



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Suelen Justo Maria Moreira

**Padronização e avaliação de um sistema de PCR quantitativo para
diagnóstico molecular da hanseníase**

Rio de Janeiro

2018

Suelen Justo Maria Moreira

**Padronização e avaliação de um sistema de PCR quantitativo para diagnóstico
molecular da hanseníase**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, Medicina Laboratorial e Tecnologia Forense, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Fernanda Saloum de Neves Manta

Coorientador: Prof. Dr. Elizeu Fagundes Carvalho

Rio de Janeiro

2018

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

M838 Moreira, Suelen Justo Maria.
Padronização e avaliação de um sistema de PCR quantitativo para diagnóstico molecular da hanseníase / Suelen Justo Maria Moreira. – 2018. 135 f.

Orientadora: Fernanda Saloum de Neves Manta.

Coorientador: Elizeu Fagundes Carvalho.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Programa de Pós-Graduação em Saúde, Medicina Laboratorial e Tecnologia Forense.

1. Hanseníase – Diagnóstico – Teses. 2. *Mycobacterium leprae* – Teses. 3. Reação em cadeia de polimerase – Teses. 4. Amplificação de genes – Teses. 5. RNA Ribossômico 16S - Teses. 6. Amplificação de genes – Teses. I. Manta, Fernanda Saloum de Neves. II. Carvalho, Elizeu Fagundes. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 616-002.73-07

Bibliotecária: Kalina Silva CRB7/4377

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Suelen Justo Maria Moreira

**Padronização e avaliação de um sistema de PCR quantitativo para diagnóstico
molecular da hanseníase**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, Medicina Laboratorial e Tecnologia Forense, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 26 de abril de 2018.

Coorientador: Prof. Dr. Elizeu Fagundes Carvalho
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Fernanda Saloum de Neves Manta (Orientadora)
Fundação Oswaldo Cruz

Prof.^a Dra. Thaís Porto Amadeu
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof. Dr. Adalberto Rezende Santos
Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2018

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Francisco e Kátia, por todo amor, carinho e dedicação investidos em mim. Ao meu amor, Roberto, por ter me carregado no colo todas as vezes em que me senti exausta e pensei em desistir. E para aqueles, os meus amigos, que mesmo nos momentos mais difíceis, insistiam em estar ao meu lado. Sou grata, muito grata a cada um de vocês.

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu Pai, e à minha Mãe, Nossa Senhora Aparecida, por jamais terem me abandonado, principalmente nas horas mais difíceis dessa minha caminhada.

Aos meus pais, Francisco e Kátia, pelo amor, carinho, atenção, preocupação, paciência e pelos esforços de vocês para que eu me formasse e incentivo também para que eu buscasse cada vez mais novos conhecimentos.

Ao meu esposo, Roberto (Beto), pelo amor e companheirismo. Por estar ao meu lado, sempre, me ajudando a caminhar, me incentivando e me fortificando a todo tempo. E por acreditar em mim incessantemente!

Aos meus irmãos, Jéssica e Renard, e aos meus queridos avós, Virgínia e Sérgio (*In memoriam*) pela presença, apoio e união familiar.

À Fernanda Manta, minha orientadora e amiga, com a qual pude e posso contar em todos os momentos da minha vida. Obrigada por me fortalecer e me dar esperança, Fe! Sem você, nada disso teria acontecido!

Ao Milton Ozório Moraes, chefe do Laboratório de Hanseníase, com o qual tive o privilégio de conviver e admirar por dez anos. Obrigada pelo conhecimento científico e acadêmico, e também pela parceria, amizade e confiança.

Ao Marcelo Ribeiro Alves por todas as análises estatísticas e por ser sempre tão prestativo, gentil e divertido comigo.

Aos amigos do laboratório de hanseníase (LAHAN): Ohanna (Ohanns), Valcemir (Val), Mayara (May), Thiago Pinto (Thi), Thyago Leal (Thythy), Fernanda Kehdy (Ferdi), Brunna (Brunninha), Alexandre (Preto), Leonardo (Léo), Rychelle (Ry), Rafaela (Rafa), Andréa Marques, Tamiris Azamor, Tamiris Bittencourt, Ricardo, Laís, Pietra e Isabela, muito obrigada pela harmoniosa convivência, e pelos momentos de ensinamentos e gargalhadas compartilhados. Vocês fizeram e fazem total diferença nos meus dias, tornando-os mais leves e alegres.

Às amigas que já não estão mais no LAHAN, mas que continuam presentes no meu coração, Lucia Alvarado (Lu), Carolinne Marques (Carol), Paula Mello (Paulinha), Luana Guerreiro (Lu) e Cynthia Chester (minha primeira e querida chefe). Obrigada pelo carinho e apoio de sempre!

À amiga, Amanda Brum (Amandita), revisora deste trabalho. Quero lhe agradecer por toda força, esperança, dedicação e por todo carinho dado a mim!

À Eliane Barbosa e Andressa Gomes pela forte amizade e pelos momentos de muitas risadas antes, durante e após os almoços.

Ao Edson Cláudio Araripe, parceiro e amigo que o mestrado me deu. Obrigada por toda ajuda e pelo imenso carinho que me dedicas. Conte sempre comigo, Zé!

Aos demais amigos e colegas do Pavilhão de Hanseníase. Muito obrigada pelos momentos alegres e divertidos que vocês me proporcionaram.

À amiga Cristiane Domingues, pela paciência, carinho, amizade e gentileza. Cris, muito obrigada pelo imenso suporte!

Ao José Augusto da Silva por toda paciência, dedicação e colaboração em ajudar no que fosse necessário.

Aos queridos profissionais do Ambulatório Souza Araújo (ASA), Dr. José Augusto Nery, Dra. Nádia Düppre, Dra. Raquel Barbieri, Dra. Anna Sales, aos enfermeiros Alex e Wellington, e a todos os demais, que sempre me trataram com muito carinho, respeito e gentileza, colaborando e ajudando no que fosse preciso.

À equipe do Instituto de Biologia Molecular do Paraná, especialmente a Rita Rampazzo e Alexandre Dias Tavares, e ao grupo do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada a Micobactérias (LABMAM) por toda colaboração durante este projeto.

Aos membros da banca e aos suplentes, pela gentileza com a qual aceitaram prontamente o convite para avaliar esse trabalho: Dra. Thaís Porto Amadeu, Dr. Adalberto Rezende Santos, Dra. Erica Ripoll Hamer e Dra. Fernanda de Souza Gomes Kehdy.

Meu muitíssimo obrigada à Simone Souza, secretária da Pós-Graduação, por ser interminavelmente amável, solícita e eficiente.

Aos professores pelas longas horas de ensinamentos e partilha de conhecimentos.

E a todos os amigos do mestrado, por estarmos constantemente juntos e unidos, um ajudando o outro a trilhar esse caminho.

Agradeço imensamente e de coração a todos vocês!

O mundo está nas mãos daqueles que tem a coragem de sonhar
e correr o risco de viver seus sonhos.

Paulo Coelho

RESUMO

MOREIRA, Suelen Justo Maria. *Padronização e avaliação de um sistema de PCR quantitativo para diagnóstico molecular da hanseníase*. 2018. 135 f. Dissertação (Mestrado em Saúde, Medicina Laboratorial e Tecnologia Forense) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

A hanseníase persiste como um problema de saúde pública no mundo, apesar dos esforços para a sua eliminação. O número de pessoas infectadas por *Mycobacterium leprae* e que desenvolvem a doença, contribui para que o Brasil seja um dos países com uma das taxas mais altas de novos casos de hanseníase no mundo. É sabido que os indivíduos que convivem em proximidade com os pacientes hansenianos apresentam maior risco de desenvolverem a doença. Esta é causada por um patógeno intracelular obrigatório, *Mycobacterium leprae*, que não é cultivável *in vitro*; tal característica dificulta as estratégias clássicas de diagnóstico que se baseiam em testes bacteriológicos e/ou histopatológicos. O diagnóstico precoce da hanseníase em áreas endêmicas requer testes efetivos para identificar indivíduos em risco de desenvolver a doença antes da manifestação clínica. Com o intuito de dar suporte ao diagnóstico clínico, métodos moleculares com altas sensibilidade e especificidade, como a reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR), vêm sendo empregados no diagnóstico dos pacientes. O objetivo geral do presente estudo foi desenvolver e padronizar um sistema *multiplex* de qPCR que fosse eficiente para o diagnóstico de hanseníase. O *kit* é composto por reagentes nacionais (fabricados pelo Instituto de Biologia Molecular do Paraná – FIOCRUZ), desenvolvido em forma de um sistema *multiplex* que contém um alvo molecular como controle de qualidade. O sistema *multiplex* desenvolvido foi capaz de detectar a presença do DNA do patógeno (alvo 16S rRNA) e do paciente (alvo 18S2) na mesma reação. A eficiência do protocolo estabelecido foi alta ($\rho=0,99$) para os dois alvos analisados e os parâmetros de validação foram satisfatórios, apresentando bons níveis de sensibilidade (0,65), especificidade (1) e acurácia (0,82). Os achados deste estudo demonstram a eficiência e a importância da qPCR como ferramenta para o diagnóstico precoce e complementar dentro de uma rotina laboratorial. Esse suporte à avaliação clínica poderia ocasionar o início correto do tratamento quimioprolático, o que contribuiria para a interrupção da cadeia de transmissão da hanseníase.

Palavras-chave: Hanseníase. qPCR. *Mycobacterium leprae*. 16S rRNA. Controle interno de amplificação. 18S2 ribossomal.

ABSTRACT

MOREIRA, Suelen Justo Maria. *Standardization and evaluation of a quantitative PCR system for leprosy molecular diagnosis*. 2018. 135 f. Dissertation (Master's Degree in health, Laboratorial Medicine and Forensics Technology) – Biology Institute Roberto Alcantara Gomes, State University from Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Leprosy persists as a public health problem in the world despite efforts to eliminate it. The number of people infected with *Mycobacterium leprae* who develop the disease contributes to Brazil being one of the countries with highest rates of new cases of leprosy in the world. It is well known that individuals who live close to leprosy patients are at higher risk of developing the disease. This is caused by an obligate intracellular pathogen, *Mycobacterium leprae*, which is not cultivable *in vitro*; such a feature hinders the classical diagnostic strategies that are based on bacteriological and / or histopathological tests. Early diagnosis of leprosy in endemic areas requires effective testing to identify individuals at risk of developing the disease prior to clinical manifestation. In order to support clinical diagnosis, molecular methods with high sensitivity and specificity, such as quantitative polymerase chain reaction (qPCR), have been used in the diagnosis of patients. The overall objective of the present study was to develop and standardize a qPCR multiplex system that is efficient for the diagnosis of leprosy. The kit consists of national reagents (manufactured by the Institute of Molecular Biology of Paraná - FIOCRUZ), developed in the form of a multiplex system containing a molecular target as a quality control. The developed multiplex system was able to detect the presence of the pathogen DNA (16S rRNA target) and the patient (18S2 target) in the same reaction. The efficiency of the established protocol was high ($\rho = 0.99$) for the two analyzed targets and the validation parameters were satisfactory, presenting good levels of sensitivity (0.65), specificity (1) and accuracy (0.82). The findings of this study demonstrate the efficacy and importance of qPCR as a tool for early and complementary diagnosis within a laboratory routine. Such support for clinical evaluation could lead to the correct initiation of chemoprophylactic treatment, which would contribute to the interruption of the leprosy transmission chain.

Keywords: Leprosy. qPCR. *Mycobacterium leprae*. 16S rRNA. Internal amplification control. Ribossomal 18S2.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Colônia de pacientes hansenianos localizada no território do Acre.....	20
Figura 2 –	Cristão socorrendo um paciente hanseniano.....	20
Figura 3 –	Taxas da incidência mundial de hanseníase reportadas à OMS, no início do ano de 2017, referentes ao ano anterior.....	23
Figura 4 –	Taxa de incidência da hanseníase por regiões do Brasil no ano de 2016.....	24
Figura 5 –	Taxas de prevalência da hanseníase no Brasil no ano de 2016.....	25
Figura 6 –	Fotomicrografia de esfregaço de raspado intradérmico.....	26
Figura 7 –	Estrutura esquemática da parede celular de <i>M. leprae</i>	27
Figura 8 –	Formas clínicas da hanseníase.....	30
Figura 9 –	Medicamentos utilizados no tratamento da hanseníase.....	33
Figura 10 –	Representação esquemática das 3 fases que constituem a PCR.....	37
Figura 11 –	Curva padrão realizada a partir de DNA extraído de amostras contendo <i>M. leprae</i> purificado (1ng-3,125fg).....	48
Figura 12 –	Curva padrão realizada a partir de DNA extraído de amostras contendo <i>M. leprae</i> purificado (1ng-1fg).....	49
Figura 13 –	Comparação da eficiência e da reprodutibilidades dos resultados a partir de duas plataformas de PCR.....	50
Figura 14 –	qPCR das amostras da curva padrão utilizando diferentes quantidades de DNA extraído a partir de <i>M. leprae</i> purificado (1ng e 5ng) na reação.....	51
Figura 15 –	Reação <i>monoplex</i> (16S) realizada em duplicata a partir de amostras de pacientes com hanseníase utilizando o <i>Mastermix</i> do IBMP.....	52
Figura 16 –	Resultado do teste em reação <i>monoplex</i> e <i>multiplex</i> de PCR em tempo real com <i>Mastermix</i> e <i>primers</i> fornecidos pelo IBMP.....	54
Figura 17 –	Gráfico de amplificação mostrando a eficiência e a sensibilidade para amplificação do alvo 16S em reação <i>multiplex</i> utilizando o <i>Mastermix</i> do IBMP.....	55
Figura 18 –	Modelo de curva de amplificação na PCR em tempo real.....	56

Figura 19 – Planilha construída para obtenção da quantidade de genomas de <i>M. leprae</i> presentes nas amostras de pacientes e suspeitos.....	57
Figura 20 – Resultado de PCR em tempo real analisando amostras de pacientes utilizando o <i>Mastermix</i> do IBMP para reação <i>multiplex</i> (alvos 16S e 18S2).....	58
Figura 21 – Resultado de PCR em tempo real analisando amostras de pacientes com hanseníase confirmada utilizando o <i>Mastermix</i> do IBMP para reação <i>multiplex</i> (alvos 16S e 18S2).....	60
Figura 22 – Resultado de PCR em tempo real analisando amostras de pacientes com outras dermatoses utilizando o <i>Master Mix</i> do IBMP para reação <i>multiplex</i> (alvos 16S e 18S2).....	62
Figura 23 – Resultado de PCR em tempo real analisando amostras contendo DNA de diferentes bactérias utilizando o <i>Mastermix</i> do IBMP para reação <i>multiplex</i> (alvos 16S e 18S2).....	63
Figura 24 – Resultado de PCR em tempo real analisando amostras da curva padrão em replicatas demonstrando a reprodutibilidade da sensibilidade obtida com o sistema desenvolvido.....	64
Figura 25 – Curva padrão e análise de regressão linear para o <i>multiplex</i> 16S rRNA/18S2.....	65
Figura 26 – Curva ROC (Receiver Operating Characteristic curve) do alvo 16S rRNA.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Valores médios de Ct obtidos através de experimentos conduzidos em duplicata. Nessas amplificações foram avaliadas as amostras da curva padrão diluída em sangue utilizando diferentes concentrações de <i>primers</i> e sonda do 16S e as concentrações padrões do 18S2.....	53
Tabela 2 –	Ct médio obtido a partir da quantidade de DNA de <i>M. leprae</i> constituintes da curva padrão da PCR em tempo real com o Sistema Taqman.....	55
Tabela 3 –	Lista das outras dermatoses diagnosticadas nos pacientes atendidos no ASA e que foram utilizadas para compor o banco de amostras negativas.....	61
Tabela 4 –	Lista de isolados bacterianos que foram utilizados para compor o banco de amostras negativas.....	61
Tabela 5 –	Parâmetros considerados para a análise e os resultados obtidos através da curva padrão para o sistema <i>multiplex</i> (16S + 18S2).....	66
Tabela 6 –	Resultados obtidos a partir da árvore de decisão gerada para o alvo bacteriano presente no <i>multiplex</i> (16S + 18S2) e que devem ser usados como parâmetros para o diagnóstico de hanseníase.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C.	Antes de Cristo
ASA	Ambulatório Souza Araújo
BAAR	Bacilo álcool-ácido resistente
BB	<i>Borderline borderline</i>
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
BL	<i>Borderline</i> lepromatoso
BT	<i>Borderline</i> tuberculoide
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio imunoenzimático
ENH	Eritema nodoso hansênico
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HIV	Human Immunodeficiency Virus (Vírus da imunodeficiência humana)
I	Indeterminada
IB	Índice baciloscópico
IBMP	Instituto de Biologia Molecular do Paraná
IgM	Imunoglobulina M
ILB	Índice logarítmico de biópsia
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
LAHAN	Laboratório de Hanseníase
LAM	Lipoarabinomanana
LM	Lipomanana
LL	Lepromatoso lepromatoso
MB	Multibacilar
MDT	Multidroga terapia
<i>M. leprae</i>	<i>Mycobacterium leprae</i>
MS	Ministério da Saúde
NP	Neural pura
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
PB	Paucibacilar

PCR	Reação em cadeia da polimerase
PGL-1	Glicolípídeo fenólico-1
PQT	Poliquimioterapia
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RJ	Rio de Janeiro
rpm	Rotações por minuto
rRNA	RNA ribossômico
RR	Reação reversa
SUS	Sistema Único de Saúde
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
WHO	<i>World Health Organization</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
mm ³	Milímetro cúbico
fg	Fentograma
ng	Nanograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
±	Mais ou menos

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	17
1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
1.1	Aspectos históricos.....	19
1.2	Epidemiologia.....	22
1.3	<i>Mycobacterium leprae</i>.....	25
1.4	Transmissão.....	28
1.5	Classificação.....	30
1.6	Tratamento.....	32
1.7	Diagnóstico.....	33
1.7.1	<u>Baciloscopia e Histopatologia.....</u>	34
1.7.2	<u>Sorologia.....</u>	35
1.7.3	<u>Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real.....</u>	37
1.7.3.1	Detecção de <i>M. leprae</i> por qPCR.....	38
2	JUSTIFICATIVA.....	40
3	OBJETIVOS	42
3.1	Objetivo Geral.....	42
3.2	Objetivos Específicos	42
4	MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1	Coleta e armazenamento das amostras	43
4.2	Extração de DNA	43
4.3	Quantificação de DNA.....	44
4.4	Detecção de DNA de <i>M. leprae</i> utilizando PCR em tempo real.....	44
4.5	Padronização do Kit	45
4.6	Validação do Kit	45
4.7	Análise estatística.....	45
5	RESULTADOS	47
5.1	Padronização do Kit.....	47
5.2	Validação do Kit.....	58
5.3	Elaboração de um protocolo operacional padrão (POP).....	67
6	DISCUSSÃO.....	69

CONCLUSÕES.....	76
REFERÊNCIAS.....	77
APÊNDICE – Procedimento Operacional Padrão (POP).....	89
ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética.....	125
ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido dos Contatos (TCLE).....	130
ANEXO C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido dos Pacientes (TCLE).....	133

INTRODUÇÃO

Mycobacterium leprae é o agente causador da hanseníase e foi identificado em 1873, em lesões de pacientes, por Gerhard Henrik Armauer Hansen. Esse é um patógeno intracelular obrigatório que tem tropismo por células de Schwann nos nervos periféricos e por macrófagos da pele (RIDLEY; JOPLING, 1966). Em virtude disso, as principais manifestações clínicas da doença incluem lesões de pele, mucosas e nervos, sendo a infecção do tecido nervoso responsável pela perda de sensibilidade local típica da doença (BRITTON; LOCKWOOD, 2004). O fato do bacilo não ser cultivado *in vitro* dificulta as estratégias clássicas de diagnóstico baseadas em testes bacteriológicos ou histopatológicos.

Estima-se que aproximadamente 250.000 casos novos de hanseníase sejam detectados anualmente no mundo, sendo o Brasil o segundo país em números totais de casos e o primeiro entre as Américas. Em 2016, segundo a Organização Mundial de Saúde, o país apresentou uma taxa de detecção de mais de 25 mil casos novos (12,23/100.000 habitantes). Destes, 1.696 casos (6,8%) correspondiam a indivíduos menores de 15 anos, coeficiente que indica alta transmissibilidade. Além disso, do total de casos novos detectados, 1.736 casos (7,9%) já tinham grau de incapacidade 2, o que indica um diagnóstico tardio, conforme a World Health Organization (WHO, 2017).

De acordo com a literatura, os contatos domiciliares de pacientes com hanseníase apresentam um risco maior de adoecimento se comparados à população em geral. Por isso, a vigilância epidemiológica desse grupo representa a melhor estratégia de detecção precoce da doença (de MATOS et al., 1999; SALES et al., 2011; GILLINI et al., 2017).

A hanseníase se destaca como uma das doenças infecciosas que ainda representam um grave problema de saúde pública no Brasil. Isso se deve principalmente ao número relevante de casos, sua incidência constante ao longo dos últimos 10 anos e a alta taxa de morbidade em função do dano neural que acomete pelo menos 30% dos doentes (WHO, 2017).

A hanseníase, por ser uma doença negligenciada infecciosa crônica e com um longo período de incubação, torna-se uma enfermidade de difícil diagnóstico. Nesse sentido, nos últimos anos, muitos estudos foram realizados usando a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) com o objetivo de detectar DNA de *M. leprae* em amostras clínicas e, assim, apoiar os exames tradicionais de diagnóstico. Nesse contexto, diversas metodologias foram descritas envolvendo diferentes sequências e genes alvos para amplificação de DNA do

bacilo (SANTOS et al., 1993; SCOLLARD et al., 1998; MARTINEZ et al., 2006, 2011, 2014; da SILVA MARTINEZ et al., 2011; REIS et al., 2014).

Alguns autores compararam o uso de diferentes iniciadores e técnicas de PCR na tentativa de estabelecer o método mais sensível e específico (DONOGHUE et al., 2001; MARTINEZ et al., 2011). Entre eles estão estudos do nosso grupo como o desenvolvido por Martinez et al. (2011). Neste trabalho foram avaliadas a especificidade e a sensibilidade de quatro diferentes alvos (RLEP, 16S rRNA, Ag 85B e sodA) utilizando a técnica de PCR quantitativo (qPCR) para o diagnóstico diferencial da hanseníase. Os resultados obtidos demonstraram que os ensaios baseados nos alvos 16S rRNA e Ag85B, embora um pouco menos sensíveis que o RLEP, apresentaram uma especificidade de 100%. Estes dados corroboram com o trabalho de Goulart e Goulart (2008), que indica que entre todos os genes alvos usados para o diagnóstico de hanseníase descritos na literatura, três apresentam alta especificidade e sensibilidade, sendo eles: RLEP, Ag85B e 16S rRNA.

Desde o ano de 2011, a PCR em tempo real, utilizando alguns dos alvos descritos na literatura, tais como Ag85B, RLEP e principalmente o 16S rRNA (MARTINEZ et al., 2011), vem sendo utilizada no Laboratório de Hanseníase da FIOCRUZ para detecção de DNA de *Mycobacterium leprae*. Assim, a sua utilização na rotina de diagnóstico de hanseníase, principalmente nos casos de difícil detecção (suspeitos paucibacilares e/ou na forma neural) e em contatos domiciliares, tem sido demonstrada.

Neste contexto, o presente estudo propôs desenvolver um sistema de qPCR para a detecção de DNA de *M. leprae* utilizando um sistema *multiplex* constituído de reagentes nacionais, tão eficiente quanto o comercial, porém menos custoso. Assim, o sistema poderia ser usado na rotina diagnóstica de todos os centros de referência em hanseníase no território nacional. Para isso, foi necessário a realização de etapas de padronização, construção de protocolo operacional padrão (POP), testes de controle de qualidade e de eficiência (teste de especificidade, sensibilidade e acurácia) do mesmo.

O desenvolvimento desse sistema foi realizado em parceria com o Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP - FIOCRUZ), que já possui experiência no desenvolvimento e produção de outros testes de diagnósticos como do HIV e ZDC (zika, dengue e chikungunya).

