dihidropteroato sintase) para dapsona.

Além de aprimorar e ampliar a vigilância de cepas de *M. leprae* resistentes aos medicamentos utilizados no tratamento da hanseníase, o LPA é capaz de promover a celeridade no processo de investigação de RAM, uma vez que esta tecnologia pode ser implementada de forma descentralizada no país, tendo em vista a menor complexidade de recursos laboratoriais necessários para sua execução.

De acordo com a NOTA TÉCNICA Nº 46/2024-CGLAB/SVSA/MS o LPA tem seu uso indicado no Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Hanseníase (PCDT da hanseníase) para investigação de resistência primária em paciente diagnosticado como caso novo de hanseníase e que, no diagnóstico inicial apresente Índice Baciloscópico (IB) $\geq 2,0$ e, para a avaliação da resistência secundária do *M. leprae*,

após uso de poliquimioterapia única (PQT-U).

2. FLUXOS

A investigação da resistência antimicrobiana (RAM) para hanseníase inicia-se nas unidades sentinelas, selecionadas pela coordenação estadual de hanseníase juntamente com seus municípios, que compõem a rede de vigilância do estado.

É de responsabilidade das unidades sentinela:

1. Identificar os casos com indicação para investigação de resistência segundo os critérios do PCDT da Hanseníase;
2. Coletar as amostras de maneira adequada;
3. Cadastrar o paciente no bloco I (Dados da Investigação da Resistência) do SIRH;
4. Inserir no GAL a requisição do exame Hanseníase, Teste de Sensibilidade Genotípico - Hibridização de Sonda em linha;
5. Enviar a amostra para o LACEN PE em até 5 dias a contar da data da coleta.

Cabe o LACEN PE:

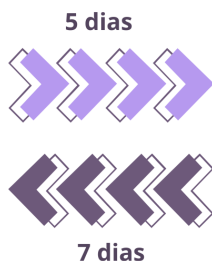
1. Conferir e avaliar a qualidade da amostra recebida;
2. Preencher o bloco II (Recebimento da amostra pelo Lacen) do SIRH;
3. Realizar o teste LPA de acordo com as indicações do fabricante e da NOTA TÉCNICA Nº 46/2024-CGLAB/SVSA/MS;
4. Liberar o resultado no bloco III (recebimento de amostra pelo laboratório) do SIRH e no GAL no prazo máximo de 7 dias, a contar da data do recebimento da amostra;
5. Em caso de resultado indeterminado no LPA, incluir no GAL como exame complementar o exame Hanseníase, Testa de Sensibilidade e enviar a amostra para o laboratório de referência. Deve ser encaminhado, preferencialmente, uma parte do fragmento da biópsia.



Unidade Sentinela

Responsabilidades:

- 1) Coletar
- 2) Cadastrar no GAL e no bloco I do SIRH
- 3) Enviar ao LACEN



Laboratório de Referência Estadual



Responsabilidades:

- 1) Preencher bloco do II SIRH
- 2) Realizar o LPA
- 3) Liberar o resultado no GAL e no bloco III do SIRH
- 4) Diante de resultado indeterminado, encaminha amostra para o Laboratório de referência nacional



Se o resultado do LPA for INDETERMINADO



Laboratório de Referência Nacional

Responsabilidades:

- 1) Realizar o sequenciamento genômico das amostras com resultado indeterminado no
- 2) Liberar resultado no GAL

Figura 1. Fluxo de amostras para os LACEN PE.

3. AMOSTRAS BIOLÓGICAS E TRANSPORTE

Na investigação da resistência do *M. leprae* a antimicrobianos, a amostra biológica consiste em fragmento de pele da borda da lesão mais característica e de maior IB. A biópsia deverá ser realizada, preferencialmente, com punch de 6 mm, na impossibilidade deverão ser coletados dois fragmentos com punch de 4 mm.

A biópsia deverá ser armazenada em tubo de plástico novo e com tampa capaz de vedar perfeitamente. Recomenda-se utilizar microtubo ou tubo criogênico de tampa com rosca e anel de silicone, para auxiliar a vedação, com capacidade para 1,5 ou 2,0 ml. Para garantir a vedação do tubo, deve-se envolver com plástico selador (filme de poliolefina). Nunca utilizar frascos que não tenham uma boa vedação como por exemplo, coletores de urina.

Recomenda-se a preservação das amostras em álcool a 70°GL ou 70% para transporte em temperatura ambiente.