Espera-se que os resultados desse projeto gerem não somente um produto de diagnóstico para a hanseníase no país, mas que também ajudem a solucionar casos de difícil detecção, agindo de forma a interromper precocemente a cadeia de transmissão, e assim atuando diretamente na epidemiologia da doença.

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Aspectos históricos

A hanseníase é uma doença milenar e muitos autores a consideram como uma das enfermidades mais antigas conhecidas pela humanidade. As primeiras evidências históricas sobre a doença são provenientes de textos antigos que remetem à sua existência na Índia, China e no Egito, cerca de 600 anos a.C. Nesse mesmo período, foram encontrados no Egito restos de esqueletos humanos que evidenciavam características da hanseníase (BROWNE, 1970; ROBBINS et al., 2009).

A denominação da doença foi em homenagem ao médico norueguês Gerhard H. A. Hansen, que identificou o bacilo *Mycobacterium leprae* como agente etiológico, sendo esta a primeira bactéria associada à uma doença em humanos (IRGENS, 2002). Esta descoberta foi a primeira sugestão de que uma enfermidade humana estaria ligada à presença de um agente etiológico de natureza infecciosa. Assim, iniciou-se a era do pensamento científico em relação à identificação de agentes causais, à existência de transmissão, ao contágio, à prevenção e ao tratamento das enfermidades (SKINSNES, 1973). Esta doença, historicamente, era conhecida pelo termo lepra, derivado do latim “lepros” que significa escamoso, sendo associada ao pecado, à impureza e à desonra. Entretanto, em 1976, no Brasil, devido ao forte estigma social e à conotação pejorativa, este termo foi substituído por hanseníase. Todavia, apenas em 1995, a partir da lei federal 1.010 / 95, foi proibida definitivamente a utilização do termo lepra (TRAUTMAN, 1984).

A literatura relata que a hanseníase era muitas vezes confundida com doenças venéreas e outras dermatologias. Acreditava-se que a sua transmissão ocorria pelo contato sexual, e por isso, estaria relacionada ao pecado, gerando tanto preconceito e estigma (ANDRADE, 1996; HANSENÍASE, 2013). Dessa maneira, os indivíduos, ao ficarem doentes, eram enviados às colônias, denominadas de leprosários, ou excluídos da sociedade (Figura 1), pois a enfermidade era vinculada aos símbolos negativos como castigo divino ou impureza.

Figura 1 – Colônia de pacientes hansenianos localizada no território do Acre



Legenda: Leprosário Souza Araújo, o mais modesto do país, fundado em 1930.
Fonte: HERÁCLIDES CÉSAR DE SOUZA-ARAÚJO, 1930.

Como não havia cura naquela época e por medo de contágio, os doentes eram proibidos de entrar em igrejas e tinham que usar vestimentas especiais e carregar chocalhos, alertando as pessoas do “perigo” representado por sua doença (Figura 2) (HANSENÍASE, 2013).

Figura 2 – Cristão socorrendo um paciente hanseniano



Nota: Entalhe em madeira, de artista não identificado, Frankfurt, 1571. Atente-se para o “chocalho” preso ao cinto do doente.

Fonte: MEDICINE Man. The forgotten Museum of Henry Wellcome. 2003.

Segundo Browne (1970), a hanseníase supostamente originou-se na Índia e chegou na Europa através dos soldados gregos que regressavam da campanha indiana de Alexandre, o Grande. Acredita-se que, a partir da Grécia, a doença se espalhou pela bacia do Mediterrâneo, tendo os romanos como responsáveis por carregá-la até a parte ocidental da Europa. Sugere-se que, a partir da Índia, a doença também se espalhou da China ao Japão, chegando as Ilhas do Pacífico, como a Nova Caledônia. Contudo, pouco se sabe a respeito de sua presença na África sub-saariana, exceto que a doença estava presente anteriormente a era colonial.

Estudos mais recentes com base na genômica comparativa de *M. leprae* utilizando diferentes amostras de pacientes oriundos das diversas regiões do mundo sugerem que a doença tenha se originado na África Oriental ou perto do Oriente e se dispersado através de sucessivas migrações humanas. Acredita-se, que a hanseníase tenha finalmente chegado na África Ocidental e nas Américas sendo introduzida pelos norte-africanos ou europeus no período das grandes colonizações, sendo o tráfico de escravos o maior fator de disseminação (TALHARI; NEVES, 1997; MONOT et al., 2005; SCHUENEMANN et al., 2013).

Em 1600, foram observados os primeiros casos da doença na cidade do Rio de Janeiro, Brasil, se espalhando por vários pontos do litoral. Como estratégia para evitar a propagação da doença, anos depois, em 1929, foi construído o primeiro leprosário, chamado de Hospital/Colônia Curupaiti situado em Jacarepaguá, que seria destinado a abrigar e isolar os doentes (ANDRADE, 1996; EIDT, 2004). Entretanto, até o início do século XX, a hanseníase era endêmica em grande parte das regiões brasileiras e propagava-se facilmente, devido a ausência de controle, ao atraso da medicina em diagnosticar, acompanhar e tratar os doentes adequadamente, além das precárias condições de vida da população (NASCIMENTO; RODRIGUES, 2010).

Em 1920, Carlos Chagas criou o Departamento Nacional de Saúde Pública, com o intuito de organizar uma atividade sanitária para o combate da hanseníase, pois até então, a doença era negligenciada e se tornava um grave problema (ANDRADE, 1996). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a hanseníase é uma das doenças negligenciadas de maior interesse no cenário brasileiro, e ainda compõe uma das prioridades de ação do "Programa de Doenças Negligenciadas" do Ministério da Saúde (BRASIL, 2010a).

Devido a sua incidência e prevalência, importância econômica e social, morbidade e cronicidade, e também por ser uma doença transmissível, com possibilidade de tratamento e de controle, a hanseníase está incluída no grupo de doenças infecciosas de notificação obrigatória. A enfermidade acomete predominantemente pessoas em idade produtiva, ocasionando elevados custos econômicos relacionados ao tratamento e à reabilitação. Dessa

maneira, sua prevenção depende da eficácia de ações de diagnóstico precoce e tratamento, pois ainda não há uma vacina própria (PENNA et al., 2011).

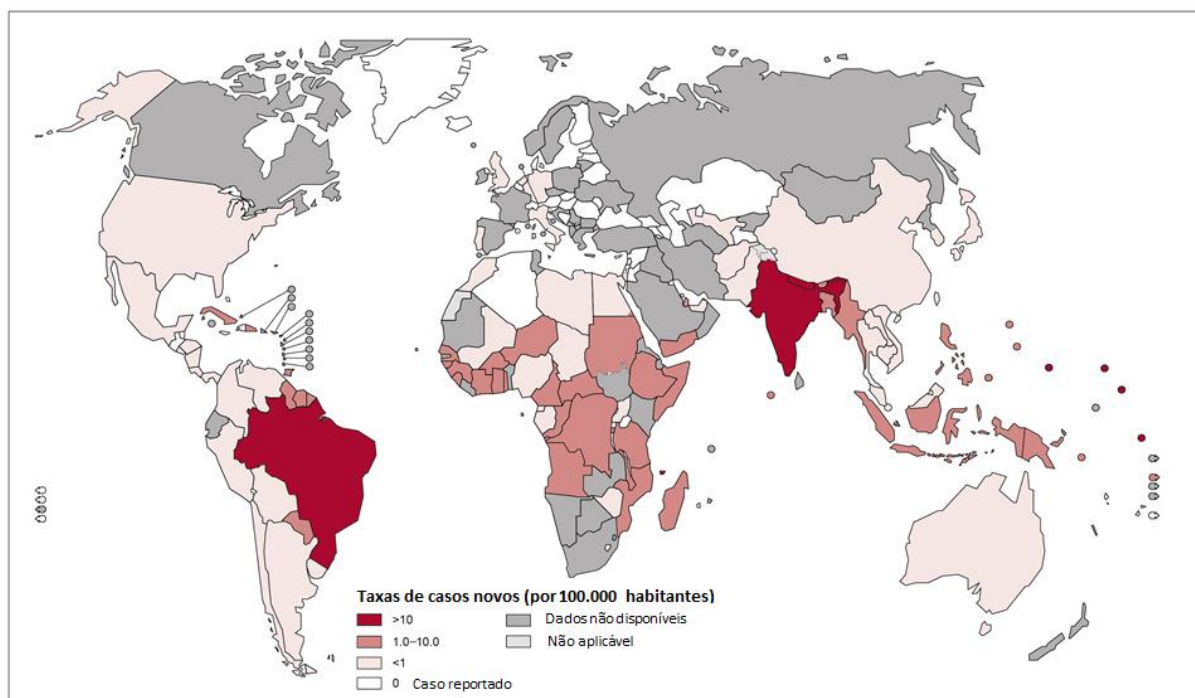
1.2 Epidemiologia

Apesar da disponibilidade de medicamentos, do sucesso no tratamento quando bem feito e da redução de novos casos, a hanseníase persiste como um problema de saúde pública em países em desenvolvimento. Em 1991, a resolução da 44ª Assembléia Mundial de Saúde, definiu como eliminação da hanseníase a prevalência de registro abaixo de 1 caso para 10.000 habitantes, meta programática que deveria ter sido alcançada pelos países endêmicos até 2000 (NOORDEEN, 1995). Porém, segundo a OMS, quatorze anos depois do previsto para a sua eliminação, foram registrados mais de 213 mil casos de hanseníase (WHO, 2015).

A alta endemicidade está correlacionada com os baixos níveis de desenvolvimento socioeconômico. Aproximadamente 94% do total de casos novos foram detectados em apenas 13 países, sendo o Brasil um deles. Os dados da agência da Organização das Nações Unidas (ONU) mostram ainda que Brasil, Índia e Indonésia juntos foram responsáveis por 81% dos casos da doença em todo o mundo (WHO, 2015).

Já no ano de 2016, um total de 214.783 novos casos (Figura 3) de hanseníase foram registrados no mundo, com uma prevalência de 0,29/10.000 habitantes. A Índia foi responsável por 135.485 (63%) casos da doença e o Brasil apresentou-se em segundo lugar com 25.218 (12%) casos novos no mundo. O número de novos casos indica o grau de transmissão contínua da infecção. As estatísticas globais mostram que 199.992 (94%) de novos casos de hanseníase foram relatados em 14 países com mais de 1.000 novos casos cada e apenas 6% dos novos casos foram reportados no resto do mundo (WHO, 2017).

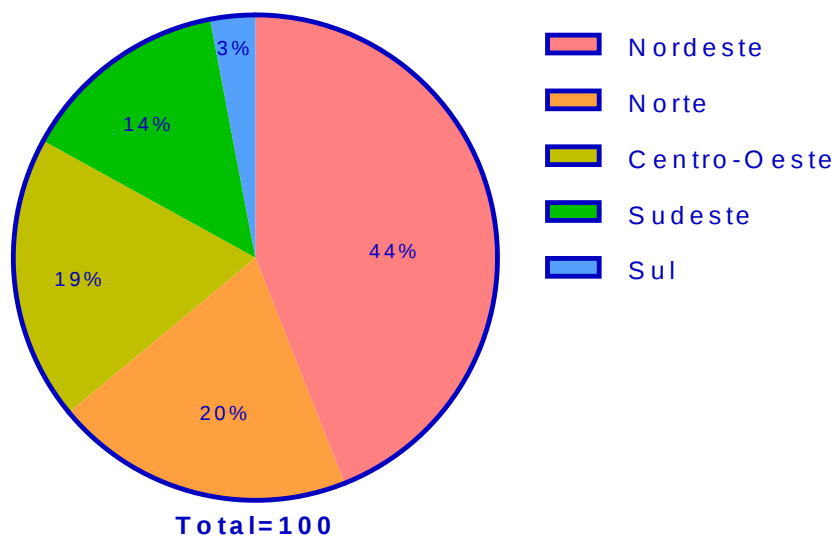
Figura 3 – Taxa de incidência mundial de hanseníase reportadas à OMS, no início do ano de 2017, referentes ao ano anterior



Fonte: Adaptado de WHO, 2017.

Assim como ocorre em todo o mundo, as taxas de incidência e prevalência da hanseníase no Brasil também estão relacionadas com o nível de desenvolvimento social de cada região. Em 2016, a região Nordeste apresentou 44% (n=10.984) dos novos casos no Brasil, seguida das regiões Norte com 20% (n=5.092), Centro-Oeste com 19% (n=4.701), Sudeste com 14% (n=3.601) e Sul com 3% (n=836), conforme observado na Figura 4. Ainda neste ano, o Brasil apresentou um coeficiente de prevalência de 1,10 casos para cada 10.000 habitantes. Há um contínuo decréscimo no coeficiente de detecção da hanseníase, em virtude da crescente expansão do número de unidades de saúde com pacientes em tratamento (BRASIL, 2017a).

Figura 4 – Taxa de incidência da hanseníase por regiões do Brasil no ano de 2016

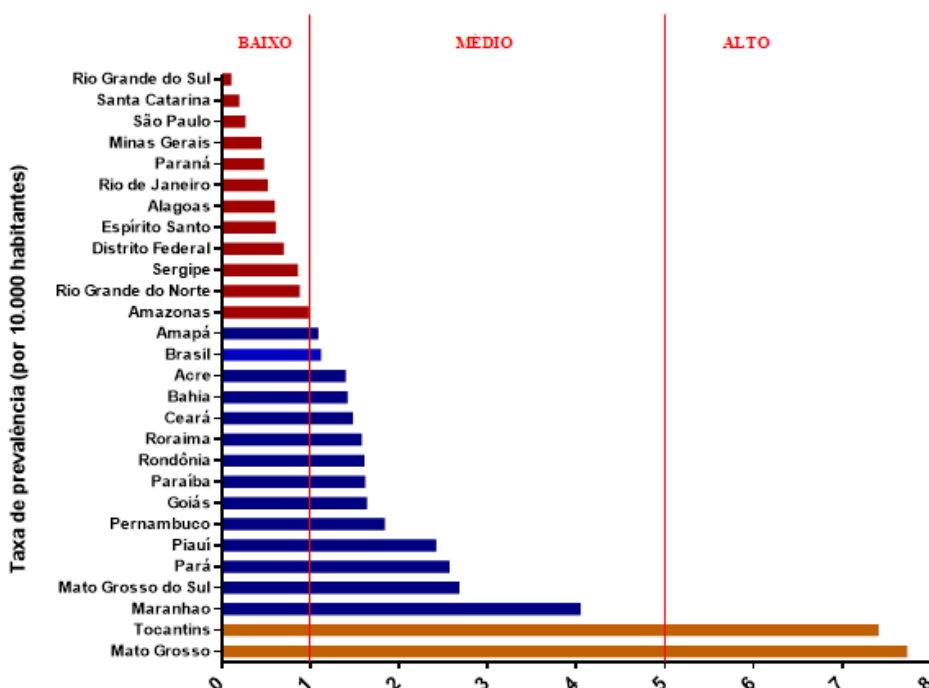


Fonte: Adaptado de BRASIL, 2017a.

Segundo dados do Ministério da Saúde (BRASIL, 2017a), há uma maior taxa de incidência da doença nos homens do que nas mulheres, 72,3% e 44,2%, respectivamente. Neste mesmo ano, foram registrados 1.696 casos novos de hanseníase em menores de 15 anos e um coeficiente de detecção desse grupo de 3,63 por 100.000 habitantes. A manifestação da doença nessa faixa etária indica alta endemicidade, sendo a redução de casos nesta população uma das prioridades da secretaria de vigilância epidemiológica do Ministério da Saúde (BRASIL, 2017a).

O coeficiente de prevalência de hanseníase do Brasil, indicador utilizado para monitorar o progresso da eliminação dessa doença enquanto problema de saúde pública, vem sofrendo redução progressiva nos últimos anos. Apesar da drástica redução no número de casos registrados nas últimas duas décadas, a incidência da doença tem caído lentamente. No Brasil, há tendência de redução da endemia, mas ainda há alta concentração nas regiões Centro-Oeste, Norte e em alguns estados da região Nordeste. Os estados de Mato Grosso, Tocantins e Maranhão apresentaram coeficiente de prevalência alto (entre 4,03 e 7,71 casos por 10 mil habitantes), enquanto todos os estados da região Sul, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo, na região Sudeste, somados ao Rio Grande do Norte, no Nordeste alcançaram a meta de eliminação da hanseníase enquanto problema de saúde pública (Figura 5) (BRASIL, 2017a).

Figura 5 – Taxas de prevalência da hanseníase no Brasil no ano de 2016



Nota: As taxas de prevalência correspondem a cada 10.000 habitantes. Em destaque os Estados do Tocantins e Mato Grosso apresentando os maiores índices de prevalência da doença no país.

Fonte: Adaptado de BRASIL, 2017a.

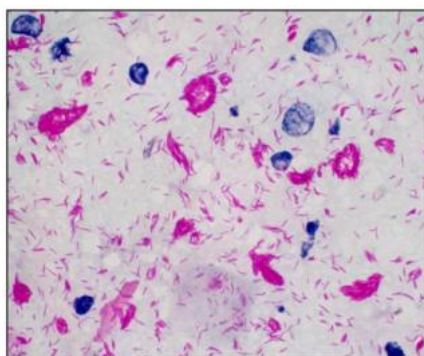
Em 2016, a OMS lançou a estratégia global para acabar com a hanseníase até o ano de 2020. Assim, espera-se reduzir a zero o número de crianças diagnosticadas com a doença e outras deformidades físicas associadas ao problema, além de diminuir o ritmo de novos casos para menos de um para cada um milhão de pessoas. A ONU quer que os países assumam compromissos mais fortes e acelerem os esforços para pôr um fim à transmissão, assim como à discriminação e ao estigma da doença (WHO, 2016).

1.3 *Mycobacterium leprae*

Em 1873, o médico norueguês Gerhard Henrik Amauer Hansen identificou o agente etiológico da hanseníase, o *Mycobacterium leprae*. Esta descoberta só foi reconhecida internacionalmente em 1880 quando a bactéria passou a ser conhecida como o “Bacilo de Hansen” (VOGELSANG, 1978). Assim como outras micobactérias, o bacilo é considerado

álcool-ácido resistente (BAAR), já que se cora em vermelho pela fucsina (Figura 6) e é resistente à descoloração mesmo após ser lavado com uma solução contendo álcool e ácido (método Ziehl-Nilsen) (SAMPAIO; RIVITTI, 1998). Em cortes histopatológicos, os bacilos podem se apresentar de forma isolada ou em aglomerados compactos, chamados de globias, nestas os bacilos se encontram fortemente ligados por material gelatinoso (RESS, 1985).

Figura 6 – Fotomicrografia de esfregaço de raspado intradérmico



Nota: Bacilos de *Mycobacterium leprae* corados em vermelho pela fucsina através do método de Ziehl-Nilseen. Aumento de 1000x.
Fonte: ALBUQUERQUE, 2012.

O *M. leprae* é uma bactéria gram-positiva, encontrado na forma de bastonete reto ou ligeiramente encurvado, possui lados paralelos e extremidades arredondadas, de 1,0 a 8,0 micra de comprimento por 0,3 a 0,5 micra de largura (RESS, 1985; REIBEL et al., 2015). O bacilo possui tempo de crescimento lento, sendo um parasito intracelular obrigatório, com predileção pelas células de Schwann nos nervos periféricos e macrófagos da pele, podendo também ser encontrado em células epiteliais (RESS, 1985; SCOLLARD et al., 2006).

Apesar de inúmeras tentativas, o bacilo não é cultivado *in vitro*, mas se reproduz em modelos experimentais como o camundongo e o tatu (PEDRINI et al., 2010). Nestes animais, o microrganismo multiplica-se por divisão binária, com ciclos em torno de 14 dias (SHEPARD; HABAS, 1967). A temperatura ótima de crescimento de *M. leprae* é abaixo de 37° C, o que pode explicar a sua predileção por áreas superficiais do corpo como a pele e nervos periféricos (SHEPARD, 1965).

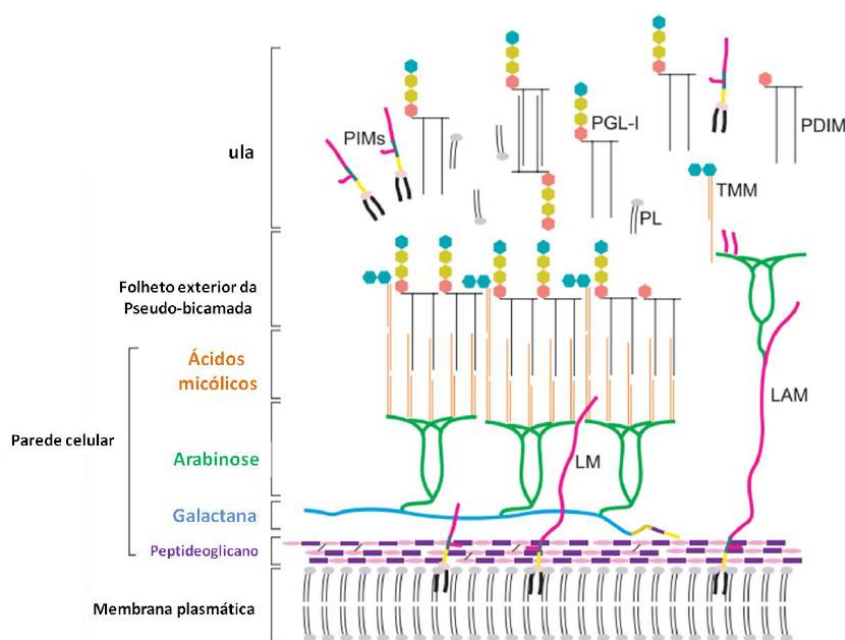
O genoma do *M. leprae* possui uma vasta quantidade de pseudogenes, chegando a ocupar quase a metade de seu cromossomo. Essa enorme perda de função gênica é relatada

como a principal causa da baixa taxa de replicação do bacilo e impossibilidade de cultivo *in vitro* (MONOT et al., 2009).

Esse bacilo é capaz de infectar grande número de indivíduos (BARRETO et al., 2012), todavia, devido à sua baixa patogenicidade, somente uma pequena parcela da população desenvolve sinais e sintomas clínicos de hanseníase (GOULART; GOULART, 2009).

A parede celular micobacteriana possui características ímpares, sendo impermeável a diversos compostos, o que gera resistência a inúmeras drogas. O envoltório celular de *M. leprae* é formado por uma membrana plasmática na porção mais interna, seguida de uma camada de peptideoglicanos covalentemente ligada a arabinogalactana. Os ácidos micólicos estão ligados nas porções terminais de arabinose da arabinogalactana e a camada mais externa é composta por lipopolissacarídeos livres, glicolípídeos e fosfolípídeos (Figura 7).

Figura 7 – Estrutura esquemática da parede celular de *M. leprae*



Nota: A membrana plasmática de *M. leprae* é envolvida por uma parede celular composta de peptidoglicano ligada covalentemente a arabinogalactana. Nesse arranjo pode ser encontrado os componentes como lipomanana (LM) e lipoarabinomanana (LAM). Ácidos micólicos estão ligados nas porções terminais de arabinose. Na porção mais externa do envelope celular são encontrados: monomicolato trealose (TMM), glicolípídeo fenólico 1 (PGL-1), monossídeos fosfatidilinositol (PIMs), dimicocerosato ftiocerol (PDIM) e fosfolípídeos (PL).

Fonte: Adaptado de VISSA; BRENNAN, 2001.

A cápsula possui ainda glicolipídeos, onde o mais abundante é o glicolipídeo fenólico 1 (PGL-1), presente somente em *M. leprae*, e assim conferindo especificidade imunológica a esse patógeno (HUNTER; BRENNAN, 1981). O PGL-1 atualmente é bastante utilizado e vem sendo de grande importância para ensaios e desenvolvimento de técnicas para diagnóstico precoce de infecção, desde sua descoberta, em 1981 (VISSA; BRENNAN, 2001).

1.4 Transmissão

Ainda não se sabe exatamente como a hanseníase é transmitida, sendo necessários mais estudos sobre a dinâmica da transmissão da doença. Entretanto, acredita-se que o contágio ocorra de um indivíduo contaminado para um sadio através da eliminação do bacilo proveniente do muco nasal e de gotículas do trato respiratório, sob a forma de aerossóis. Dessa forma, as vias aéreas superiores são a principal porta de entrada e via de eliminação da bactéria (SHEPARD, 1962; PATROCÍNIO et al., 2005; MARQUES et al., 2018). Os pacientes multibacilares, indivíduos com a doença ativa, são considerados a principal fonte de infecção (JOB et al., 2008). Todavia, também existem relatos de casos em que a infecção ocorreu pela penetração do bacilo através da pele, especialmente após tatuagens e outros traumatismos (GHORPADE, 2002; BRANDSMA et al., 2005; GHORPADE, 2009); assim como registros de contaminação por fluidos corporais, tais como leite, sêmen, suor e secreções vaginais. Entretanto, estes não possuem significância epidemiológica na disseminação da infecção (VAN BEERS et al., 1996; TALHARI; NEVES, 1997).

Nos Estados Unidos, a infecção natural de tatus da espécie *Dasypus novemcinctus* é bastante frequente. A doença é considerada uma zoonose e há relatos de casos de infecção em humanos a partir do contato com esses animais (JOB et al., 1986; TRUMAN, 2005; TRUMAN et al., 2011; BALAMAYOORAN et al., 2015; SHARMA et al., 2015). Outros estudos mostram também que animais como esquilos, chimpanzés e macacos têm sido diagnosticados com hanseníase adquirida naturalmente, entretanto, esses animais não parecem atuar como fontes de infecção para os seres humanos (WALSH et al., 1986; WALSH et al., 1988; STINEAR; BROSCHE, 2016). Além disso, alguns autores sugerem também que o *M. leprae* é capaz de sobreviver na água (MATSUOKA et al., 1999; ARRAES et al., 2017), nas plantas (KAZDA et al., 1980, 1981; MOSTAFA et al., 1995), no solo (KAZDA et al., 1986; BLAKE et al., 1987; LAVANIA et al., 2008), em insetos (SAHA et al., 1985; SREEVATSA,

1993; NEUMANN et al., 2016), nos peixes (HUTCHINSON, 1906; COURET, 1911; CHAUSSINAND, 1951; MADIGAN et al., 2017), em primatas (GORMUS et al., 1998; HONAP et al., 2018), no ambiente (DESIKAN, 1977; TRUMAN et al., 2010) e até em amebas (LAHIRI; KRAHENBUHL, 2008; WHEAT et al., 2014).

Sabe-se que os pacientes lepromatosos, aqueles que possuem o sistema imune incapaz de controlar a proliferação da bactéria, ocorrendo uma manifestação grave e contagiosa da doença, caracterizada pela presença de 6 ou mais lesões de pele muito bacilíferas, podem abrigar elevada carga bacteriana, com até 7.000 milhões de bacilos em um grama de tecido; já as outras formas da doença apresentam carga bacilar bem menor, da ordem de um milhão de bacilos no total (SALES et al., 2011). Indivíduos com infecções subclínicas possuem um papel importante na dinâmica de transmissão do *M. leprae* (HATTA et al., 1995; BEYENE et al., 2003). Assim, o contato prolongado com pacientes não tratados é um fator determinante e de grande importância para a transmissão do bacilo. Vários estudos demonstram que o risco de contrair a doença é maior para os contatos que convivem ou residem com esses pacientes (DOULL et al., 1946; VAN BEERS et al., 1999; SALES et al., 2011).

Em 2010, Martins et al. buscaram detectar material genético de *M. leprae* em raspados bucais de pacientes com hanseníase e seus contatos, com o intuito de avaliar o envolvimento da mucosa oral na transmissão da doença. Quando os pacientes foram agrupados de acordo com o tipo de coleta da amostra (raspados nasal, bucal ou ambos), os considerados paucibacilares apresentaram uma maior frequência de DNA de *M. leprae* em raspados bucais; enquanto que para aqueles considerados multibacilares a detecção de DNA do bacilo foi mais frequente em raspados nasais. Essa foi a primeira evidência de que a mucosa oral, principalmente em indivíduos paucibacilares, pode ter uma importante implicação para a transmissão do bacilo. Entre os contatos domiciliares analisados no estudo, aproximadamente 7% apresentaram positividade para a detecção de DNA de *M. leprae*. Isso reforça a ideia de que contatos domiciliares podem estar carregando o bacilo e, possivelmente, representem uma outra fonte ativa de infecção, fazendo, desta forma, parte da cadeia de transmissão da hanseníase (MARTINS et al., 2010).

Entre o grupo de contatos domiciliares estão os parceiros conjugais, que costumam ter um convívio íntimo e prolongado com os pacientes, o que permite a transferência de organismos entre os indivíduos. Como dito anteriormente, um paciente multibacilar libera diariamente milhões de bacilos, fazendo com que seu cônjuge fique exposto a uma maior carga bacilar quando comparado com outras pessoas da família que não compartilham um contato íntimo. Todavia, foi relatada que a taxa de transmissão da doença entre parceiros

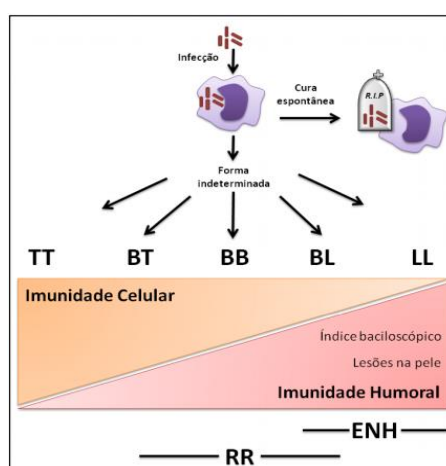
conjugais é menor do que a taxa determinada para os familiares consanguíneos que vivem na mesma residência. Dados como esse demonstram que não só a exposição ao bacilo mas também a suscetibilidade genética do indivíduo interferem no risco de adoecimento (DURÃES et al., 2010).

1.5 Classificação

Em 1953, no VI Congresso Internacional de Hanseníase, realizado na cidade de Madri, na Espanha, foi recomendada uma forma de classificação para a doença, conhecida como classificação de Madrid, que distingue as formas clínicas em: lepromatosa (L) ou virchowiana (V), tuberculoide (T), indeterminada (I) e dimorfa (D) ou “borderline” (B). Sendo as formas lepromatosa e a tuberculoide consideradas os polos estáveis da doença (BRITTON; LOCKWOOD, 2004).

Ridley e Jopling, em 1966, também desenvolveram um sistema de classificação baseado em aspectos clínico-evolutivos, imunológicos, baciloscópicos e histológicos, que permitiu uma melhor compreensão da característica espectral da hanseníase (Figura 8) (RIDLEY; JOPLING, 1966).

Figura 8 – Formas clínicas da hanseníase



Legenda: Esquema que demonstra o perfil espectral da doença. Representação baseada na classificação de Ridley e Jopling, 1966: tuberculoide (TT), “borderline” tuberculoide (BT), “borderline borderline” (BB), “borderline” lepromatosa (BL), lepromatosa (LL). Estão incluídos aspectos da resposta imune do paciente e os episódios reacionais, denominados reação reversa (RR) e eritema nodoso hansênico (ENH), os quais acometem principalmente indivíduos das formas clínicas indicadas para cada tipo de episódio reacional.

Fonte: PINTO, 2013.

O princípio básico dessa classificação sustenta-se na resposta imune ao *M. leprae*, medida pelo teste cutâneo de lepromina (teste de Mitsuda) e nas avaliações histopatológica e bacteriológica. Esse sistema de classificação divide em 5 grupos os pacientes de acordo com fatores imunológicos: polo lepromatoso (LL), caracterizado por múltiplas lesões na pele e nos nervos com alta carga bacilar, devido a ineficiente resposta imune celular e predomínio da resposta imune humoral (tipo Th2), e reação negativa à lepromina; polo tuberculoide (TT), onde se encontram os casos que melhor respondem à infecção, menor número de lesões e que são raramente positivos na baciloscopia, exibindo uma melhor resposta imune celular (tipo Th1) e reação positiva à lepromina; os três grupos intermediários, denominados “borderline”, são definidos de acordo com a proximidade ao polo suscetível (“borderline” lepromatoso, BL) ou ao polo resistente (“borderline” tuberculoide, BT). O terceiro grupo “borderline borderline” (BB) situa-se entre esses dois últimos grupos. A forma indeterminada (I) foi também proposta como sendo um estágio inicial e transitório, no qual não se manifestam muitos sinais e sintomas, tão pouco há comprometimento neural grave. Os casos indeterminados podem progredir para uma das formas clinicamente estáveis (TT e LL) ou instáveis (BL, BB e BT) no espectro da doença ou até evoluir para a cura espontânea (OPROMOLLA; URA, 2002; BRITTON; LOCKWOOD, 2004).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu uma classificação simplificada, atualmente aceita em todo o mundo, com fins operacionais e terapêuticos, para o tratamento dos doentes. Em resumo, a classificação operacional divide os pacientes em dois grandes grupos: o paucibacilar (PB), onde se encontram os pacientes com 1 a 5 lesões, com uma resposta imune celular capaz de conter a disseminação do bacilo no organismo e que apresenta poucos bacilos; e o multibacilar (MB), no qual os pacientes possuem mais de 5 lesões e nenhuma resposta imune adequada para conter a disseminação da infecção, o que possibilita a proliferação do bacilo pelo organismo. Além disso, ficou estabelecido que o índice baciloscópico (IB) também deve ser usado para auxiliar na classificação. Assim, os pacientes com IB negativo (geralmente TT e BT) devem ser classificados no grupo PB, enquanto os com IB positivo (geralmente BB, BL e LL) considerados MB (BRASIL, 2002).

Frequentemente, após o início do tratamento poliquimioterápico (PQT), ocorrem os episódios reacionais, que acometem entre 15 e 50% dos pacientes com hanseníase e refletem o fenômeno de hipersensibilidade aguda diante dos antígenos de *M. leprae* (KAMATH et al., 2014). Esses episódios reacionais são caracterizados por uma agudização da doença, com surgimento de outras lesões na pele, reativação de lesões antigas, agravamento dos sintomas neurológicos e grave comprometimento do estado geral (JOPLING, 1970). Essas reações

ocorrem devido à uma exacerbação da resposta imune contra o bacilo, cuja causa e patogenia ainda não foram completamente desvendadas. Existem dois tipos básicos de reação: a reação reversa (RR) ou reação tipo I e o eritema nodoso hansênico (ENH), que é a reação tipo II. A RR resulta de uma súbita reativação da resposta imune celular. Esse tipo é mais comum em pacientes classificados como “borderline”, ou seja, nos pacientes do tipo BT, BB, BL. Já o ENH caracteriza-se por ser um estado reacional mais frequente em pacientes multibacilares, LL e BL (NERY et al., 1998). As reações da hanseníase representam um grave problema para o controle de incapacidades e deformidades neurais dos pacientes, pois cada vez que um episódio reacional se repete aumentam as injúrias ao sistema nervoso periférico, o que eleva a chance de lesões definitivas que ocasionam as deformidades físicas.

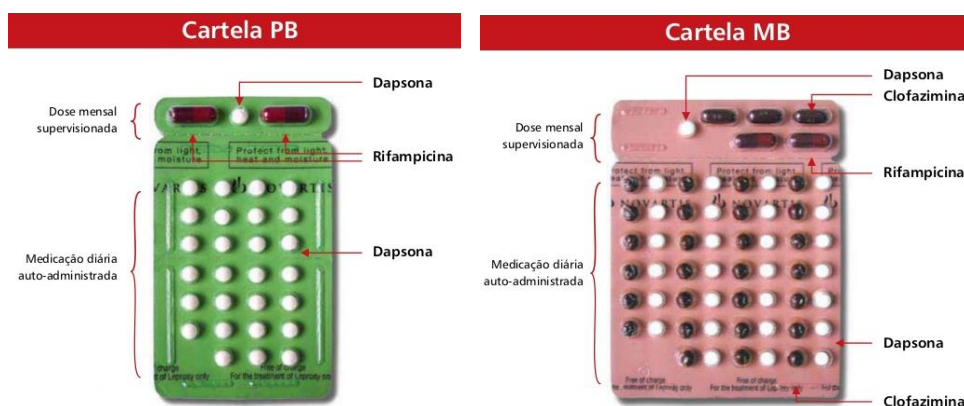
1.6 Tratamento

A literatura diz que, inicialmente, os pacientes com hanseníase eram tratados com óleo de chaulmoogra, medicamento fitoterápico natural da Índia, administrado através de injeções ou por via oral (OPROMOLLA, 1997). Atualmente acredita-se que os casos “curados” seriam aqueles que regrediram para cura de forma espontânea.

No final da década de 1940, a sulfona passou a ser utilizada no tratamento dos doentes, em virtude das pesquisas laboratoriais e dos avanços da indústria químico-farmacêutica. Assim, a dapsona foi o primeiro medicamento a ser empregado efetivamente contra a hanseníase (OPROMOLLA, 1997; da SILVA ROCHA, 2012; HANSENÍASE, 2013).

Muitos casos de resistência secundária e primária à dapsona (DDS) e também à rifampicina (RIF) vieram à tona em diversos países no fim da década de 70. A resistência secundária ou adquirida é resultante de um tratamento inadequado e geralmente acompanhada de melhora clínica inicial, com posterior piora; já a resistência primária se manifesta em indivíduos que ainda não receberam o tratamento. Neste caso, muito possivelmente, a infecção ocorreu a partir de bacilos provenientes de paciente com resistência secundária (JI, 1985). Devido a isso, em 1977, a OMS propôs uma junção de medicamentos (rifampicina, clofazimina e dapsona) para o tratamento da hanseníase. Somente em 1981, após avaliação de especialistas, ficou estabelecido o uso da poliquimioterapia (PQT ou MDT, do inglês: *multi-drug therapy*) como tratamento para as formas PB ou MB da doença (Figura 9).

Figura 9 – Medicamentos utilizados para o tratamento da hanseníase



Nota: Cartela verde destinada ao tratamento de pacientes paucibacilares adultos (à esquerda) e cartela vermelha para os pacientes multibacilares adultos (à direita).

Fonte: Adaptado de BRASIL, 2002.

A combinação dos remédios é recomendada com o intuito de evitar a resistência medicamentosa; reduzir a duração e os custos do tratamento, de modo a se tornarem compatíveis operacional e financeiramente com a implementação nos países endêmicos; aumentar a adesão do paciente e garantir a interrupção da cadeia epidemiológica da hanseníase, evitando as incapacidades (JI, 1985; WATERS, 1993; GROSSET, 2000).

A rifampicina é o fármaco mais importante da PQT e por isso é utilizada nos dois tipos de pacientes. Possui ação bactericida e é capaz de destruir, com uma única dose, 99,9 % das bactérias existentes em uma amostra, eliminando todas as subpopulações de *M. leprae* resistentes aos demais medicamentos (OPROMOLLA, 1997; HASTINGS, 1998; BRASIL, 2002; HANSENÍASE, 2013).

O portador de hanseníase recebe a denominada alta por cura, após a administração do número de doses preconizadas pelo esquema terapêutico. Assim, o paciente sai do registro ativo e não mais será computado nos coeficientes de prevalência da doença (BRASIL, 2017b).

1.7 Diagnóstico

O diagnóstico da hanseníase é primariamente clínico e laboratorial. Na ausência de recursos laboratoriais, o diagnóstico passa a ser essencialmente clínico, baseando-se em sinais, sintomas, anamnese, exame dermatoneurológico em busca de possíveis incapacidades

ou deformidades nos membros e história epidemiológica. A OMS estabelece que a hanseníase seja diagnosticada quando ocorre pelo menos um dos três sinais cardinais da doença: i) lesões ou manchas avermelhadas ou hipopigmentadas e/ou áreas com perda de sensibilidade; ii) espessamento de nervos com perda de sensibilidade e/ou fraqueza nos músculos enervados por estes; iii) baciloscopia positiva (BAAR) em amostra de esfregaço intradérmico (WHO, 2012). No entanto, nem todos os pacientes apresentam sinais ou sintomas claros da doença, dificultando assim seu diagnóstico.

Ao mesmo tempo que entende-se que um diagnóstico precoce é crucial para o controle da hanseníase e para a eliminação do estigma, sabe-se que muitos pacientes passam anos com os sinais e os sintomas da doença. Esses indivíduos são atendidos por médicos, na maioria das vezes dermatologistas, que não conseguem distinguir a enfermidade de outras dermatoses com sintomas muito parecidos. Quando diagnosticados, sobretudo tardiamente, os pacientes podem apresentar sequelas permanentes como incapacidades físicas e motoras (BRASIL, 2002).

1.7.1 Baciloscopia e Histopatologia

Em certos casos a utilização de ferramentas complementares, como exames baciloscópicos e histopatológicos, são necessárias para auxiliar a confirmação do diagnóstico e classificação clínica da doença. Devido à fácil execução e ao baixo custo, embora necessite de laboratório, profissionais experientes e habilitados para a sua execução, o exame baciloscópico de esfregaços cutâneos é considerado o exame complementar de maior utilidade no diagnóstico e deve ser realizado em todos os pacientes com suspeita clínica da hanseníase (SANTOS et al., 2017).

A baciloscopia é um exame que consiste na contagem de bacilos em microscópio óptico de campo claro (objetiva 100X) após a coloração do esfregaço pelo método de Ziehl-Nielsen. Nas formas paucibacilares, e em alguns pacientes multibacilares, o exame apresenta resultados negativos, entretanto, resultados positivos classificam o caso como multibacilar, independente do número de lesões apresentadas pelo paciente (BRASIL, 2010b). O exame, embora amplamente utilizado, demonstra uma alta especificidade, todavia, uma baixa sensibilidade (COCITO; DELVILLE, 1985). O índice baciloscópico (IB) proposto por Ridley e Jopling em 1962 é recomendado pelo Ministério da Saúde nos exames em pacientes

hansenianos. Este índice é realizado em 100 campos representativos e apresentado em escala logarítmica que varia de 0 a 6+ (RIDLEY; JOPLING, 1962).

A histopatologia é um exame utilizado tanto no diagnóstico para auxiliar na classificação das formas clínicas como para caracterizar os estados reacionais. Para os exames histopatológicos são utilizadas amostras de biópsias cutâneas da área da lesão ou do ramo sensitivo dos nervos periféricos. Nesses casos, os bacilos presentes nas amostras podem ser detectados pela coloração de Wade (COCITO; DELVILLE, 1985). Desse modo, o índice logarítmico da biópsia (ILB) segue os mesmos critérios do índice baciloscópico, exceto pelo fato de se levar em consideração o logaritmo da área ocupada pelos granulomas. Shepard e McRae (1968) mostraram que são necessários 104 organismos por grama de tecido para uma detecção eficaz. Devido às dificuldades operacionais para o seu uso, já que necessita de apoio de indivíduos com conhecimento em anatomia patológica, esse exame passou a ser considerado e executado apenas em centros especializados e nos que trabalham com pesquisa (FLEURY, 2005).

1.7.2 Sorologia

No início dos anos 80, o PGL-1 foi descrito como um glicolípídeo presente em abundância na parede de *M. leprae* e altamente antigênico, sendo um grande estimulador da produção de imunoglobulina do tipo M (IgM) (HUNTER; BRENNAN, 1981; HUNTER et al., 1982; CHO et al., 1983). Em seguida, foi demonstrado que ele também estava envolvido no processo patogênico da invasão de células de Schwann (NG et al., 2000) e na regulação negativa da resposta imune inflamatória, facilitando e permitindo a persistência do bacilo no organismo (SPENCER; BRENNAN, 2011).

O PGL-1 é um antígeno específico de *M. leprae* e pode ser facilmente encontrado na urina, sangue circulante e nos tecidos infectados de pacientes multibacilares; sendo responsável por iniciar uma resposta imune humoral precoce (HUNTER; BRENNAN, 1981; CHO et al., 1983). Estudos comprovam seu potencial em exames sorológicos da hanseníase até os dias atuais (PENNA et al., 2016; de MACEDO et al., 2018). Em pacientes MB a soropositividade anti-PGL-1 é alta, pois a titulação dos anticorpos é diretamente proporcional à carga bacilar (CHO et al., 2001). Já nos pacientes PB, que possuem raríssimos bacilos, a

sorologia anti-PGL-1 tem utilidade reduzida (LOBATO et al., 2011; SPENCER; BRENNAN, 2011).

Devido à essa especificidade imunológica, foi possível desenvolver ensaios como a técnica de ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) onde são detectados anticorpos contra o antígeno PGL-1. Os níveis de produção do IgM anti-PGL-1 indicam exposição ao *M. leprae* e correlacionam-se com a baciloscopia (LAFERTE et al., 1991). Estes testes sorológicos são capazes de detectar anticorpos não só em pacientes com hanseníase, mas também em indivíduos sadios e em contatos domiciliares desses pacientes, como comprovam alguns estudos (MENZEL et al., 1987; DESFORGES et al., 1989; ILANGUMARAN et al., 1996; DÜPPRE et al., 2012). Também tem sido demonstrado que os contatos domiciliares de pacientes com hanseníase, positivos no imunoensaio, têm três vezes mais chances de desenvolverem a doença quando comparados aos contatos soronegativos (BARRETO et al., 2015; PENNA et al., 2016).

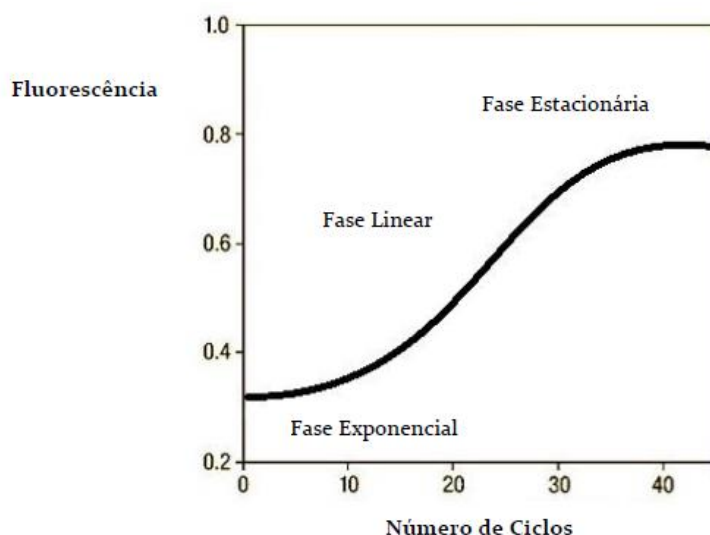
A positividade do teste de ELISA em contatos pode indicar que estes já foram expostos ao patógeno e que estão doentes ou então com uma célula fagocítica infectada. Assim, inicia-se uma resposta imune humoral com produção de anticorpos pelos linfócitos B, fazendo com que o indivíduo tenha uma infecção subclínica e seja assintomático (LOBATO et al., 2011). Desta forma, a detecção de anticorpos anti-PGL-1 pode ajudar a verificar o nível de exposição dos contatos com maior risco de desenvolverem a doença, colaborar na classificação dos pacientes e no monitoramento da eficácia do tratamento, em virtude do seu declínio durante e após o tratamento. Todavia, nem todos os pacientes com hanseníase apresentam títulos anti-PGL-1 (MOURA et al., 2008).

Seguindo esse caminho, Bühner-Sékula et al. desenvolveram o teste de fluxo lateral (ML-Flow). Trata-se de uma avaliação rápida que pode ser realizada em 10 minutos e que possui correlação com a técnica de ELISA. Possui ainda alta sensibilidade para a classificação de pacientes com a forma severa da doença (97,4 %) e alta especificidade em comparação com grupos controle (90,2 %) (BÜHRER-SÉKULA et al., 2003). Porém, de uma maneira geral, ele é um marcador que indica exposição ao bacilo e não necessariamente de infecção.

1.7.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real

A PCR em tempo real, descrita em 1993 por Higuchi et al, consiste no acompanhamento da reação no decorrer de todos os seus ciclos. Sua vantagem está na possibilidade de quantificar em tempo real o DNA amplificado em cada ciclo da PCR. Nesta técnica ocorrem a amplificação, detecção e quantificação em paralelo, sendo todo o processo automatizado. A PCR se divide em tres fases: i) fase exponencial, ii) fase de crescimento linear e iii) fase estacionária (Figura 10) (ARYA et al., 2005; PELT-VERKUILL et al., 2008).