Para preservação em álcool a 70°GL ou 70%, os tubos devem ser previamente preenchidos com álcool a 70°GL ou 70% e não devem conter espaço vazio, garantindo assim que toda a amostra fique imersa para melhor preservação. Importante garantir que a tampa seja capaz de vedar perfeitamente o tubo e, além disso, envolvê-lo com plástico selador. Nestas condições pode-se mantê-los a temperatura ambiente. Em hipótese alguma deve-se colocar o fragmento de pele destinado a análise por técnicas de biologia molecular em formol.

Quanto à identificação, os tubos devem ser devidamente etiquetados, com data da coleta, nome completo e legível do paciente, sem abreviações, de acordo com sua documentação. Caso o paciente tenha um resultado recente de baciloscopia, o IB deve ser inserido no GAL e no SIRH. É importante ressaltar que a identificação (etiqueta) seja resistente.

Informações adicionais referente à coleta e transporte de amostras estão dispostas no documento “Um Guia para Vigilância de Resistência Antimicrobiana na

Hanseníase”, publicado em 2017, pela Organização Mundial da Saúde (OMS), disponível em: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/259357/9789290226444-por.pdf?sequence=24&isAllowed=y>.

4. SISTEMA GERENCIADOR DE AMBIENTE LABORATORIAL (GAL)

O cadastro da amostra é de responsabilidade da unidade sentinela.

Ao cadastrar nova requisição no GAL, deve-se preencher toda a ficha que é composta por sessões que solicitarão informações da unidade requisitante, informações do paciente, informações clínicas e, uma última parte, onde serão incluídas informações sobre amostra coletada e cadastro da Pesquisa/Exame. Além disso, orienta-se a inclusão no campo “Observações” do IB proveniente de exame de baciloscopia recente.

A descrição do exame no sistema GAL consta como “Hanseníase, Teste de Sensibilidade Genotípico” e é esta opção que deve ser selecionada em “Nova pesquisa” na aba Pesquisa/Exames (Figura 2).

O exame “Hanseníase, Teste de Sensibilidade Genotípico” está associado à metodologia “Hibridação com sonda em linha (LPA)”.

Incluir Requisição

Amostras

Nova amostra: Amostra:

Data da Colet. Hora da Colet. Medicamento: Qual medicamento utilizado?

Data de Inicio

Material	Localização	Amostra	Material Clínico	Data
----------	-------------	---------	------------------	------

Pesquisas/Exames

Nova pesquisa: Amostra:

Exame	Amostra	Status
<input type="text" value="Hanseníase, Teste de Sensibilidade Genotípico"/>		

01/02/2016 LABORATÓRIO DOS D 28/07/2016 LAB CENTRAL
01/05/2016 LABORATÓRIO DOS D 02/08/2016 LAB CENTRAL

Figura 2. Seção da ficha de solicitação de exame do GAL onde serão incluídas informações sobre a amostra coletada e o cadastro da Pesquisas/Exames. As informações circundadas em vermelho (tipo de Material Biológico e Localização) devem ser preenchidas conforme a figura. A seta vermelha indica a opção a ser selecionada no momento do cadastro da pesquisa/exame.

REFERÊNCIAS

1. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Hanseníase. 2022. 152p.:il.
2. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação- Geral de

Mayara Matias de Oliveira Marques da Costa

Gerência de Vigilância Laboratorial das Doenças Transmissíveis e da Triagem Neonatal do Laboratório Central de Saúde Pública de Pernambuco

Keilla Maria Paz e Silva

Diretoria Geral de Laboratórios de Saúde Pública do Laboratório Central de Saúde Pública de Pernambuco



Documento assinado eletronicamente por **Keilla Maria Paz e Silva**, em 29/07/2024, às 08:31, conforme horário oficial de Recife, com fundamento no art. 10º, do [Decreto nº 45.157, de 23 de outubro de 2017](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mayara Matias de Oliveira Marques da Costa**, em 29/07/2024, às 15:25, conforme horário oficial de Recife, com fundamento no art. 10º, do [Decreto nº 45.157, de 23 de outubro de 2017](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.pe.gov.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **53747658** e o código CRC **3AA22874**.

SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE DE PERNAMBUCO

Rua Dona Maria Augusta Nogueira, 519, - Bairro Bongü, Recife/PE - CEP 50751-530, Telefone: (81)3184-0000