Figura 10 – Representação esquemática das 3 fases que constituem a PCR



Nota: O sinal de fluorescência é diretamente proporcional à quantidade de produto amplificado. Intensidade de fluorescência (ΔR_n) vs nº de ciclos da PCR.

Fonte: MARTINS, 2016.

Na fase exponencial, verifica-se grande eficiência em virtude da relação DNA inicial vs quantidade de produto amplificado, sendo considerada como a melhor fase para o estudo da reação. Na fase de crescimento linear observa-se uma diminuição na eficiência, devido o decréscimo na disponibilidade de reagentes disponíveis, o que gera uma produção linear e um aumento da fluorescência. Já na fase estacionária existe uma paralisação da reação devido ao término de reagentes utilizados nas fases anteriores, de tal maneira que a produção de novos produtos amplificados pela PCR deixa de ser possível (ARYA et al., 2005; PELT-VERKUILL et al., 2008).

Para que os resultados da PCR sejam interpretados e analisados corretamente, a definição de alguns conceitos, tais como *Baseline*, *Threshold*, *Cycle Threshold* (C_T) e Eficiência (E) se faz necessária.

A *Baseline* é definida como o “limiar de detecção de fluorescência do equipamento”, ou seja, uma função linear que serve para eliminar o “ruído de fundo”. O *Threshold* é designado como o “valor selecionado quando a PCR inicia a fase exponencial de crescimento”. É um ponto definido aleatoriamente pelo software do equipamento, em função da *baseline*. O *Cycle Threshold* (C_T) é o valor relativo aos ciclos em que a curva de amplificação ultrapassa o valor limite selecionado, sendo dependente do número de moléculas de DNA disponíveis para amplificação, ou seja, quanto maior for a quantidade de DNA inicial, menor será o número de ciclos (C_T) necessários para que seja gerado equivalentemente uma maior exponencial do sinal de fluorescência (R_n) (superior à *baseline*). Já a Eficiência (E) corresponde à taxa de amplificação por PCR, permitindo determinar o sucesso da técnica (HIGUCHI et al., 1993; DORAK, 2006).

Alguns fatores podem influenciar negativamente a eficiência da reação, como a degradação do DNA, a qualidade dos *primers* utilizados e a presença de inibidores da PCR, por exemplo (HEID et al., 1996; KUBISTA et al., 2006).

1.7.3.1 Detecção de *M. leprae* por PCR em tempo real

Um dos maiores avanços no diagnóstico laboratorial da hanseníase foi o desenvolvimento de ensaios moleculares para a detecção do bacilo, principalmente baseados na técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) (WOODS; COLE, 1989; WILLIAMS et al., 1990; MARTINEZ et al., 2011).

Inicialmente, foram utilizadas em larga escala amostras de biópsias de pele frescas ou em parafina, tecido de tatu e DNA de *M. leprae* purificado nas reações de PCR. Todavia, os protocolos de processamento para extração de DNA desses espécimes variavam bastante, assim os resultados obtidos por PCR nem sempre eram constantes (de WIT et al., 1991; SUNG et al., 1993; NISHIMURA et al., 1994; SCOLLARD et al., 1998). Em virtude disso, protocolos para a extração de DNA a partir de vários tipos de amostras foram estabelecidos e a detecção do material genético do bacilo pela PCR se tornou viável. Dessa maneira, o uso de

kits comerciais para processamento de amostras tornou-se fundamental para obtenção de resultados de qualidade (FONTES et al., 2009; da SILVA et al., 2012).

Hoje a PCR em tempo real é conhecida por ser uma técnica relativamente rápida, sensível e específica, que permite, no caso da hanseníase, a amplificação e detecção de DNA de *M. leprae* numa grande variedade de amostras, tais como: linfa, sangue, secreção nasal, esfregaços cutâneos, biópsias de pele e nervos. Assim, o uso dessa ferramenta tem auxiliado no diagnóstico da doença, na diferenciação de outras enfermidades com lesões hipocrômicas ou granulomatosas, na classificação dos pacientes e no monitoramento do tratamento com a PQT (GOULART et al., 2007; STEINMANN et al., 2017).

A PCR tornou-se uma técnica com enorme variedade de aplicações e com possibilidade de utilização em amostras coletadas das mais diversas fontes. Esta técnica possibilitou o sequenciamento do genoma completo de *M. leprae* (COLE et al., 2001), a identificação dos genótipos do bacilo (TRUMAN et al., 2004) e da provável origem da infecção em humanos (MONOT et al., 2005).

O desenvolvimento da técnica de PCR quantitativa em tempo real (qPCR) melhorou ainda mais a sensibilidade e a especificidade na detecção do DNA de *M. leprae*. Estudos mostram que esta também é capaz de quantificar e determinar a viabilidade do bacilo (TRUMAN et al., 2008; MARTINEZ et al., 2009, 2011).

A identificação molecular do *M. leprae* consiste na amplificação de regiões específicas do DNA do patógeno. Para isso, diferentes genes-alvo do bacilo têm sido testados e comparados, tais como o elemento repetitivo RLEP, Ag 85B, 16S RNA ribossomal, ML0024 e *sodA* (MARTINEZ et al., 2006, 2011; da SILVA MARTINEZ et al., 2011; ARAUJO et al., 2016).

Vale ressaltar, que até o momento, todos os laboratórios e centros de atendimento que utilizam o diagnóstico molecular na pesquisa ou na rotina usam sistemas *homemades*, desenvolvidos com o objetivo de uso interno. Não existe uma padronização da técnica em relação aos alvos usados, aos reagentes e/ou as plataformas de análise. Desta forma, estes testes estão sujeitos às variáveis e como não possuem controles específicos nem sempre estão aptos a serem utilizados numa rotina diagnóstica (MARTINEZ et al., 2011, 2014; AZEVEDO et al., 2017).

2 JUSTIFICATIVA

No Brasil, a hanseníase, dentre as doenças infecciosas, ainda representa um grave problema de saúde pública. Por ser uma enfermidade causada por um patógeno intracelular obrigatório - *Mycobacterium leprae* - que não é cultivável *in vitro*, as estratégias clássicas de diagnóstico são dificultadas. Assim, métodos auxiliares como a baciloscopia e o exame histopatológico têm sido utilizados como principais ferramentas para a identificação e a classificação de pacientes com hanseníase. Todavia, o elevado número de casos da doença no país sugere a existência de um diagnóstico tardio e/ou pouco eficiente, mantendo desta forma a transmissão contínua.

A população com maior risco de desenvolver a doença ainda é a dos contatos domiciliares. Como a hanseníase possui um longo período de incubação, o diagnóstico precoce continua a ser um grande problema. As ferramentas clássicas, como as baseadas em testes bacteriológicos ou sorológicos, não são capazes de estimar claramente o risco de progressão da doença. Assim, estratégias para a detecção da doença que sejam de baixo custo, sensíveis e suficientemente específicas, sobretudo para os casos de difícil diagnóstico, se fazem extremamente necessárias.

O Ambulatório Souza Araújo (ASA), vinculado ao Laboratório de Hanseníase da FIOCRUZ, dispõe atualmente de um serviço de diagnóstico molecular que, mediante uma solicitação do médico responsável, realiza a avaliação de todos os casos suspeitos de hanseníase. Em geral, nessa situação, os testes bacteriológicos ou histopatológicos não ajudam na definição do diagnóstico. Todavia, a técnica de PCR tem demonstrado grande sensibilidade para a detecção de casos da doença e servido de apoio para a confirmação do diagnóstico clínico. Embora a análise por qPCR tenha sido implementada na rotina do ASA no ano de 2011, o teste de detecção de DNA de *M. leprae* que atualmente é usado é dispendioso e fornecido pela empresa Applied Biosystems®.

Mediante o exposto, o desenvolvimento de um teste eficiente, com confiabilidade estabelecida, com parâmetros laboratoriais rígidos e mais acessível se faz extremamente necessário. Assim, surgiu a ideia de desenvolver um *kit* composto por reagentes nacionais (fabricados pelo Instituto de Biologia Molecular do Paraná – FIOCRUZ) para análise por qPCR que contivesse um alvo específico do bacilo e um alvo de mamífero, para ser usado como controle interno.

Nesse contexto, o objetivo principal desse projeto foi desenvolver um produto com aplicações diretas na rotina diagnóstica da hanseníase no país e dessa forma contribuir para o controle epidemiológico da doença.

Portanto, espera-se que os resultados desse estudo possibilitem um diagnóstico precoce e eficiente da hanseníase, ocasionando um melhor manejo de grupos de risco de contrair a doença.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver e analisar um sistema *multiplex* de qPCR para identificação de *M. leprae* em indivíduos com suspeita de hanseníase e seus contatos domiciliares assintomáticos.

3.2 Objetivos específicos:

- a) padronizar um sistema de PCR quantitativo para diagnóstico de hanseníase;
- b) analisar a sensibilidade, a especificidade e a reprodutibilidade do sistema *multiplex homemade* mediante um painel de amostras (DNA de *M. leprae* purificado e oriundo de pacientes com diferentes formas clínicas da doença e em diferentes amostras de outras dermatoses);
- c) utilizar os procedimentos de boas práticas de laboratório (BPL) para o desenvolvimento de um protocolo operacional padrão (POP) relacionado ao diagnóstico molecular.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da FIOCRUZ (CEP) em 07/03/2015, protocolado sob o nº 976.330 e intitulado “O papel da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) na identificação da infecção subclínica em contatos de pacientes com hanseníase e no diagnóstico das formas paucibacilares” (ANEXO A). Todos os indivíduos assinaram o termo de consentimento livre esclarecido (TCLE) (ANEXOS B e C) antes da participação do estudo.

As etapas de coleta das amostras e extração de DNA das mesmas foram previamente realizadas, já que são provenientes da rotina ambulatorial do laboratório. Todo o processo ocorreu segundo o procedimento operacional padrão (APÊNDICE) desenvolvido durante esse projeto.

4.1 Coleta e armazenamento das amostras

As amostras biológicas – fragmentos de pele e raspados dérmicos – utilizadas nesse estudo foram coletadas no ASA – FIOCRUZ, conforme recomendação do Ministério da Saúde e da Organização Mundial da Saúde. Esses espécimes foram utilizados em diferentes trabalhos do grupo (MARTINEZ et al., 2006, 2011) e, de forma sucinta, ao serem obtidos foram acondicionados segundo as suas características e de acordo com as instalações do local de coleta, sendo, posteriormente, armazenados em freezer -70°C ou nitrogênio líquido até seu processamento.

4.2 Extração de DNA

As amostras de raspado dérmico e as de biópsia de pele, coletadas em um *punch* de 6mm³ e fragmentadas pela metade com estilete estéril, foram processadas para extração de DNA utilizando o *DNeasy® Blood & Tissue Kit* (QIAGEN), de acordo com as instruções do fabricante (QIAGEN).

4.3 Quantificação de DNA

A quantificação e a avaliação da pureza do DNA extraído foram realizadas por espectrofotometria, utilizando o instrumento NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific, USA). Inicialmente foi lido 1µL do tampão de eluição (AE) do *kit* de extração da QIAGEN para determinar o controle negativo. Em seguida, 1µL de cada amostra foi lido no comprimento de onda de 260 nm. A avaliação da pureza foi determinada pela razão da absorbância (A) em dois comprimentos de onda: A260/280, que indica o grau de contaminação por proteínas e a A260/230, que demonstra o nível de contaminação por compostos orgânicos.

4.4 Detecção de DNA de *M. leprae* utilizando PCR em tempo real

Para o acompanhamento dos contatos, o protocolo de PCR usado foi o mesmo descrito por Martinez et al. (2011), no qual o alvo utilizado, específico de *M. leprae*, é a região 16S rRNA.

Para a avaliação e a padronização do sistema *multiplex homemade*, o ensaio de PCR em tempo real foi desenvolvido para amplificar simultaneamente um alvo específico de *M. leprae* (16S rRNA) e um gene de mamífero (18S2), esse último utilizado como controle interno da reação. As reações de PCR foram preparadas com *Multiplex PCR Mastermix 3X* (desenvolvido pelo Instituto de Biologia Molecular do Paraná - IBMP) utilizando diferentes concentrações de cada primer (IBMP) e de cada sonda (16S – Applied Biosystems / 18S2 – Biosearch Technologies). As reações foram preparadas em triplicatas e submetidas a 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, 40 ciclos de 95°C por 15 seg cada e 60°C por 1 min, utilizando sistema de PCR em tempo real 7500 Standard (Applied Biosystems®).

Os resultados obtidos a partir da amplificação do alvo do bacilo (*Ct value*) foram utilizados para determinar o número de bactérias relativo em amostras biológicas de pacientes. O valor de *threshold* de 0,05 foi definido e utilizado para as amostras positivas como descrito por Martinez et al. (2011) e Barbieri et al. (2014); já o número de genomas foi calculado pela interpolação dos valores de *Ct* usando uma curva de diluição com número de

genomas de *M. leprae* conhecido, em formato de uma planilha em Excel (MARTINEZ et al., 2011).

4.5 Padronização do Kit

Para a etapa de padronização foi utilizado o *Mastermix* desenvolvido pelo IBMP para detectar as concentrações ideais dos primers, das sondas e de DNA para a qPCR. Nesse momento, além de amostras provenientes de *M. leprae* purificado em diferentes concentrações também foram avaliadas as amostras de pacientes em reações *monoplex* (16S) e *multiplex* (16S + 18S2).

4.6 Validação do Kit

A etapa da validação foi iniciada através de uma análise intra-laboratorial, onde a sensibilidade, a especificidade e a reprodutibilidade do sistema foram examinadas. A avaliação da sensibilidade compreendeu a análise de DNA (em diferentes concentrações) proveniente de amostras contendo *M. leprae* purificado. A especificidade do sistema foi verificada a partir da avaliação de amostras de pacientes com hanseníase, pacientes com outras dermatoses e amostras contendo diferentes bactérias. Para o estudo de reprodutibilidade, amostras foram analisadas em replicatas, em dias diferentes e por técnicos distintos.

4.7 Análise estatística

Os valores de fluorescência acumulados nas análises de qPCR para os DNAs obtidos a partir de amostras contendo *M. leprae* purificado e diluídas em uma curva padrão de base 10, foram analisados pelo software do sistema de detecção do equipamento ABI PRISM 7500 Standard (Applied Biosystems®).

Os valores de ΔR_n extraídos para detectar o *Cycle threshold* (Ct) foram obtidos pelo software R versão 3.4.1 (disponível em <http://www.R-project.org/>). Os valores de Ct foram plotados, as curvas padrão definidas por regressão linear e o coeficiente de determinação (R^2) usado para estabelecer a eficiência. A partir disso, as curvas padrão ajustadas foram usadas para estimar as contagens do número de genomas de *M. leprae* nas amostras de biópsias de pele. Para fins de análise, um genoma de *M. leprae* foi considerado como equivalente a 3 fg (MARTINEZ, et al., 2009).

A construção das árvores de classificação, assim como as análises de especificidade, sensibilidade e acurácia também foram realizadas pelo software R versão 3.4.1, conforme descrito por Martinez et al. (2011).

5 RESULTADOS

5.1 Padronização do Kit

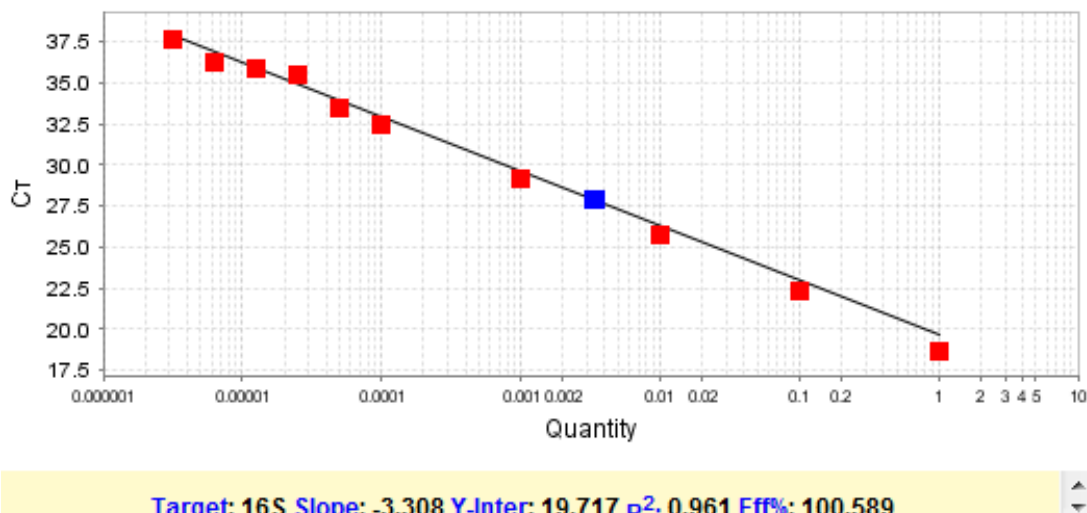
A ideia inicial era desenvolver um *kit* de PCR que pudesse ser utilizado na rotina de centros ambulatoriais. Esse deveria ser eficaz como exame complementar, tanto em casos de pacientes de difícil diagnóstico como em contatos de indivíduos com a doença e economicamente mais acessível.

A etapa de desenvolvimento do *kit homemade* foi iniciada em colaboração com o Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP), sendo este centro o responsável pela fabricação dos reagentes.

A base do sistema desenvolvido foi a TaqMan®, onde uma sonda é utilizada. Essa consiste num oligonucleotídeo específico da região alvo, localizado próximo ao primer *forward* (oligonucleotídeo senso), marcado com dois fluoróforos denominados i) *reporter*: que emite fluorescência quando se liga a molécula de DNA na extremidade 5'; e ii) *quencher*: responsável por suprimir a emissão do sinal na extremidade 3' (Life Technologies, 2012). A reação através do sistema TaqMan® também pode ser formada por mais de 1 sonda contendo diferentes fluoróforos *reporter* e *quencher*, o que permite a detecção e quantificação de dois ou mais alvos simultaneamente e de forma independente; formato denominado de *multiplex*.

A etapa de desenvolvimento do *kit* foi iniciada testando reagentes comerciais da Applied Biosystems®, utilizando o equipamento StepOne Plus (Applied Biosystems®), com reações já padronizadas e descritas na literatura (MARTINEZ et al., 2009, 2011). Para isso, foram utilizados DNAs extraídos a partir de amostras contendo *M. leprae* purificado (diluídas em diferentes concentrações 1ng-100fg (parte da curva padrão em série de 10) e de 100fg-3,125fg (parte da curva padrão em série de 2) (Figura 11).

Figura 11 – Curva padrão realizada a partir de DNA extraído de amostras contendo *M. leprae* purificado (1ng-3,125fg)

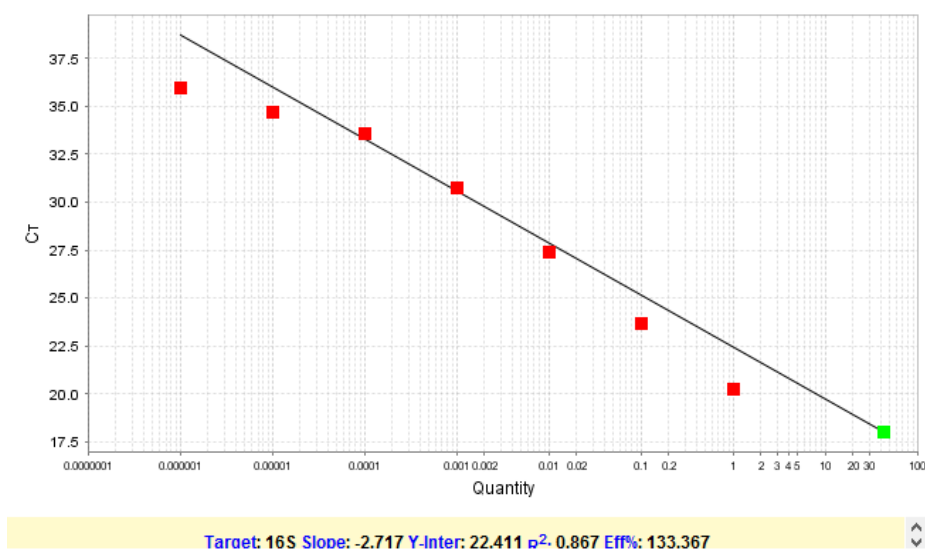


Nota: Neste experimento foram utilizados reagentes comerciais da Applied Biosystems®. No eixo y encontram-se os valores de C_T de cada diluição das amostras contendo DNA de *M. leprae*; já o eixo x representa a concentração de DNA do bacilo presente em cada ponto da curva de diluição. Target (alvo): 16S; Slope (coeficiente angular da reta): deve apresentar valor próximo de -3.3, o que indica 100% de eficiência de amplificação do ensaio; R^2 (coeficiente de correlação): mede o quão próximo é o ajuste entre a regressão linear da curva padrão e os valores individuais de C_T das amostras, onde o valor 1 indica um ajuste perfeito; Eff%: a eficiência da reação deve variar entre 90-110%. Uma eficiência acima de 110% significa amplificação além do esperado e abaixo de 90%, amplificação menor que o esperado.

Fonte: A autora, 2018.

Como observado no resultado, todos os pontos da curva padrão foram positivos (amplificaram), a partir do 5º ponto (100fg), foram refeitos os dois últimos (10fg e 1fg) numa diluição em série de 10. Essa curva padrão com 7 pontos (em série de 10), foi testada no equipamento StepOne Plus, mas agora utilizando reagentes produzidos pelo IBMP (Figura 12).

Figura 12 – Curva padrão realizada a partir de DNA extraído de amostras contendo *M. leprae* purificado (1ng-1fg)

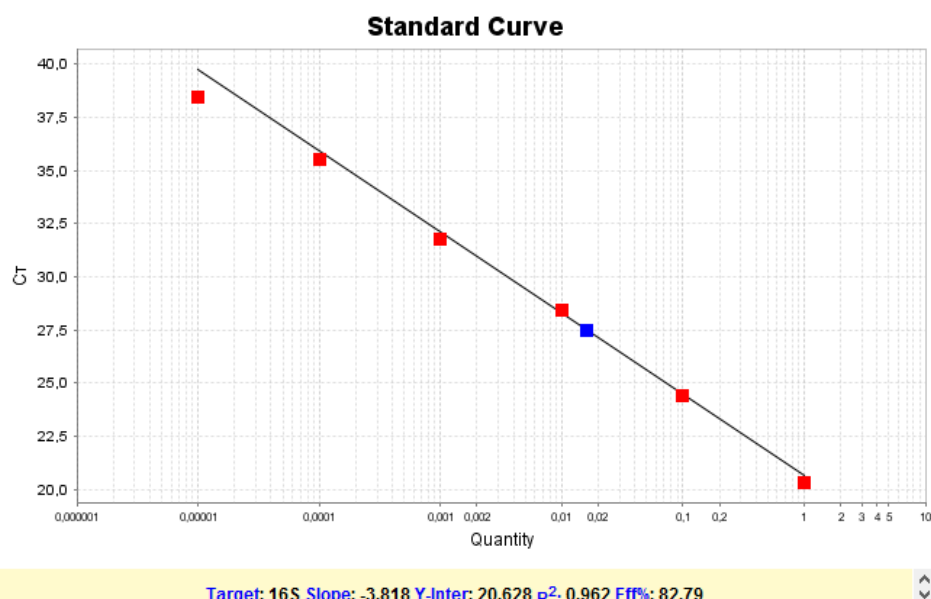


Nota: Neste experimento foram utilizados reagentes produzidos pelo IBMP. Resultado da curva padrão gerada no equipamento de PCR StepOne Plus. No eixo y encontram-se os valores de C_T de cada diluição das amostras de DNA; já o eixo x, representa a concentração de DNA de *M. leprae* presente em cada ponto da curva de diluição. Target: alvo (16S); Slope (coeficiente angular da reta): deve apresentar valor próximo de -3.3, o que indica 100% de eficiência de amplificação do ensaio; R^2 (coeficiente de correlação): mede o quão próximo é o ajuste entre a regressão linear da curva padrão e os valores individuais de C_T das amostras, onde o valor 1 indica um ajuste perfeito; Eff%: a eficiência da reação deve variar entre 90-110%. Uma eficiência acima de 110% significa amplificação além do esperado e abaixo de 90%, amplificação menor que o esperado.

Fonte: A autora, 2018.

Como os laboratórios de referência podem possuir distintos modelos de termocicladores, foi avaliada a interferência dos diferentes equipamentos na obtenção dos resultados na PCR. Esses testes foram realizados em dias distintos e em duas plataformas de análises: StepOne Plus e 7500 Standard, ambas da Applied Biosystems®. O resultado dessa comparação indicou que a reação realizada no equipamento ABI7500 (7500 Real-Time PCR System / Applied Biosystems®) apresenta maior eficiência ($R^2=0,962 > 0,867$) e reprodutibilidade nos resultados (Figuras 13 e 12, respectivamente).

Figura 13 – Eficiência e reprodutibilidade dos resultados utilizando reagentes produzidos no IBMP através da plataforma de PCR 7500

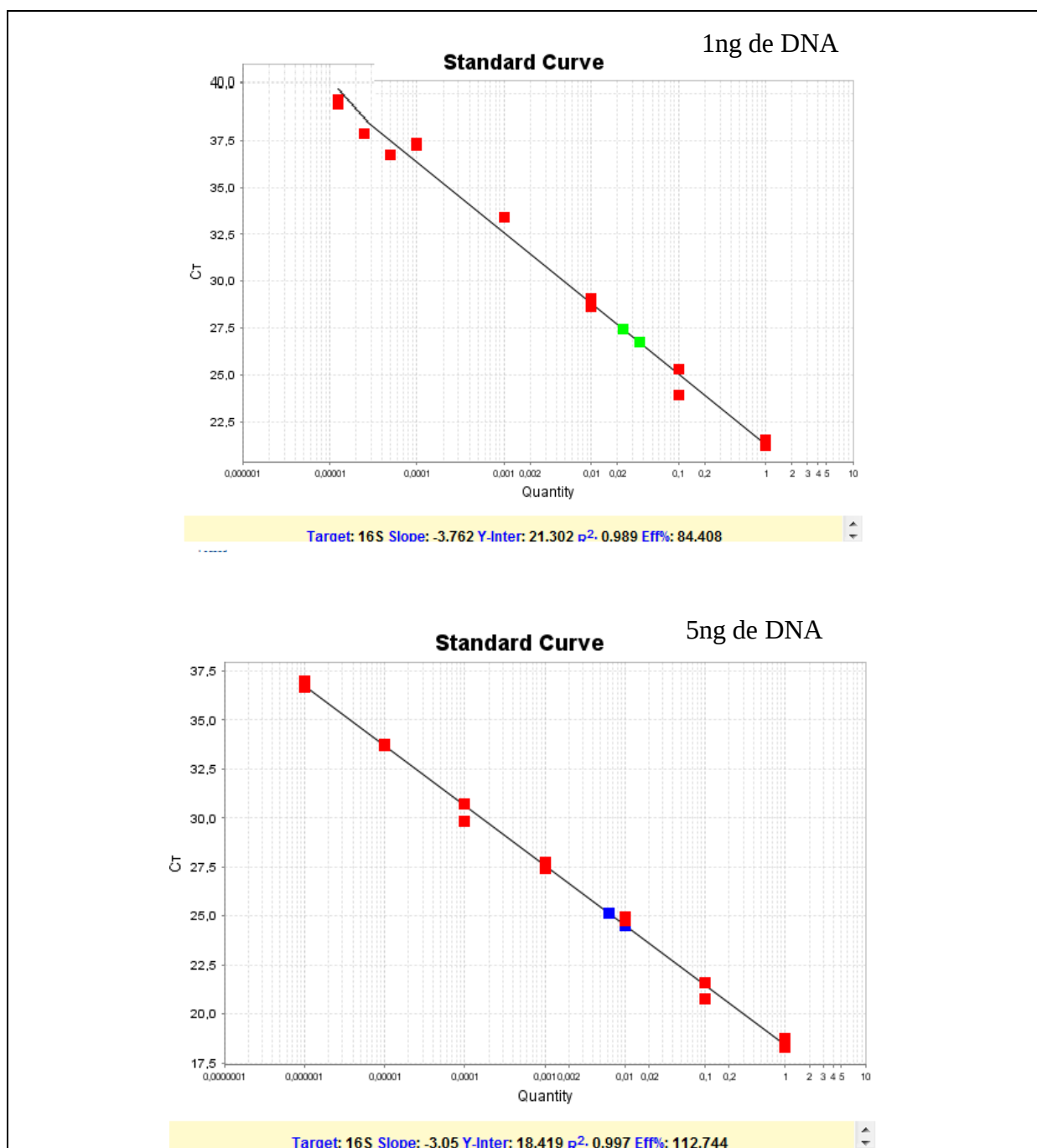


Nota: Resultado da curva padrão gerada no equipamento de PCR 7500. No eixo y encontram-se os valores de C_T de cada diluição das amostras de DNA; já o eixo x, representa a concentração de DNA de *M. leprae* presente em cada ponto da curva de diluição. Target: alvo (16S); Slope (coeficiente angular da reta): deve apresentar valor próximo de -3.3, o que indica 100% de eficiência de amplificação do ensaio; R^2 (coeficiente de correlação): mede o quão próximo é o ajuste entre a regressão linear da curva padrão e os valores individuais de C_T das amostras, onde o valor 1 indica um ajuste perfeito; Eff%: a eficiência da reação deve variar entre 90-110%. Uma eficiência acima de 110% significa amplificação além do esperado e abaixo de 90%, amplificação menor que o esperado.

Fonte: A autora, 2018.

A quantidade ideal de DNA na reação também foi avaliada. Para isso, utilizou-se DNA extraído a partir de amostras contendo *M. leprae* purificado em duas concentrações: 1ng e 5ng (Figura 14). Os resultados obtidos através da amplificação demonstram que a quantidade maior (5 ng) apresenta nível de reprodutibilidade melhor entre as replicatas analisadas e maior eficiência ($R^2=0,997 > 0,989$).

Figura 14 – qPCR das amostras da curva padrão utilizando diferentes quantidades de DNA extraído a partir de *M. leprae* purificado (1ng e 5ng) na reação

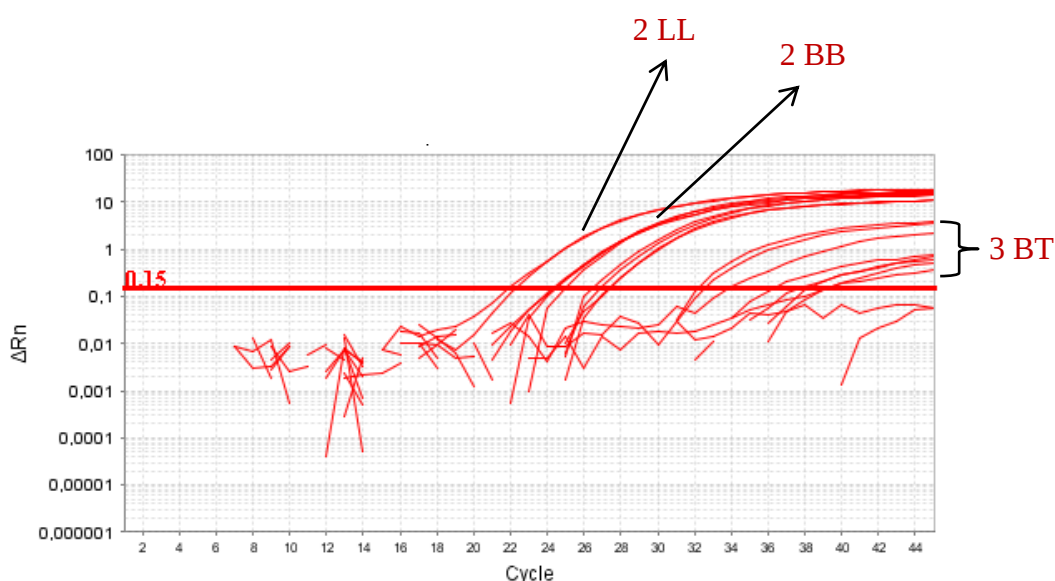


Nota: No eixo y encontram-se os valores de C_T de cada diluição das amostras de DNA; já o eixo x, representa a concentração de DNA de *M. leprae* presente em cada ponto da curva de diluição em série de 10, partindo de 1ng até 1fg. Target: alvo (16S); Slope (coeficiente angular da reta): deve apresentar valor próximo de -3.3, o que indica 100% de eficiência de amplificação do ensaio; R^2 (coeficiente de correlação): mede o quão próximo é o ajuste entre a regressão linear da curva padrão e os valores individuais de C_T das amostras, onde o valor 1 indica um ajuste perfeito; Eff%: a eficiência da reação deve variar entre 90-110%. Uma eficiência acima de 110% significa amplificação além do esperado e abaixo de 90%, amplificação menor que o esperado.

Fonte: A autora, 2018.

Após a definição do equipamento, dos reagentes e da quantidade de DNA a serem utilizados na reação, foram iniciados os testes para detecção de DNA de *M. leprae* em amostras de pacientes com hanseníase, utilizando como alvo do bacilo, o 16S rRNA, em reação *monoplex*. (Figura 15).

Figura 15 – Reação *monoplex* (16S) realizada em duplicata a partir de amostras de pacientes com hanseníase utilizando o *Mastermix* do IBMP



Nota: Curva de amplificação emitida durante cada ciclo da PCR, onde da esquerda para a direita há um decréscimo na quantidade de DNA de *M. leprae* encontrada nas amostras de pacientes com hanseníase. Neste gráfico estão incluídas amostras em duplicata de pacientes das formas clínicas BT (3), BB (2) e LL (2). O traço horizontal (valor de 0,15) representa o limiar de detecção da fluorescência (*Threshold*). A quantidade de fluorescência obtida durante a reação de PCR produz uma curva de amplificação que na fase exponencial ultrapassa o limiar de detecção (C_T), permitindo a quantificação do material genético. Registro de resultado de experimento interpretado pelo software ABI7500 v2.3. ΔRn : variação/intensidade da fluorescência emitida; Cycle: número de ciclos da reação de PCR.

Fonte: A autora, 2018.

O passo seguinte compreendeu o desenvolvimento e a avaliação de um sistema por qPCR que fosse capaz de analisar dois alvos ao mesmo tempo (reação *multiplex*). Para isso, foram utilizados o Multiplex PCR *Mastermix* 3X (desenvolvido pelo IBMP), 25nM de cada primer (desenvolvido pelo IBMP) para amplificação do alvo bacteriano (16S) e 10nM da sonda (Life Technologies™); 10nM dos primers (desenvolvidos pelo IBMP) para amplificação do alvo controle (18S2) e 5nM da respectiva sonda (Life Technologies™).

Nessa etapa, para a construção da curva padrão, as amostras compostas de DNA de *M. leprae* foram diluídas em solução contendo DNA humano em concentração final de 10ng.

Para isso, foram avaliadas diferentes concentrações de *primers* (fabricados pelo IBMP), e de sonda comercial (Applied Biosystems®) para o alvo 16S. A esses reagentes foram também adicionados os *primers* F e R (CF: 10 µM cada) e a sonda do 18S2 (CF: 5 µM), como descrito na Tabela 1. Assim, esperava-se verificar se no sistema *multiplex* o aumento ou a diminuição nas concentrações dos primers para amplificação do alvo 16S alteraria o nível de sensibilidade da reação. Entretanto, como não houve diferença significativa nos valores de Cts gerados, foram mantidas as concentrações de uso previamente padronizadas e utilizadas no laboratório (0,5 µM de primers F e R + 0,2 µM de sonda 16S rRNA).

Tabela 1 – Valores médios de Ct obtidos através de experimentos conduzidos em duplicata

Alvo avaliado: Concentrações de Primers e Sonda	1ng/ µL	100pg/ µL	10pg/ µL	1pg/ µL	100fg/ µL	10fg/ µL	1fg/ µL	C+ (*)	C+ (**)	C-
16S: 0,5µM de primers F e R + 0,2µM de sonda	22,3	27	29,2	30,4	31,6	37,4	0	30,3	0	0
18S2: 0,16µM de primers F e R + 0,04µM de sonda	20	20,2	19,9	20,1	19,9	19,7	20,3	24,1	20,1	0
16S: 0,8µM de primers F e R + 0,4µM de sonda	21,7	28,4	29	30,4	31,9	36,9	0	30,7	0	0
18S2: 0,16µM de primers F e R + 0,04µM de sonda	18,7	20,9	19,5	20,4	19,9	20	19,4	23,8	20	0
16S: 0,9µM de primers F e R + 0,3µM de sonda	22,5	27,2	29	30	32,5	37,9	0	30,6	0	0
18S2: 0,16µM de primers F e R + 0,04µM de sonda	19,7	20,4	20,1	20	19,4	19,8	19,9	23,9	20	0

Legenda: C+ (*): DNA extraído a partir de amostra de paciente com hanseníase; C+ (**): DNA extraído a partir de amostra de indivíduo saudável; C-: controle negativo (água ultra pura + mix da PCR).

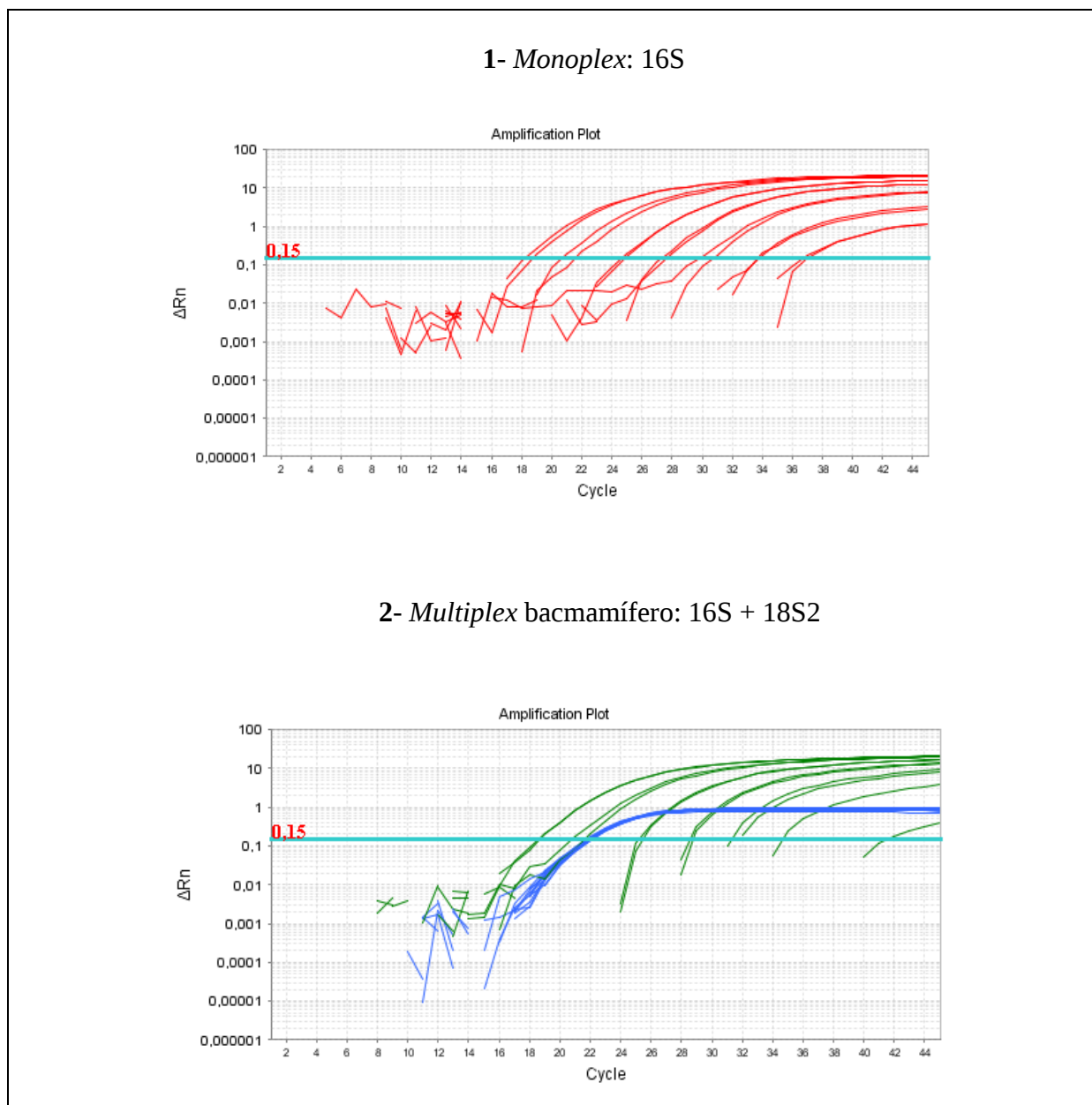
Nota: Nessas amplificações foram avaliadas as amostras da curva padrão diluídas em amostra de DNA de indivíduo saudável utilizando diferentes concentrações de *primers* e sonda do 16S e as concentrações padrões do 18S2.

Fonte: A autora, 2018.

Após essa padronização, foi possível observar que os dois sistemas desenvolvidos (*monoplex* e *multiplex*) apresentaram resultados satisfatórios, com a amplificação de todos os pontos da curva padrão para o alvo 16S e de uma curva constante para a detecção do alvo

18S2. Esse resultado já era esperado, pois as amostras que formam os pontos da curva foram diluídas em sangue com a mesma concentração de DNA humano (10ng) (Figura 16; Tabela 2). Depois de definidas as melhores condições de uso, os reagentes foram empregados na reação de PCR *multiplex*.

Figura 16 – Resultado do teste em reação *monoplex* (A) e *multiplex* (B) de PCR em tempo real



Nota: *Mastermix* e *primers* fornecidos pelo IBMP. Curva de amplificação gerada pelo software do equipamento ABI7500, onde no eixo y (ΔRn) observa-se a variação da fluorescência emitida; já no eixo x (Cycle) o número de ciclos da reação. 1- Gráfico de amplificação dos pontos da curva de diluição em série de 10 (1ng a 1fg) realizada para o alvo 16S; 2- Gráfico de amplificação dos pontos da curva de diluição em série de 10 (1ng a 1fg) realizada para os alvos 16S (bacilo - curvas em verde) e 18S2 (mamífero - curvas em azul) combinados.

Fonte: A autora, 2018.

Tabela 2 – Ct médio obtido a partir da quantidade de DNA de *M. leprae* constituintes da curva padrão da PCR em tempo real com o Sistema TaqMan

Pontos da curva	1ng	100pg	10pg	1pg	100fg	10fg	1fg	C+	C-
Ct 16S	20,5	24,5	28,5	32	35,5	38,5	NA	27,5	NA
Ct 18S2	18,5	18,5	19	19	19	19	19	26,5	NA

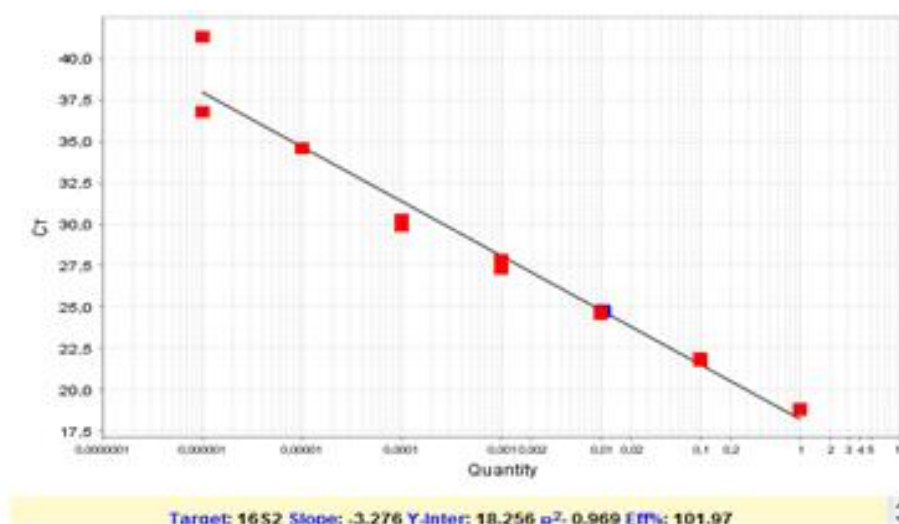
Legenda: Ct (Ciclo de *threshold*): neste caso o valor demonstrado foi obtido a partir do valor das triplicatas; C+: controle positivo (amostra de paciente com hanseníase); C-: controle negativo (água ultra pura + mix da PCR); NA: não houve amplificação.

Fonte: A autora, 2018.

Depois de definidas as melhores condições de uso, os reagentes foram empregados na reação de PCR *multiplex*.

A sensibilidade do sistema foi avaliada tanto em reação *monoplex* quanto em *multiplex*. Como os dois tipos de amplificação demonstraram um nível aproximado de eficiência para o alvo bacteriano nas reações *monoplex* ($R^2=0,997$ – Figura 14) e *multiplex* ($R^2=0,969$ – Figura 17), a última foi escolhida para a condução dos testes seguintes.

Figura 17 – Gráfico de amplificação mostrando a eficiência e a sensibilidade do alvo 16S em reação *multiplex* utilizando o *Mastermix* do IBMP



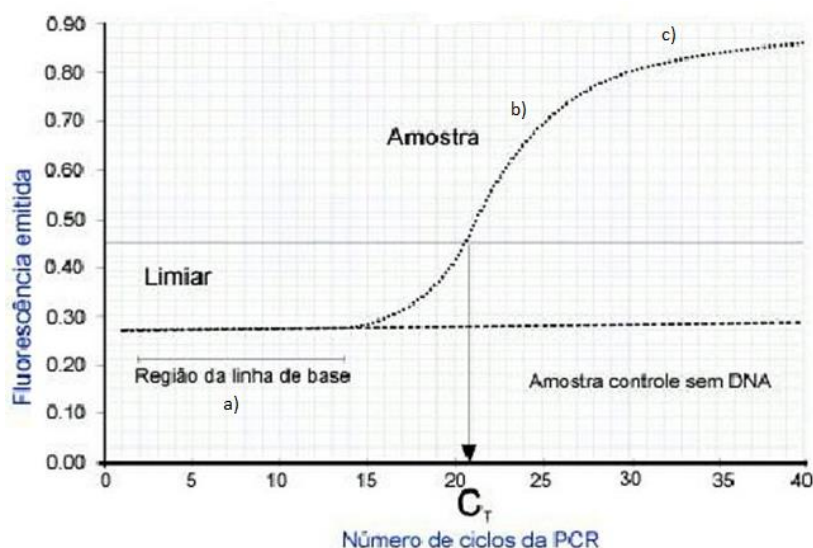
Nota: Resultado da curva padrão gerada em reação *multiplex*, utilizando *Mastermix* do IBMP. No eixo y (C_T) observa-se o valor relativo aos ciclos da PCR em que a curva de amplificação ultrapassa o valor limite (*Threshold*) selecionado pelo equipamento; já no eixo x (Quantity), encontra-se a quantidade de amostra de DNA de *M. leprae* presente em cada ponto da curva de diluição em série de 10, partindo de 1ng até 1fg. Em resumo, quanto menor é a concentração da amostra/ número de cópias de DNA, maior é o valor de C_T obtido. Target (alvo): 16S; Slope (coeficiente angular da reta); R^2 (coeficiente de correlação); Eff% (eficiência da reação): deve variar entre 90-110%.

Fonte: A autora, 2018.

Esse experimento foi conduzido com o objetivo de definir a eficiência da reação. A curva padrão foi construída através da plotagem de amostras com uma gama de concentrações conhecidas do analito (DNA proveniente de amostras contendo *M. leprae* purificado). A construção dessa tem um impacto importante na eficiência do teste.

A amplificação na PCR em tempo real é definida pelo ponto em que ocorre um aumento estatisticamente significativo do sinal da fluorescência, denominado de Ct (Cycle Threshold) e localizado após o baseline (linha basal ou ruído de fundo) na fase exponencial (Figura 18).

Figura 18 – Modelo de curva de amplificação na PCR em tempo real



Nota: O gráfico de amplificação mostra 3 fases distintas: a) linha basal – não foram gerados produtos da PCR suficientes para detecção da fluorescência; b) fase log – a quantidade de produtos da PCR dobra a cada ciclo; c) fase platô – não há mais aumento no número de produtos. Ct – Ciclo de Threshold.

Fonte: Adaptado de NOVAIS; ALVES, 2004.

Assim, o valor de Ct é inversamente proporcional ao número inicial de cópias de DNA, podendo ser estimada, dessa maneira, a quantidade inicial de DNA alvo presente nas amostras a serem testadas (HIGUCHI et al., 1993; DORAK, 2006).

A partir da determinação dos valores de Ct, calculados com base na curva padrão e determinados pela regressão linear, foi possível estimar as contagens genômicas de *M. leprae* nas amostras analisadas. Para isso, foi considerada a relação de um genoma de *M. leprae* em cada 3 fg de diluição (MARTINEZ et al., 2006). Através do resultado obtido, foi construída uma planilha (Figura 19) com o intuito de estimar a quantidade de bacilos presentes nas

amostras analisadas de pacientes ou de indivíduos com suspeita de hanseníase. Nessa planilha os valores de Cts obtidos em cada ensaio de qPCR podem ser convertidos em contagens de cromossomos, sendo este valor utilizado para o diagnóstico da hanseníase.

Figura 19 – Planilha construída para obtenção da quantidade de genomas de *M. leprae* presentes nas amostras de pacientes e suspeitos

SampleID	Ct	log10.Conc	Conc	Chromosome count	Diagnose
1ng	20,5	0,19224035	1,556826982	518942,327256	L
100pg	24,5	-0,970471328	0,107035704	35678,568150	L
10pg	28,5	-2,133183006	0,007358969	2452,989780	L
1pg	32	-3,150555725	0,00070704	235,680158	L
100fg	35,5	-4,167928443	6,79316E-05	22,643852	L
10fg	38,5	-5,039962202	9,1209E-06	3,040301	NL
1fg		FALSO	1	333333,333333	L
		FALSO	1	333333,333333	L
		FALSO	1	333333,333333	L
		FALSO	1	333333,333333	L
		FALSO	1	333333,333333	L
		FALSO	1	333333,333333	L
		FALSO	1	333333,333333	L
		FALSO	1	333333,333333	L
		FALSO	1	333333,333333	L
		FALSO	1	333333,333333	L
		FALSO	1	333333,333333	L
		FALSO	1	333333,333333	L
		FALSO	1	333333,333333	L
		FALSO	1	333333,333333	L
		FALSO	1	333333,333333	L
		FALSO	1	333333,333333	L
		FALSO	1	333333,333333	L

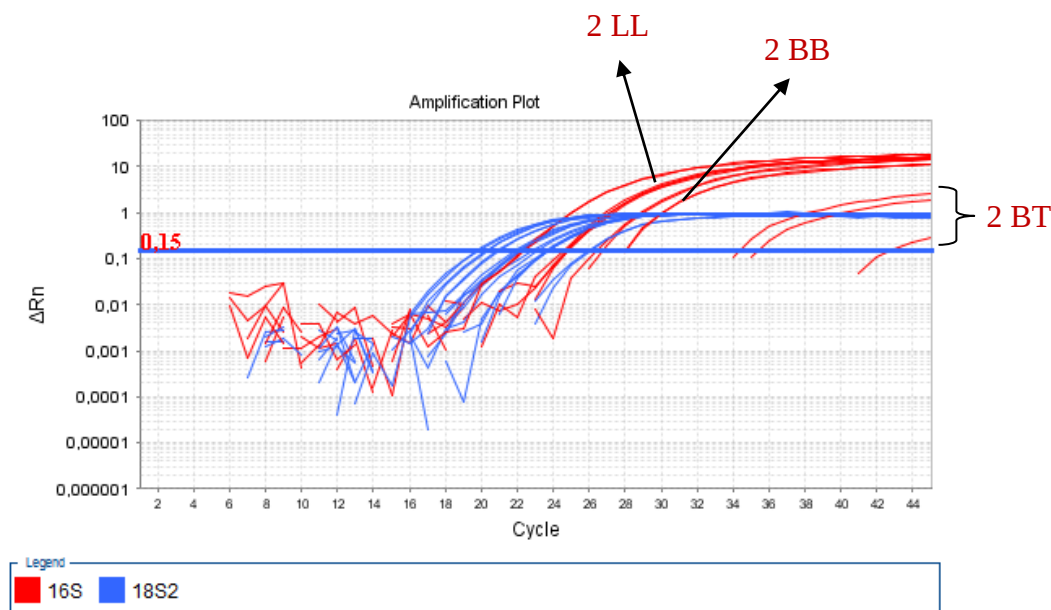
Nota: Planilha para contagem de genomas de *M. leprae* a partir do valor de Ct gerado na reação de PCR. Coluna A: identificação da amostra; coluna B: o valor de Ct de cada amostra amplificada; coluna C: valor de concentração no Log base 10 que será gerado; coluna D: concentração da amostra; coluna E: número de bacilos de *M. leprae* encontrado em cada amostra; coluna F: diagnóstico para hanseníase (L) ou não hanseníase (NL).

Fonte: A autora, 2018.

De posse dos resultados obtidos utilizando DNA de amostras oriundas de *M. leprae* purificado, o protocolo estabelecido foi aplicado às amostras clínicas para verificar a reprodutibilidade do sistema. Para isso, foram selecionadas amostras de pacientes com diferentes formas clínicas da doença (BT, BB, BL e LL) e com distintos índices baciloscópicos. O resultado do sistema desenvolvido com os reagentes do IBMP também foi

satisfatório quando foram testadas as amostras de pacientes apresentando diferentes níveis de positividade para o alvo 16S (Figura 20).

Figura 20 – Resultado de PCR em tempo real analisando amostras de pacientes utilizando o *Mastermix* do IBMP para reação *multiplex* (alvos 16S e 18S2)



Nota: Curva de amplificação gerada pelo *software* do equipamento ABI7500. No eixo y (ΔRn) observa-se a variação da fluorescência emitida e no eixo x (Cycle) o número de ciclos da reação. Gráfico de amplificação para os alvos 16S (bacilo – curvas em vermelho) e 18S2 (mamífero – curvas em azul) das amostras de pacientes positivos para hanseníase.

Fonte: A autora, 2018.

5.2 Validação do Kit

Após a etapa de padronização das condições de amplificação, foi iniciada a primeira fase do processo de validação do *kit*. Para isto, foram definidos os controles de qualidade visando a obtenção da acurácia, confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados.

A primeira etapa de validação compreendeu as análises de sensibilidade e especificidade do sistema. Para isso, foram selecionadas, do banco de dados do laboratório de hanseníase, amostras e, conseqüentemente, seus DNAs para atuarem como controles positivos e negativos das reações. Para compor o grupo de amostras positivas, foram escolhidas as as

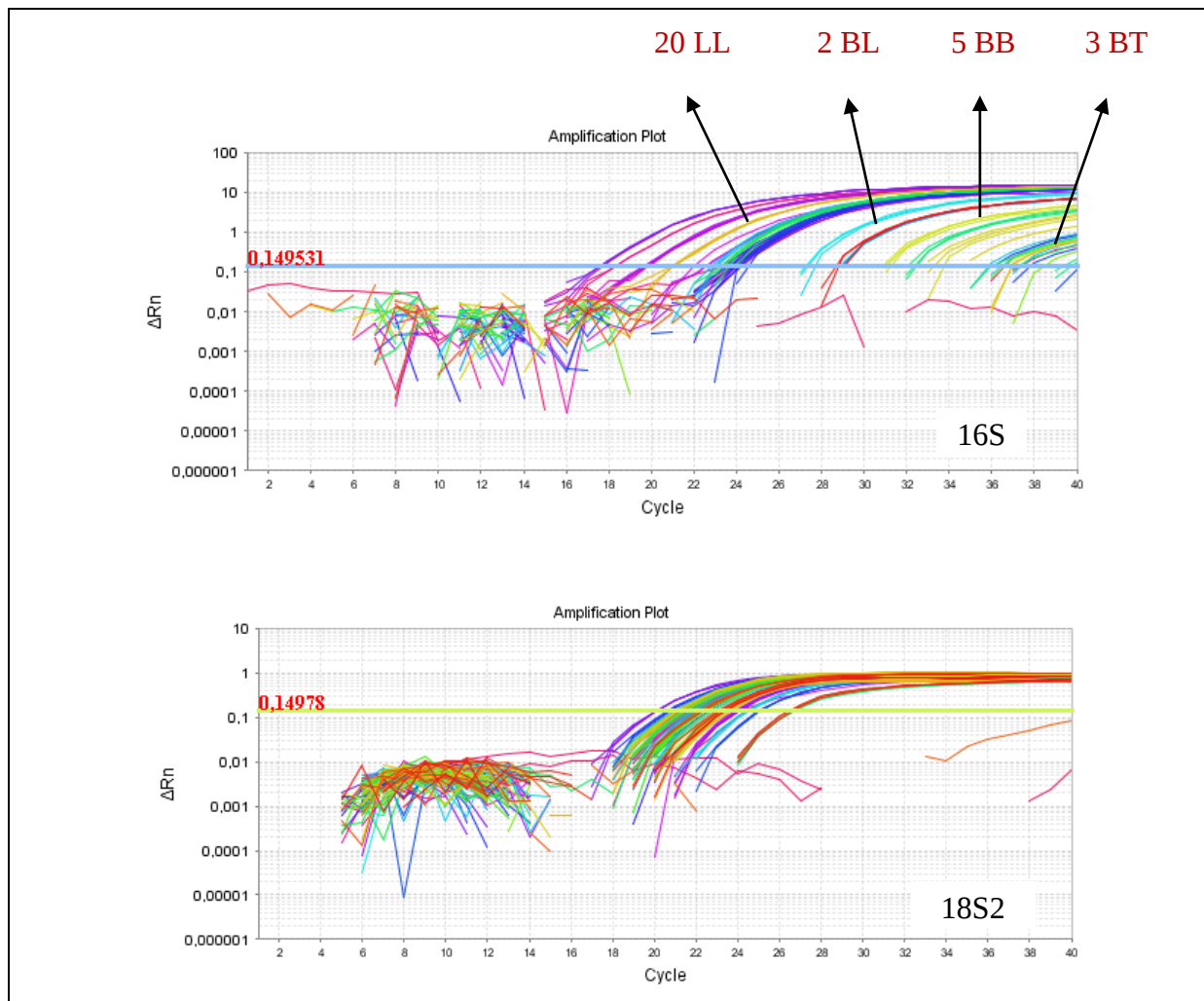
oriundas de pacientes que tiveram o diagnóstico de hanseníase confirmado. Assim, um total de 30 amostras de pacientes distribuídos em diferentes formas clínicas da doença foram selecionados: BT (n=3), BB (n=5), BL (n=2), LL (n=20).

Vale ressaltar que o grupo contendo amostras humanas e seus respectivos DNAs foi obtido a partir de biópsias de pele provenientes de pacientes do ASA. Esses indivíduos tiveram o diagnóstico final confirmado pela clínica, por métodos de diagnósticos complementares (baciloscopia e histopatologia) e pelo sistema de qPCR utilizado atualmente na rotina do LAHAN (com reagentes comerciais).

Os resultados demonstram (Figura 21) que as amostras (n=30) que compõem o grupo de indivíduos com hanseníase confirmada, apresentam diferentes níveis de positividade na análise utilizando a reação *multiplex* (16S + 18S2) com o *Mastermix* do IBMP. Isso pode estar relacionado ao fato de que amostras de pacientes com hanseníase, que são sabidamente de difícil diagnóstico, como os casos *boderline*, foram incluídos na análise.

A reação para o alvo 16S foi negativa para apenas um paciente, definido como BT; já a amplificação para o alvo 18S2 forneceu resultados positivos para todas as amostras, conforme desejado.

Figura 21 – Resultado de PCR em tempo real analisando amostras de pacientes com hanseníase confirmada utilizando o *Mastermix* do IBMP para reação *multiplex* (alvos 16S e 18S2)



Nota: Gráfico de amplificação (alvos 16S e 18S2) das amostras de pacientes positivos para hanseníase gerado pelo software do equipamento ABI7500. Eixo y (ΔRn) observa-se a variação da fluorescência emitida e no eixo x (Cycle) o número de ciclos da reação. O traço horizontal, com o valor de $\pm 0,15$, representa o limiar de detecção da fluorescência (*Threshold*). A quantidade de fluorescência obtida durante a reação de PCR produz uma curva de amplificação que na fase exponencial ultrapassa o limiar de detecção (C_T), permitindo a quantificação do material genético. DNA total (50 ng) = DNA do hospedeiro + DNA do patógeno.

Fonte: A autora, 2018.

Para o grupo de amostras negativas, foram escolhidas as provenientes de: i) indivíduos que chegaram ao ambulatório com suspeita de hanseníase, mas que foram diagnosticados com outras dermatoses (Tabela 3); ii) pacientes ou de culturas que continham DNA de outras micobactérias associadas com infecção pulmonar e/ou de pele (Tabela 4). As amostras de bactérias foram cedidas por colaboradores do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada a Micobactérias (LABMAM- FIOCRUZ/RJ).

Tabela 3 – Lista das outras dermatoses diagnosticadas nos pacientes atendidos no ASA e que foram utilizadas para compor o banco de amostras negativas

Outras Dermatoses	Nº de amostras testadas
Granuloma anular	6
Farmacodermia	2
Rosácea	2
Sarcoidose	1
Eczema	6
Sífilis	1
Eritema	2
Processo Inflamatório Crônico Inespecífico	5
Micose fungóide	2
Líquen nítido	1
Dermatite cinzenta	1
Colagenase	1

Fonte: A autora, 2018.

Tabela 4 – Lista de isolados bacterianos que foram utilizados para compor o banco de amostras negativas

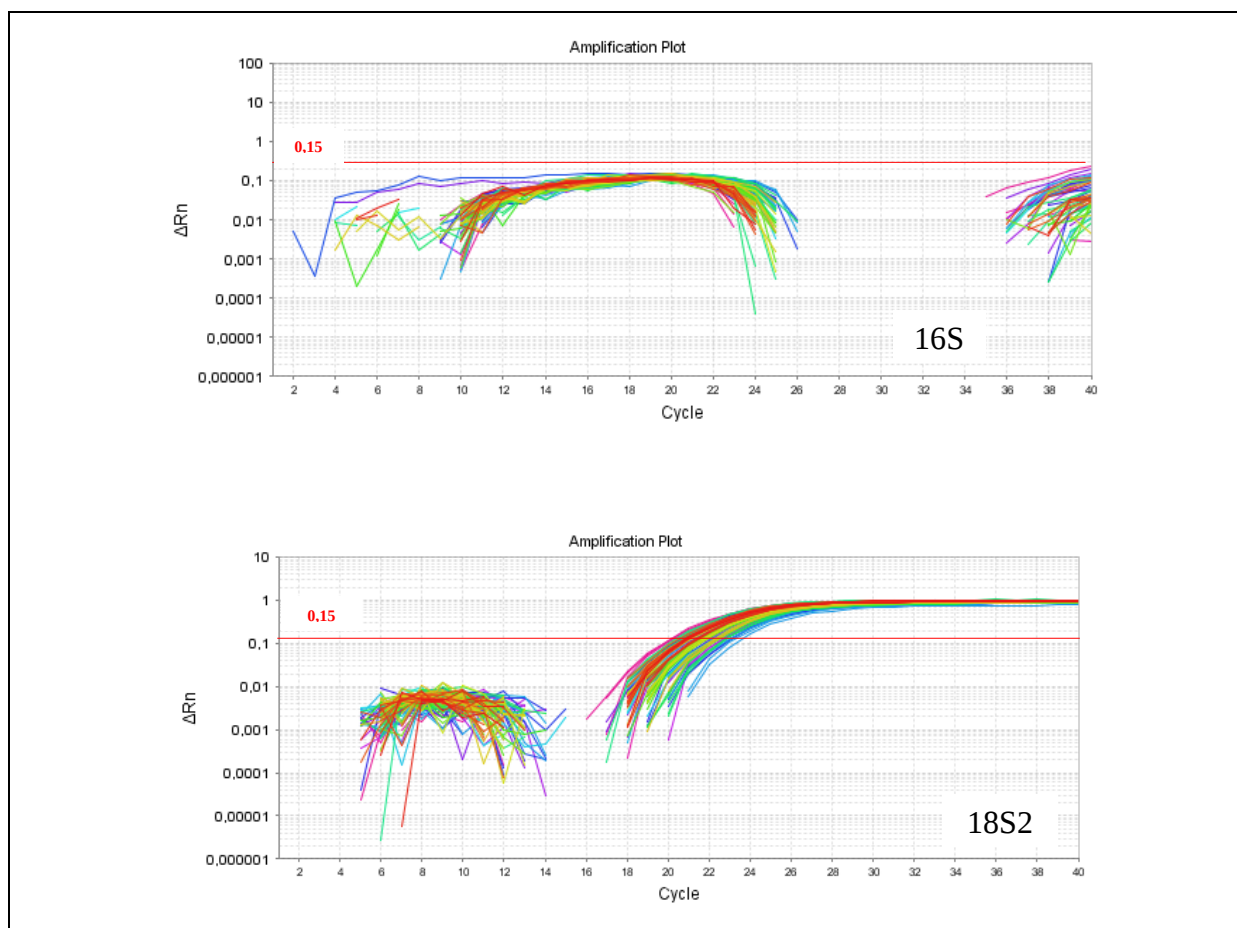
<i>Bactérias</i>	Origem				
	Controle	Isolado de tecido	Isolado clínico	Pulmonar	Ambiental
<i>M. simiae</i>	1	2			
<i>M. kansasii</i>	1			1	
<i>M. africanum</i>	1				
<i>M. goodii</i>		2			
<i>M. avium</i>		1			
<i>M. abscessus</i>		1		1	
<i>M. abscessus bolletii</i>				1	
<i>M. fortuitum</i>		1		1	1
<i>M. bovis</i> BCG			2		
<i>M. tuberculosis</i>	1			1	
<i>M. canettii</i>	2				
<i>M. intracellulare</i>				1	
<i>M. pinnipedii</i>	1				
<i>Nocardia</i> sp.					1

Fonte: A autora, 2018.

Os resultados obtidos na qPCR para as amostras dos pacientes que foram diagnosticados com outras dermatoses também estavam de acordo com o esperado, ou seja, não foi verificado sinal de amplificação para o alvo bacteriano, apenas para o alvo humano.

Constatando assim, a ausência de DNA de *M. leprae* nas amostras analisadas e a especificidade do sistema em não apresentar nenhum falso positivo (Figura 22).

Figura 22 – Resultado de PCR em tempo real analisando amostras de pacientes com outras dermatoses utilizando o *Mastermix* do IBMP para reação *multiplex* (alvos 16S e 18S2)



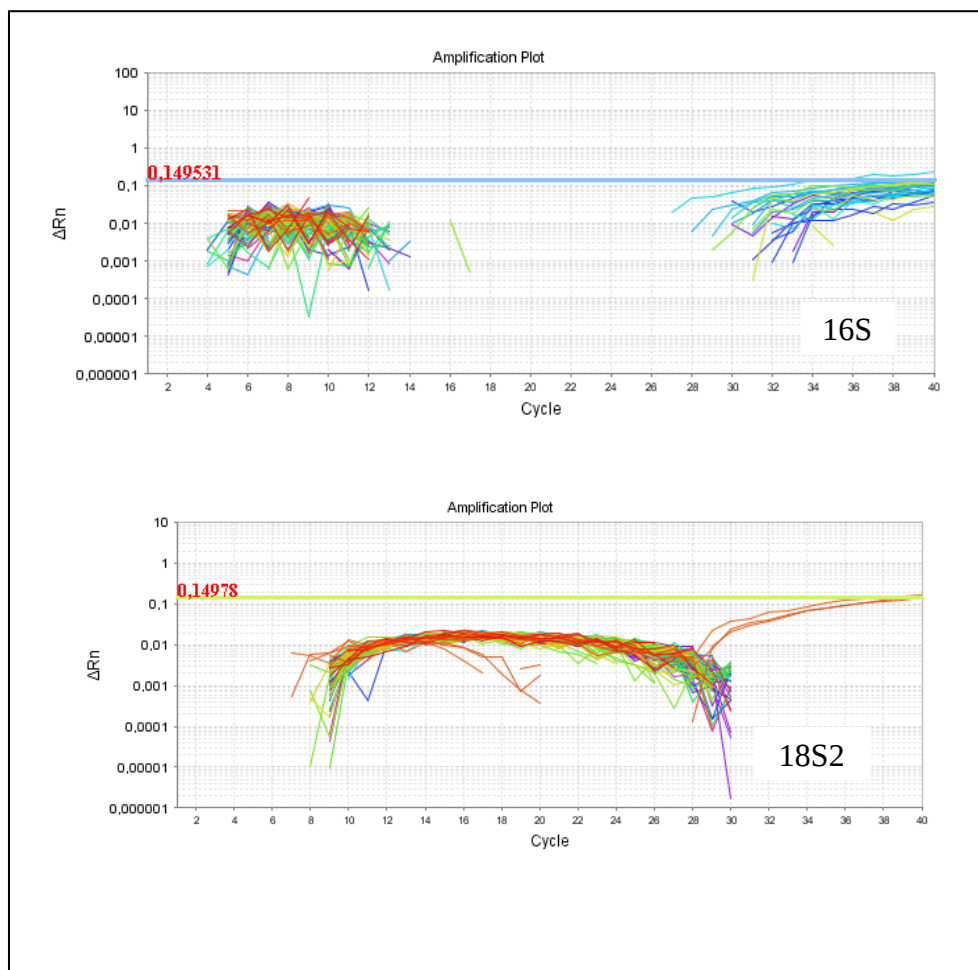
Nota: Gráfico de amplificação (alvos 16S e 18S2) das amostras de pacientes diagnosticados com outras dermatoses gerado pelo software do equipamento ABI7500. No eixo y (ΔRn) observa-se a variação da fluorescência emitida e no eixo x (Cycle) o número de ciclos da reação. O traço horizontal, com o valor de $\pm 0,15$, representa o limiar de detecção da fluorescência (*Threshold*). A quantidade de fluorescência obtida durante a reação de PCR produz uma curva de amplificação que na fase exponencial ultrapassa o limiar de detecção, permitindo a quantificação do material genético.

Fonte: A autora, 2018.

No caso do painel de amostras contendo DNA de outras bactérias foi possível constatar que não houve amplificação significativa, ou seja, nenhuma amostra gerou sinal de fluorescência suficiente para ultrapassar o limiar de detecção (*Threshold*) para nenhum dos dois alvos analisados (Figura 23). Assim, comprovou-se a especificidade do sistema

desenvolvido para fins de detecção de DNA de *M. leprae* para ser empregado como diagnóstico complementar.

Figura 23 – Resultado de PCR em tempo real analisando amostras contendo DNA de diferentes bactérias utilizando o *Mastermix* do IBMP para reação *multiplex* (alvos 16S e 18S2)



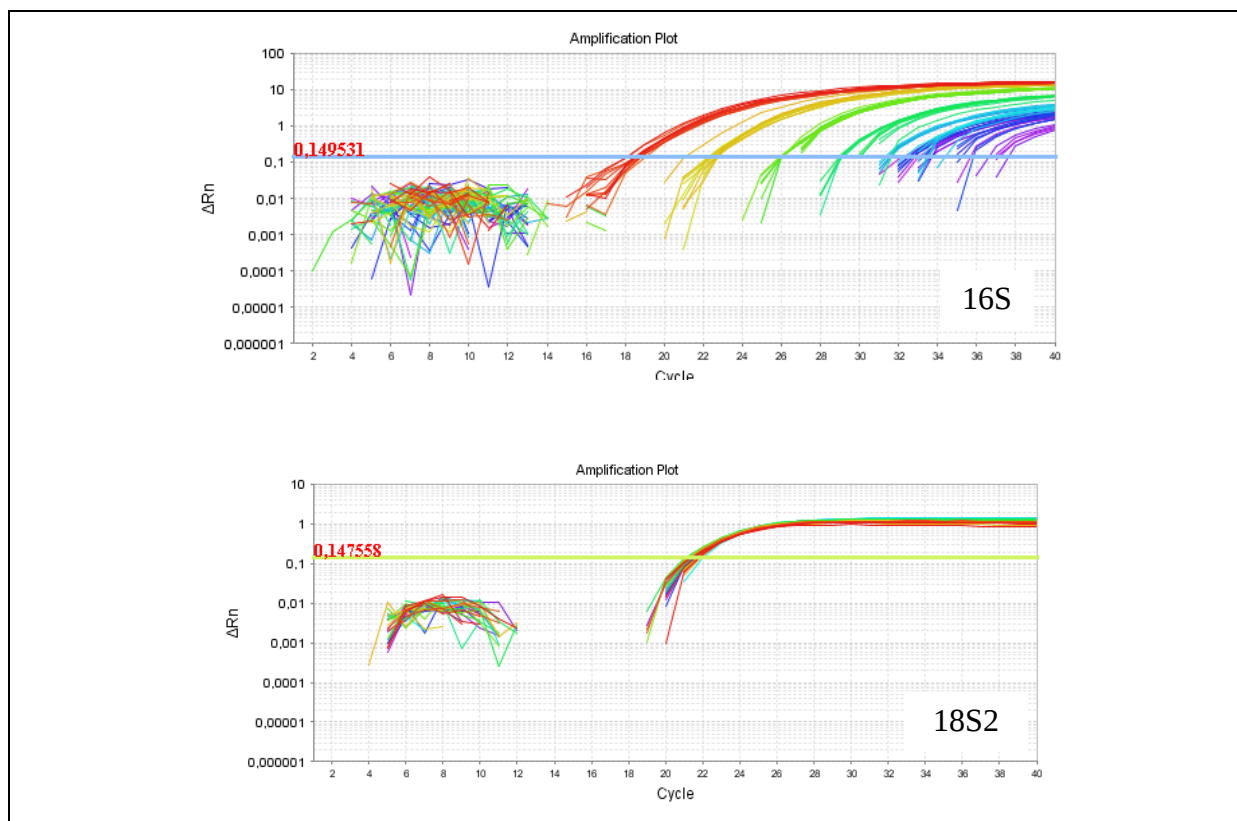
Nota: Gráfico de amplificação (alvos 16S e 18S2) das amostras de diferentes bactérias gerado pelo software do equipamento ABI7500. No eixo y (ΔRn) observa-se a variação da fluorescência emitida e no eixo x (Cycle) o número de ciclos da reação. O traço horizontal, com o valor de $\pm 0,15$, representa o limiar de detecção da fluorescência (*Threshold*). A quantidade de fluorescência obtida durante a reação de PCR produz uma curva de amplificação que na fase exponencial ultrapassa o limiar de detecção (C_T), permitindo a quantificação do material genético.

Fonte: A autora, 2018.

No início do desenvolvimento do *kit*, a sensibilidade do sistema foi avaliada, porém para a validação é necessário analisar a reprodutibilidade desses resultados. Sendo assim, as amostras que compõem a curva padrão (1ng-1fg de DNA de *M. leprae* purificado e diluído em DNA humano) foram analisadas em 8 replicatas em uma mesma placa de qPCR. Como pode ser observado (Figura 24), houve reprodutibilidade da sensibilidade do sistema

(detecção de até 1fg de DNA de *M. leprae*) para o alvo 16S no *multiplex*; já o alvo 18S2 se manteve constante como o esperado já que o DNA de *M. leprae* foi diluído nas mesmas concentrações de DNA extraído a partir de amostra de sangue de indivíduo saudável.

Figura 24 – Resultado de PCR em tempo real analisando amostras da curva padrão em replicatas demonstrando a reprodutibilidade da sensibilidade obtida com o sistema desenvolvido



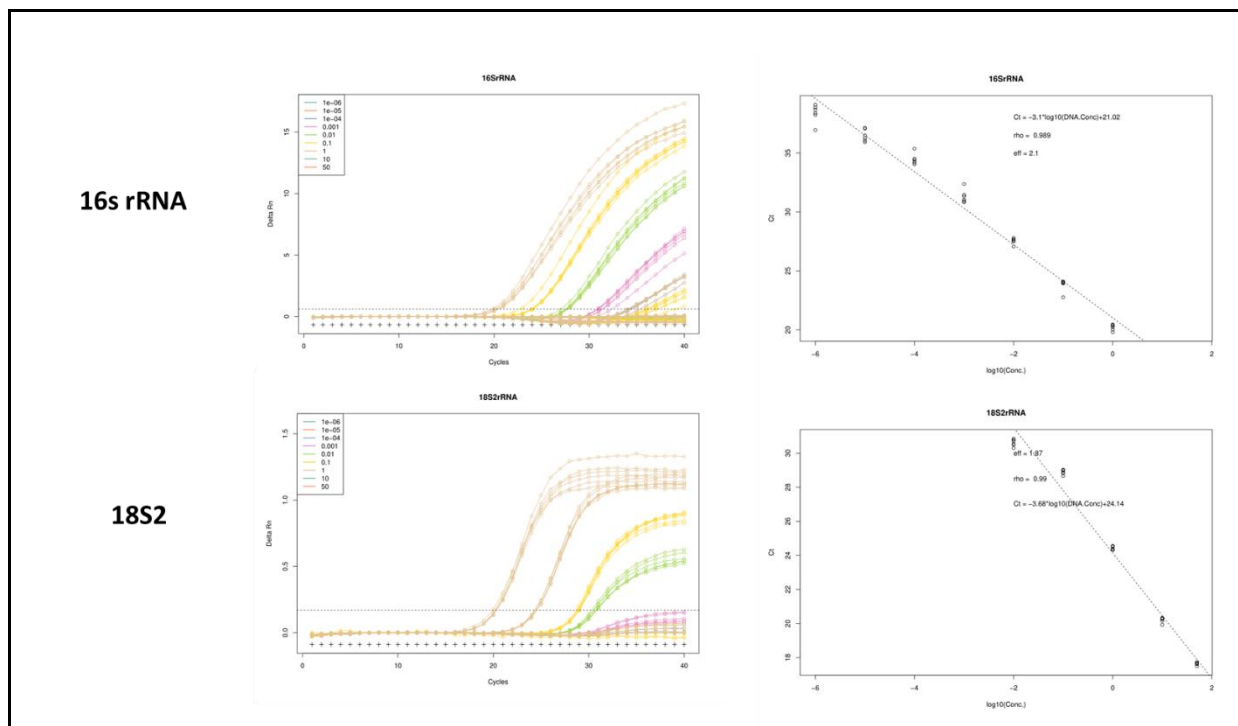
Nota: Gráfico de amplificação (alvos 16S e 18S2) das amostras da curva padrão em replicatas (8x) gerado pelo software do equipamento ABI7500. No eixo y (ΔRn) observa-se a variação da fluorescência emitida e no eixo x (Cycle) o número de ciclos da reação. O traço horizontal, com o valor de 0,15, representa o limiar de detecção da fluorescência (*Threshold*). A quantidade de fluorescência obtida durante a reação de PCR produz uma curva de amplificação que na fase exponencial ultrapassa o limiar de detecção (C_T), permitindo a quantificação do material genético.

Fonte: A autora, 2018.

A última etapa do projeto compreendeu a análise estatística visando a comprovação da eficiência do *kit*. Assim, seria possível demonstrar que o sistema estaria apto a se tornar padrão ouro em diagnóstico molecular de hanseníase e ser implementado nacionalmente.

Sendo assim, seguiram-se as avaliações finais com o sistema *multiplex* 16S + 18S2 (Figura 25). A análise dos dados de cada ponto de diluição em sextuplicata foi realizada considerando o desvio padrão e a média de C_t no programa R por regressão linear.

Figura 25 – Curva padrão e análise de regressão linear para o *multiplex* 16S rRNA/18S2



Nota: Resultados das amplificações por qPCR obtidos a partir das amostras da curva padrão. Experimento conduzido em sextuplicatas, utilizando as concentrações de 5ng a 5fg de DNA de *M. leprae* por reação para os dois alvos (16S e 18S2). As curvas e a reta de regressão linear foram construídas pelo programa R.

Fonte: A autora, 2018.

A eficiência do ensaio é constatada através da base no *slope* (inclinação da curva), intercepção do eixo Y e coeficiente de correlação. Para a reação de PCR em tempo real a eficiência ideal é de 100%, o que corresponde a um *slope* ou inclinação na curva de -3.32X (Life Technologies™, 2012). A eficiência da reação deve variar entre 90-110%. Uma eficiência acima de 110% significa amplificação além do esperado e abaixo de 90%, amplificação menor do que esperado. A intercepção do eixo Y corresponde ao valor esperado de Ct no eixo, caso o menor número de cópias alcançado no eixo X ocasione uma amplificação. É “teoricamente” associado ao limite da linearidade da reação, definindo o menor número de cópias que pode ser fiavelmente quantificado. Já o valor de rho, que indica a correlação entre o Ct e a concentração de DNA na reação, um valor mais próximo de 1 é a melhor correlação que pode ser observada.

Os parâmetros avaliados (curva padrão e a regressão linear) para o sistema de qPCR desenvolvido, mostraram que o mesmo é bastante eficiente no que se refere ao nível de amplificação dos alvos analisados. Isso pode ser constatado através dos valores de *slope*, bem

próximos do ideal, pelos números do coeficiente de correlação e pelos altos valores de eficiência de amplificação para os alvos 16S e 18S2 (Tabela 5).

Tabela 5 – Parâmetros considerados para a análise e os resultados obtidos através da curva padrão para o sistema *multiplex* (16S + 18S2)

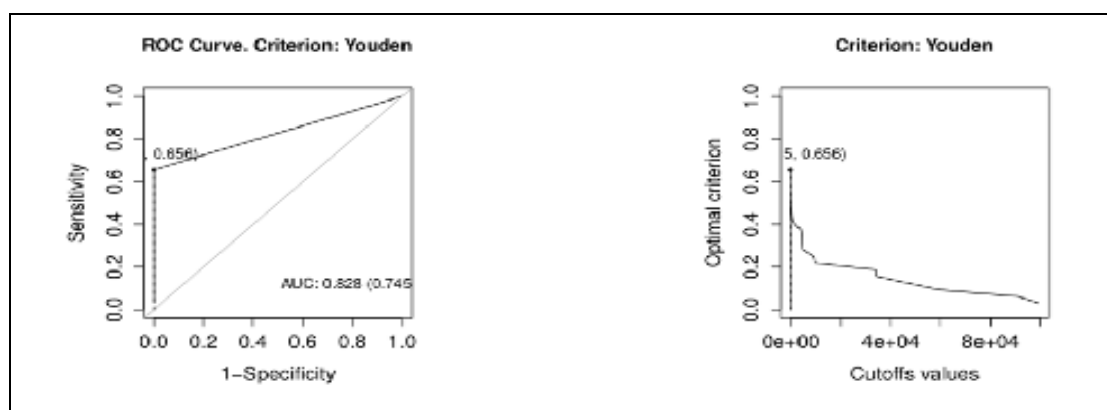
Multiplex	Análise	Fluorescência (Threshold)	Slope	Intercept	rho	Eficiência de amplificação
16S + 18S2	16S rRNA	0,61	-3,1	21,02	0,989	110,3%
	18S2	0,17	-3,68	24,14	0,99	87,1%

Fonte: A autora, 2018.

Para determinar o ponto de corte, valor este que define um resultado positivo ou não para hanseníase, utilizou-se uma Curva ROC (*Receiver Operating Characteristic Curve*). A curva ROC analisa a sensibilidade do sistema *versus* a especificidade do mesmo.

A escolha do ponto de corte deve ser baseada em uma combinação ótima tanto da sensibilidade quanto da especificidade, pois classificar um indivíduo como doente dado que ele não é (falso positivo) e classificar um indivíduo como não doente dado que ele é (falso negativo) pode acarretar problemas. Através da análise da curva ROC, foi definido que o ponto de corte referente a combinação da sensibilidade e da especificidade é o que mais se aproxima do canto superior esquerdo dos gráfico abaixo (Figura 26).

Figura 26 – Curva ROC (Receiver Operating Characteristic curve) do alvo 16S rRNA



Nota: Resultado da Curva ROC - Esta análise por meio de um método gráfico, permite estudar a variação da sensibilidade e especificidade, para diferentes valores de corte. No eixo y encontra-se o nível de sensibilidade (taxa de verdadeiro positivo) do teste (65,6%), já no eixo x o quanto este é específico (taxa de falso positivo) (0%). A reta é a linha de referência e a curva - ROC - apresentou uma alta acurácia (0,83) para o alvo bacteriano presente no sistema *multiplex*. O Índice de Youden define o cut-off ótimo da curva ROC (figura da direita).

Fonte: A autora, 2018.

A sensibilidade analítica da PCR em tempo real foi avaliada através de 7 concentrações (5ng; 500pg; 50pg; 5pg; 500fg; 50fg; 5fg), cada uma foi aplicada 6 vezes (sextuplicata), sendo o mesmo tipo de ensaio repetido por 5 dias. Assim, cada concentração avaliada gerou um total de 30 amplificações. Para assegurar a qualidade dos experimentos foi usado o mesmo lote de reagentes.

O ponto de corte que define pacientes com hanseníase dos indivíduos que não possuem a doença para o *multiplex* desenvolvido nesse projeto foi de 0,149 para o alvo 16S (Tabela 6).

Tabela 6 - Resultados obtidos a partir da árvore de decisão gerada para o alvo bacteriano presente no *multiplex* (16S + 18S2) e que devem ser usados como parâmetros para o diagnóstico de hanseníase

Alvo	Ponto de corte	Sensibilidade	Especificidade	Acurácia
16S	0,149	0,6562	1	0,828

Fonte: A autora, 2018.

Na padronização da análise por qPCR foram definidos os valores de *thresholds* ideais para serem considerados após a amplificação utilizando as condições pré-estabelecidas no presente estudo, ou seja, utilização do *Mastermix* desenvolvido pelo IBMP e análise na plataforma em tempo real 7500 Standard®. Para o *multiplex* foram definidos os valores de 0,61 (16S) e 0,17 (18S2).

Os resultados obtidos nesse estudo indicam que os sistemas desenvolvidos são eficientes o bastante para serem utilizados no diagnóstico molecular da hanseníase.

5.3 Elaboração de um protocolo operacional padrão (POP)

Com o desenvolvimento de um sistema de diagnóstico molecular para a hanseníase, a elaboração de um protocolo operacional padrão (POP) se faz extremamente necessária para que o mesmo possa ser utilizado em diferentes centros de referência. Assim, é possível controlar todas as etapas de execução e, dessa forma, garantir a sua reprodutibilidade no que

se refere aos resultados. Nesse sentido, um POP foi elaborado contendo as informações de todo o processo proposto nesse estudo para a realização do diagnóstico molecular para os indivíduos com suspeita de hanseníase e seus contatos (APÊNDICE).

6 DISCUSSÃO

O controle da hanseníase apresenta alguns obstáculos para sua efetividade, mesmo sendo uma doença curável. Há a necessidade do desenvolvimento de estratégias adequadas para a detecção e proteção da população suscetível, especialmente para os contatos domiciliares de pacientes com hanseníase. Esse grupo é compreendido por toda e qualquer pessoa que resida ou tenha residido com o doente nos últimos cinco anos (GOULART et al., 2008; DURÃES et al., 2010).

Uma ampla variedade de fatores tem sido associada à hanseníase entre os contatos, incluindo os fatores individuais, os socioeconômicos, os biológicos e os fatores epidemiológicos relacionados ao caso índice. Autores argumentam que, embora seja comum associar o risco de contaminação ao grau de intimidade entre o paciente e o contato, outros fatores compartilhados entre os indivíduos, incluindo o *background* genético, podem contribuir para a infecção (dos SANTOS et al., 2013). Sendo assim, a vigilância dos indivíduos considerados contatos dos pacientes hansenianos é importante para a quebra da cadeia epidemiológica de transmissão da hanseníase. Atividades de educação sobre a doença para o paciente, família e comunidade, bem como o desenvolvimento de uma ferramenta para o diagnóstico precoce são as principais estratégias para o controle da enfermidade (SARNO et al., 2012).

O diagnóstico da hanseníase é majoritariamente clínico, porém, em alguns centros de pesquisa e diagnóstico, ele pode ser confirmado por evidências de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) em esfregaços de pele ou pela presença de alterações nas características histopatológicas nos nervos ou na pele. No entanto, os bacilos são raramente encontrados nas formas paucibacilares (PB) desta doença. Até o presente momento, nenhum sistema considerado “padrão-ouro” foi estabelecido para diagnosticar estes casos (BÜHRER-SÉKULA et al., 2009; BARBIERI et al., 2014).

A busca por um método preciso e eficaz que fosse capaz de diagnosticar os pacientes paucibacilares e os contatos assintomáticos impulsionou diversos estudos. Os resultados obtidos demonstraram que a PCR seria uma ferramenta importante e que poderia ser usada para detectar o agente etiológico da doença (MARTINEZ et al., 2011; REIS et al., 2014; BARBIERI et al., 2014).

A metodologia de qPCR permite detectar e quantificar bacilos abaixo do limiar dos resultados obtidos através do diagnóstico microscópico. Sendo assim, deveria ser considerada

como método “padrão-ouro” em laboratórios de referência para o diagnóstico da hanseníase, principalmente em regiões endêmicas.

Gama et al (2018) confirmaram o potencial significativo de qPCR para detecção de DNA de *M. leprae* em casos de hanseníase com índice baciloscópico negativo e em contatos domiciliares assintomáticos. Nesse estudo, foi observado que 25% (n=5) dos casos considerados PB e 30% (n=3) de indivíduos identificados como MB que apresentaram IB negativo foram positivos para qPCR. No caso dos contatos domiciliares, embora todos tenham sido considerados assintomáticos na avaliação clínica, 23,9% (n=27) demonstraram a presença de DNA bacilar em níveis semelhantes ao grupo de pacientes PB em amostras de linfa coletadas do lóbulo da orelha. A detecção de DNA nos contatos demonstra a transmissão da doença nesse grupo.

Sabendo que a doença tem um longo período de incubação e que os sintomas são difíceis de detectar nos estágios iniciais da hanseníase, a vigilância dos contatos domiciliares com resultados positivos para qPCR é extremamente relevante.

Com o intuito de investigar a precisão e a sensibilidade analítica da qPCR em tempo real o presente estudo foi conduzido. Principalmente porque em investigação similar realizada anteriormente por integrantes do grupo (MARTINEZ et al., 2011), o desenho experimental não contemplou o uso de um alvo como controle interno na reação. Além disso, não foram feitas comparações entre os dois formatos (*monoplex* e *multiplex*) e nem mesmo avaliados o uso de reagentes de origem comercial e *homemade*.

A técnica de qPCR é uma ferramenta molecular que vem mostrando seu poder de aplicabilidade em diversos estudos, tanto pela sua significativa sensibilidade e quanto por sua especificidade. Desta forma, seu emprego é essencial, notoriamente, em centros de referência para apoiar o diagnóstico individual e os programas de controle a curto e a longo prazos (HOSSAIN et al., 2017; SIWAL et al., 2018). A técnica de qPCR vem sendo utilizada no diagnóstico de diversas doenças, como: zika (BONALDO et al., 2016); dengue (SHARMA et al., 2018), tuberculose (DEMIRCI et al., 2018); HIV (TSANG et al., 2018); hepatite B e C (ROCHA et al., 2018).

Nas doenças endêmicas, indivíduos assintomáticos não são, frequentemente, identificados pela avaliação epidemiológica realizada com métodos não moleculares. Assim, estes podem se tornar reservatórios do agente etiológico e desta forma manter a cadeia de transmissão ativa (HATTA et al., 1995; BEYENE et al., 2003). Embora os custos relacionados aos testes de diagnósticos moleculares ainda sejam altos, uma das vantagens que deve ser considerada para a sua instituição está relacionada a possibilidade de detecção

precoce de uma doença, o que certamente proporcionaria uma redução dos custos referentes ao tratamento.

Projetos semelhantes, no que se refere ao sistema de qPCR avaliado nessa dissertação de mestrado, já foram conduzidos pelo grupo colaborador (IBMP). O desenvolvimento do sistema NAT (do inglês, *Nucleic Acid Testing*) começou com um consórcio entre três instituições (Instituto de Tecnologia em Imunobiologia Bio-Manguinhos/Fiocruz, Universidade Federal do Rio de Janeiro e o Instituto de Biologia Molecular do Paraná), com o propósito de estimular a produção de kits para diagnóstico utilizando reagentes nacionais, sendo coordenado pelo Ministério da Saúde (ROCHA et al., 2018).

A eficiência do *Mastermix* brasileiro desenvolvido pelo IBMP e aprovado pela ANVISA em 2010, tem sido comprovada em ensaios para a detecção e discriminação de vírus como: o da imunodeficiência humana (HIV) e os das hepatites C (HCV) e B (ROCHA et al., 2018). O desenvolvimento do *kit* NAT HIV/HCV trouxe vários benefícios para o Brasil, como a implementação de políticas focadas em pesquisa e desenvolvimento, a nacionalização da tecnologia e suprimentos, avanço tecnológico, instalações certificadas por boas práticas de fabricação, investimentos em competências de formação, o desenvolvimento de mão-de-obra qualificada, a redução da necessidade internacional em relação a testes de diagnóstico e suprimentos.

O sistema NAT brasileiro pode ser considerado um marco no diagnóstico de triagem de doenças infecciosas no Brasil (ROCHA et al., 2018). Através dele surgiu uma nova vertente para alguns segmentos dos serviços de saúde vinculados ao SUS com focos em ações preventivas na área de diagnóstico. Com isso, a detecção de outros agentes causais de doenças, como dengue, chikungunya e zika (BONALDO et al., 2016), tornou-se possível.

No caso da hanseníase, estudos demonstraram que é possível usar a PCR em tempo real (qPCR) para detectar *M. leprae* em diferentes amostras biológicas (GOULART et al., 2007; STEINMANN et al., 2017). Todavia, ainda não existe um protocolo de consenso para a detecção do agente etiológico da doença. Assim, o Laboratório de Hanseníase (LAHAN) da Fiocruz, juntamente com o Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP) elaboraram uma proposta para o desenvolvimento e padronização de um *kit* de diagnóstico para a hanseníase. Este foi desenhado para ser de fácil execução, eficaz e composto por reagentes nacionais, o que ocasionaria a redução de custos.

Alguns conceitos e experimentos referenciados adotados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) foram

considerados para estabelecer os requisitos mínimos para o desenvolvimento e a validação dos procedimentos moleculares como teste de diagnóstico da hanseníase.

O processo de fabricação de um *kit* para diagnóstico *in vitro* começa com a pesquisa e seu desenvolvimento. Na etapa do desenvolvimento são definidas as quantidades a serem acrescentadas de cada amostra, reagentes, condições da reação e os equipamentos utilizados (FERREIRA, 2005; de OLIVEIRA, 2015). Todas essas etapas foram realizadas durante o andamento desse projeto e encontram-se descritas detalhadamente na forma de um POP (Procedimento Operacional Padrão), disponível no material suplementar dessa dissertação.

O sistema de qPCR foi elaborado para a análise de diferentes alvos simultaneamente, sendo otimizado com primers e *mastermix* produzidos pelo IBMP. Durante o processo de desenvolvimento, foram testadas diferentes concentrações de primers, sondas e plataformas de PCR em tempo real (7500 e StepOne Plus).

É sabido que a principal desvantagem da utilização de um sistema de qPCR como diagnóstico molecular é o seu custo, que, na maioria das vezes, não é acessível para qualquer laboratório. Todavia, o *kit* desenvolvido nesse projeto, por utilizar reagentes nacionais, demonstra custos mais baixos. Assim, a sua utilização na rotina diagnóstica torna-se viável em centros de referência em hanseníase no Brasil.

Estratégias sensíveis e precisas para a quantificação de patógenos são desenvolvidas utilizando um marcador para avaliar a eficácia do teste. A maioria das análises realizadas por PCR em tempo real usam plasmídeos recombinantes como controle interno de amplificação (IAC), que é adicionado a cada amostra antes da extração de DNA (DUFFY et al., 2013). Embora isso signifique uma melhoria na qualidade da qPCR para quantificação de DNA, essa etapa é trabalhosa, já que requer vários passos como: clonagem, purificação do DNA do plasmídeo, digestão do plasmídeo, quantificação, extração e análise quantitativa (McGUINNESS et al., 2009).

Todos esses pontos não são necessários no sistema desenvolvido no presente estudo, sendo esta uma outra vantagem do *kit*. O sistema foi elaborado num formato *multiplex*, onde é possível analisar na mesma reação um alvo específico do bacilo (16S rRNA) e um alvo de mamífero (18S2). Desta forma, o sistema tem como controle interno da reação um gene do hospedeiro.

A vantagem de utilizar um gene como controle interno é que este funciona como uma verificação do processo de extração e da própria reação. Assim, se o processo de extração das amostras for controlado e eficiente, o nível de detecção (valor de Ct) do alvo

18S2 na PCR tem que ser o mais controlado/homogêneo possível. Já o valor de Ct para o alvo 16S deve variar de acordo com a quantidade de DNA de *M. leprae* nas amostras analisadas, já que se utiliza a mesma quantidade de DNA total por reação.

A análise de amplificação gênica realizada pela PCR em tempo real para diagnóstico de doenças pode ser avaliada utilizando duas formas de quantificação: a absoluta e a relativa. Na quantificação relativa é avaliada a relação do *Threshold Cycle* (Ct) obtido nas amostras dos pacientes em relação aos indivíduos saudáveis; já na quantificação absoluta o número de cópias do gene de estudo é determinado através da curva de número de cópias padrão (de SOUZA, 2007).

No caso da hanseníase, devido à dificuldade de entendimento do mecanismo de infecção e ao amplo espectro da doença, utiliza-se a análise absoluta como padrão. Assim, o desenvolvimento e padronização do sistema de qPCR *multiplex* baseou-se na estratégia TaqMan, que é capaz de quantificar o número de genomas de *M. leprae* contido na amostra de interesse. Isso foi possível através da análise de regressão linear baseada nos resultados gerados pela curva padrão, conforme descrito por Martinez et al (2011). A construção da curva padrão é feita com amostras contendo concentrações conhecidas do DNA alvo, que são diluídas em série para a verificação do deslocamento dos Cts entre estas. Portanto, sua avaliação é essencial, principalmente, em ensaios quantitativos.

No caso do agente etiológico da hanseníase, que não é cultivável *in vitro* e cuja contagem da parasitemia não reflete o número de genomas presente na amostra, fica evidente a necessidade do uso também de uma curva de diluição de DNA de *M. leprae* purificado. Através dessa é possível determinar a linearidade que se traduz na eficiência da reação, onde cada cópia representa um genoma, ou seja, realmente um bacilo.

A linearidade de um método analítico revela a habilidade do método produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito numa dada faixa de aplicação. Assim, é possível verificar se existe uma relação linear entre os valores medidos e as concentrações dos padrões de calibração. Em termos gráficos, a linearidade do método pode ser comprovada através do coeficiente de determinação (R^2) da equação da reta de calibração obtida, que reflete o grau de relação ou ligação entre as variáveis X (concentração) e Y (resposta); considera-se o resultado de acordo com o valor de R^2 (ou rho), que deve estar o mais próximo de 1. No caso do *multiplex*, o valor de rho foi de 0,99 para ambos os alvos. Dessa maneira, foi constatado que o limite inferior de linearidade (valor máximo detectável) das curvas padrão seria de 3 cópias/ μ L (ponto da curva: 10fg/ μ L; Ct médio: 38,5). Esse valor possibilitaria a identificação dos indivíduos classificados como paucibacilares, já que estes

pacientes são de difícil diagnóstico por apresentarem poucas lesões e índice baciloscópico negativo.

A partir desses resultados foi desenvolvida uma planilha que permite fazer uma associação entre o valor de Ct detectado e o número de genomas de *M. leprae* na reação. Sendo esse mais um importante resultado para a aplicação dessa ferramenta no diagnóstico, já que de acordo com o número de genomas o médico terá mais um dado que poderá auxiliar na conduta clínica. Vale ressaltar, que um resultado de PCR determinado como “positivo” ou “negativo” não é o suficiente em muitos casos para a definição do diagnóstico. Em alguns casos, como os de acompanhamento de pacientes e os de suspeita de recidiva, a informação do número de genomas obtidos em diferentes momentos é bem útil.

O processo de validação de um produto como esse tem por objetivos: i) assegurar que as condições adequadas de exame e as instruções de uso estejam bem definidas; ii) avaliar a dimensão dos erros aleatório e sistemático; iii) analisar seu desempenho quanto à utilidade médica dos resultados obtidos; e iv) estabelecer as condições ideais de uso. Além disso, no processo inicial alguns parâmetros devem ser testados e ajustados, como a sensibilidade, especificidade, limites de detecção, repetitividade, reprodutibilidade e estabilidade (MOREIRA et al., 2013, 2017).

Na etapa de validação do *kit* de diagnóstico de hanseníase foram analisadas a sensibilidade, a especificidade, a repetitividade e a reprodutibilidade do sistema através da avaliação de amostras de *M. leprae* purificado (para a construção de uma curva padrão), amostras de pacientes com hanseníase confirmada, amostras de pacientes com outras dermatoses e amostras contendo outras bactérias.

A análise de eficiência para os alvos da reação *multiplex* (16S e 18S2) foi de $\rho=0,99$. Resultado similar ao encontrado por Martinez et al (2011) quando analisaram o alvo 16S rRNA em reação *monoplex*. Isso demonstra que a adição de mais um alvo na mesma reação não gerou perda de eficiência para o alvo bacteriano no *kit*. Além disso, o alvo usado como controle da reação foi tão eficiente quanto o primeiro.

Quando o resultado obtido nesse trabalho foi analisado e comparado com o encontrado por Martinez et al em 2011, maiores níveis de sensibilidade ($0,65 > 0,50$), especificidade ($1=1$) e acurácia ($0,82 > 0,75$) para o alvo 16S foram encontrados na reação *multiplex* desenvolvida. Esse resultado pode estar relacionado com a eficiência dos reagentes produzidos pelo IBMP, já que no início do desenvolvimento do *kit*, quando as amostras foram analisadas com reagentes nacionais (IBMP) e comerciais (Applied Biosystems® / Biosearch Technologies), houve maior eficiência na reação conduzida com esses reagentes.

A etapa final da validação desse *kit* será executada pela equipe de fabricação e qualidade do IBMP. Trata-se da produção de um lote piloto em escala real de produção, seguindo todas as orientações definidas para a produção. Essa etapa servirá para verificar se os procedimentos para a produção e o processo de confecção estão corretos e se os resultados esperados serão reproduzidos.

CONCLUSÕES:

- a) nesse estudo foi desenvolvida e padronizada uma análise quantitativa por PCR para o diagnóstico de hanseníase;
- b) a análise demonstrou resultado robusto, capaz de estimar a quantidade de bacilos presentes em amostras (análise quantitativa) e não apenas detectar ou não DNA de *M. leprae* nas mesmas (análise qualitativa);
- c) os resultados obtidos nesse estudo sugerem que o sistema desenvolvido pode efetivamente contribuir para:
 - o diagnóstico precoce e eficiente da hanseníase;
 - auxiliar na compreensão dos grupos que apresentam risco maior de contrair a enfermidade;
 - uma melhora no quadro epidemiológico da hanseníase no Brasil.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, E.C.A. Bacilos de *Mycobacterium leprae* corados em vermelho pela fucsina através do método de Ziehl-Nilseen. Aumento de 1000x. 2012.
- ANDRADE, V. L. G. *Evolução da hanseníase no Brasil e perspectivas para sua eliminação como um problema de saúde pública*. 1996. 102 p. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1996.
- ARAUJO, A. E. R. A. et al. Complicações neurais e incapacidades em hanseníase em capital do nordeste brasileiro com alta endemicidade. *Rev Bras Epidemiol.*, v. 17, n. 4, p. 899-910, 2014.
- ARAUJO, S. et al. Molecular Evidence for the Aerial Route of Infection of *Mycobacterium leprae* and the Role of Asymptomatic Carriers in the Persistence of Leprosy. *Clin Infect Dis.*, v. 63, n. 11, p. 1412-1420, 2016.
- ARRAES, M. L. B. M. et al. Natural environmental water sources in endemic regions of northeastern Brazil are potential reservoirs of viable *Mycobacterium leprae*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 112, n. 12, p. 805-811, 2017.
- ARYA, M. et al. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn.*, v. 5, n. 2, p. 209-219, 2005.
- AZEVEDO, M. C. et al. qPCR detection of *Mycobacterium leprae* in biopsies and slit skin smear of different leprosy clinical forms. *Braz J Infect Dis.*, v. 21, n. 1, p. 71-78, 2017.
- BALAMAYOORAN, G. et al. The armadillo as an animal model and reservoir host for *Mycobacterium leprae*. *Clin Dermatol.*, v. 33, n. 1, p. 108-115, 2015.
- BARRETO, J. G. et al. High rates of undiagnosed leprosy and subclinical infection amongst school children in the Amazon Region. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 107 (Suppl. I), p. 60-67, 2012.
- BARRETO, J. G. et al. Spatial epidemiology and serologic cohorts increase the early detection of leprosy. *BMC Infect Dis.*, v. 15, p. 527, 2015.
- BARBIERI, R. R. et al. Diagnostic challenges of single plaque-like lesion paucibacillary leprosy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 109, n. 7, p. 944-947, 2014.
- BEYENE, D. et al. Nasal carriage of *Mycobacterium leprae* DNA in healthy individuals in Lega Robi village, Ethiopia. *Epidemiol Infect.*, v. 131, n. 2, p. 841-848, 2003.
- BLAKE, L. A. et al. Environmental nonhuman sources of leprosy. *Rev Infect Dis.*, v. 9, n. 3, p. 562-577, 1987.
- BONALDO, M. C. et al. Isolation of Infective Zika Virus from Urine and Saliva of Patients in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.*, v. 10, n. 6, p. 4816-4832, 2016.

BRANDSMA, J. W.; YODER, L.; MACDONALD, M. Leprosy acquired by inoculation from a knee injury. *Lepr Rev.*, v. 76, n. 2, p. 175-179, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. *Guia para o Controle da hanseníase*. Brasília: Ministério da Saúde, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Ciência e Tecnologia. Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. *Rev Saude Publica*, v. 44, n. 1, p. 200-202, fev. 2010a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 3.125, de 7 de outubro de 2010. Aprova as Diretrizes para Vigilância, Atenção e Controle da Hanseníase. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 7 de out. 2010b. Seção 1:55.

BRASIL. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico: Hanseníase. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>. 2017a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Guia prático sobre a hanseníase. Brasília, DF : Ministério da Saúde, 2017b. 68 p

BRITTON, W. J.; LOCKWOOD, D. N. Leprosy. *Lancet*, v. 363, n. 9416, p. 1209-1219, 2004.

BROWNE, S. G. How old is leprosy? *Br Med J.*, v. 3, n. 5723, p. 640-641, 1970.

BÜHRER-SÉKULA, S. et al. Simple and fast lateral flow test for classification of leprosy patients and identification of contacts with high risk of developing leprosy. *J Clin Microbiol.*, v. 41, n. 5, p. 1991-1995, 2003.

BÜHRER-SÉKULA, S. et al. The additional benefit of the ML Flow test to classify leprosy patients. *Acta Trop.*, v. 111, n. 2, p. 172-176, 2009.

CHAUSSINAND, R.; BESSE, P. Inoculation of rainbow perch (*Eupomotis gibbosus*) with Hansen's and Stefansky's bacilli. *Rev Bras Leprol.*, v. 19, n. 1, p. 4-7, 1951.

CHO, S. N. et al. Serological specificity of phenolic glycolipid I from *Mycobacterium leprae* and use in serodiagnosis of leprosy. *Infect Immun.*, v. 41, n. 3, p. 1077-1083, 1983.

CHO, S. N. et al. Detection of phenolic glycolipid I of *Mycobacterium leprae* in sera from leprosy patients before and after start of multidrug therapy. *Clin Diagn Lab Immunol.*, v. 8, n. 1, p. 138-142, 2001.

COCITO, C.; DELVILLE, J. Biological, chemical, immunological and staining properties of bacteria isolated from tissues of leprosy patients. *Eur J Epidemiol.*, v. 1, n. 3, p. 202-231, 1985.

COLE, S. T. et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature*, v. 409, n. 6823, p. 1007-1011, 2001.

COURET, M. The behavior of bacillus leprae in cold-blooded animals. *J Exp Med.*, v. 13, n. 5, p. 576-589, 1911.

da SILVA MARTINEZ, T. et al. Oral lesion in leprosy: borderline tuberculoid diagnosis based on detection of *Mycobacterium leprae* DNA by qPCR. *Acta Derm Venereol.*, v. 91, n. 6, p. 704-707, 2011.

da SILVA ROCHA, A. et al. Drug and multidrug resistance among *Mycobacterium leprae* isolates from Brazilian relapsed leprosy patients. *J Clin Microbiol.*, v. 50, n. 6, p. 1912-1917, 2012.

de MACEDO, A. C. et al. Serum anti-phenolic glycolipid-1 IgA correlates to IgM isotype in leprosy patients: a possible candidate for seroepidemiological surveys? *J Clin Lab Anal*, v. 32, n. 3, p. 22276-22282, 2018.

de MATOS, H. J. et al. Leprosy epidemiology in a cohort of household contacts in Rio de Janeiro (1987-1991). *Cad Saude Publica*, v. 15, n. 3, p. 533-542, 1999.

DEMIRCI, M. et al. Diagnostic performance of the RT-qPCR method targeting 85B mRNA in the diagnosis of pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Infect Public Health*, v. 11, n. 5, p. 662-666, 2018.

de OLIVEIRA, N. K. A. *Diagnóstico molecular da malária vivax: precisão e sensibilidade*. 2015. 111 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) – Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2015.

DESFORGES, S. et al. Specific anti-M leprae PGL-I antibodies and Mitsuda reaction in the management of household contacts in New Caledonia. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.*, v. 57, n. 4, p. 794-800, 1989.

de SOUZA, A. C. M. F. *Comparação das técnicas de PCR em tempo real e PCR para o estudo dos genes MYCN, DDX1 e NAG em pacientes portadores de neuroblastoma*. 2007. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

DESIKAN, K. V. Viability of *Mycobacterium leprae* outside the human body. *Lepr Rev.*, v. 48, n. 4, p. 231-235, 1977.

de WIT, M. Y. et al. Application of a polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae* in skin tissues. *J Clin Microbiol.*, v. 29, n. 5, p. 906-910, 1991.

DONOGHUE, H. D.; HOLTON, J.; SPIGELMAN, M. PCR primers that can detect low levels of *Mycobacterium leprae* DNA. *J Med Microbiol.*, v. 50, n. 2, p. 177-182, 2001.

DORAK, M. T. *Real-Time PCR*. Londres, Reino Unido: Edições Taylor & Francis Group. 2006.

Dos SANTOS, D. S. et al. Kinship and Leprosy in the Contacts of Leprosy Patients: Cohort at the Souza Araújo Outpatient Clinic, Rio de Janeiro, RJ, 1987-2010. *J Trop Med.*, v. 2013, p. 1-8, 2013.

DOULL, J. A. The world health organization of the future. *Can J Public Health*, v. 37, p. 220-226, 2001.

DUFFY, T. et al. Analytical performance of a multiplex Real-Time PCR assay using TaqMan probes for quantification of *Trypanosoma cruzi* satellite DNA in blood samples. *PLoS Negl Trop Dis.*, v. 7, n. 1, p. 2000-2010, 2013.

DÜPPRE, N. C. et al. Impact of PGL-I seropositivity on the protective effect of BCG vaccination among leprosy contacts: a cohort study. *PLoS Negl Trop Dis.*, v. 6, n. 6, p. 1711-1718, 2012.

DURÃES, S. M. et al. Epidemiologic study of 107 cases of families with leprosy in Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brazil. *An Bras Dermatol.*, v. 85, n. 3, p. 339-334, 2010.

EIDT, L. M. Breve história da hanseníase: sua expansão do mundo para as Américas, o Brasil e o Rio Grande do Sul e sua trajetória na saúde pública brasileira. *Saúde e Sociedade*, v. 13, n. 2, p. 76-88, 2004.

FERREIRA, A. G. P. *Processo de Transferência da Tecnologia de Produção do Teste Rápido de HIV-1 e HIV-2 em Bio-Manguinhos: Um Modelo para a Incorporação de Novas Tecnologias*. 2005. Dissertação (Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos) – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2005.

FLEURY, R. N. Critérios para o emprego de classificação de Ridley e Jopling na rotina dos laboratórios de anatomia patológica (Primeira parte). *Hansen. Int.* 30, p. 40-45, 2005.

FONTES, A. N. et al. Genetic diversity of *Mycobacterium leprae* isolates from Brazilian leprosy patients. *Lepr Rev.*, v. 80, n. 3, p. 302-315, 2009.

GAMA, R. S. High frequency of *M. leprae* DNA detection in asymptomatic household contacts. *BMC Infect Dis.*, v. 18, n. 153, p. 1-6, 2018.

GHORPADE, A. Inoculation (tattoo) leprosy: a report of 31 cases. *J Eur Acad Dermatol Venereol.*, v. 16, n. 5, p. 494-499, 2002.

GHORPADE, A. Ornamental tattoos and skin lesions. Tattoo inoculation borderline tuberculoid leprosy. *Int J Dermatol.*, v. 48, n. 1, p. 11-13, 2009.

GILLINI, L. et al. Global practices in regard to implementation of preventive measures for leprosy. *PLoS Negl Trop Dis.*, v. 11, n. 5, p. 5399-5403, 2017.

GORMUS, B. J. et al. Experimental leprosy in rhesus monkeys: transmission, susceptibility, clinical and immunological findings. *Lepr Rev.*, v. 69, n. 3, p. 235-245, 1998.

GOULART, I. M. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin lesions of leprosy patients by PCR may be affected by amplicon size. *Arch Dermatol Res.*, v. 299, n. 5-6, p. 267-271, 2007.

GOULART, I. M.; GOULART, L. R. Leprosy: diagnostic and control challenges for a worldwide disease. *Arch Dermatol Res.*, v. 300, n. 6, p. 269-290, 2008.

GOULART, L. R.; GOULART, I. M. Leprosy pathogenetic background: a review and lessons from other mycobacterial diseases. *Arch Dermatol Res.*, v. 301, n. 2, p. 123-137, 2009.

GROSSET, J. The new challenges for chemotherapy research. *Lepr Rev.*, v. 71, p.100-104, 2000.

HANSENÍASE. In: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Agência Fiocruz de Notícias, Glossário de doenças. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2013. Disponível em: <http://www.agencia.fiocruz.br/hanseniasse>. Acesso em: 08/02/2018.

HASTINGS, R. C. MDT and transmission. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.*, v. 66, n. 2, p. 224, 1998.

HATTA, M. et al. Distribution and persistence of *Mycobacterium leprae* nasal carriage among a population in which leprosy is endemic in Indonesia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, v. 89, n. 4, p. 381-385, 1995.

HEID, C. A. et al. Real time quantitative PCR. *Genome Res.*, v. 6, n. 10, p. 986-994, 1996.

HIGUCHI, R. et al. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)*, v. 11, n. 9, p. 1026-1030, 1993.

HONAP, T. P. et al. *Mycobacterium leprae* genomes from naturally infected nonhuman primates. *PLoS Negl Trop Dis.*, v. 12, n. 1, p. 6190-6206, 2018.

HOSSAIN, F. et al. Real-time PCR in detection and quantitation of *Leishmania donovani* for the diagnosis of Visceral Leishmaniasis patients and the monitoring of their response to treatment. *PLoS One*, v. 12, n. 9, p. 185606-185621, 2017.

HUNTER, S. W.; BRENNAN, P. J. A novel phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae* possibly involved in immunogenicity and pathogenicity. *J Bacteriol.*, v. 147, n. 3, p. 728-735, 1981.

HUNTER, S. W.; FUJIWARA, T.; BRENNAN, P. J. Structure and antigenicity of the major specific glycolipid antigen of *Mycobacterium leprae*. *J Biol Chem.*, v. 257, n. 24, p. 15072-15078, 1982.

HUTCHINSON, J. On leprosy and fish-eating: A statement of facts and explanations. *Archibald Constable and Co.*, v. 41, n. 8, p. 327-329, 1906.

ILANGUMARAN, S. et al. Immunological profiles of leprosy patients and healthy family contacts toward M. leprae antigens. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.*, v. 64, n. 1, p. 6-14, 1996.

- IRGENS, L. M. The discovery of the leprosy bacillus. *Tidsskr Nor Laegeforen.*, v. 122, n. 7, p. 708-709, 2002.
- Jl, B. H. Drug resistance in leprosy-a review. *Lepr Rev.*, v. 56, n. 4, p. 265-278, 1985.
- JOB, C. K. et al. Thorns in armadillo ears and noses and their role in the transmission of leprosy. *Arch Pathol Lab Med.*, v. 110, n. 11, p. 1025-1028, 1986.
- JOB, C. K. et al. Transmission of leprosy: a study of skin and nasal secretions of household contacts of leprosy patients using PCR. *Am J Trop Med Hyg.*, v. 78, n. 3, p. 518-521, 2008.
- JOPLING, W. H. Reactions in leprosy. *Lepr Rev.*, v. 41, n. 1, p. 62-63, 1970.
- KAMATH, S. et al. Recognizing and managing the immunologic reactions in leprosy. *J Am Acad Dermatol.*, v. 71, n. 4, p. 795-803, 2014.
- KAZDA, J.; IRGENS, L. M.; MÜLLER, K. Isolation of non-cultivable acid-fast bacilli in sphagnum and moss vegetation by foot pad technique in mice. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.*, v. 48, n. 1, p. 1-6, 1980.
- KAZDA, J. Occurrence of non-cultivable acid-fast bacilli in the environment and their relationship to *M. leprae*. *Lepr Rev.*, v. 52, suppl. 1, p. 85-91, 1981.
- KAZDA, J. et al. Isolation of environment-derived *Mycobacterium leprae* from soil in Bombay. *Lepr Rev.*, v. 57, suppl. 3, p. 201-208, 1986.
- KUBISTA, M. et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med.*, v. 27, n. 2-3, p. 95-125, 2006.
- LAFERTE, J. et al. Ultramicro-ELISA for the detection of IgM antibodies anti *M. leprae*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, v. 33, n. 6, p. 491-495, 1991.
- LAHIRI, R.; KRAHENBUHL, J. L. The role of free-living pathogenic amoeba in the transmission of leprosy: a proof of principle. *Lepr Rev.*, v. 79, n. 4, p. 401-409, 2008.
- LAVANIA, M. et al. Detection of viable *Mycobacterium leprae* in soil samples: insights into possible sources of transmission of leprosy. *Infect Genet Evol.*, v. 8, n. 5, p. 627-631, 2008.
- LOBATO, J. et al. Comparison of three immunological tests for leprosy diagnosis and detection of subclinical infection. *Lepr Rev.*, v. 82, n. 4, p. 389-401, 2011.
- MADIGAN, C. A.; CAMERON, J.; RAMAKRISHNAN, L. A Zebrafish Model of *Mycobacterium leprae* Granulomatous Infection. *J Infect Dis.*, v. 216, n. 6, p. 776-779, 2017.
- MARQUES, L. É. C. et al. Evaluation of 16S rRNA qPCR for detection of *Mycobacterium leprae* DNA in nasal secretion and skin biopsy samples from multibacillary and paucibacillary leprosy cases. *Pathog Glob Health*, v. 112, n. 2, p. 72-78, 2018.

- MARTINEZ, A. N. et al. Evaluation of real-time and conventional PCR targeting complex 85 genes for detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin biopsy samples from patients diagnosed with leprosy. *J Clin Microbiol.*, v. 44, n. 9, p. 3154-3159, 2006.
- MARTINEZ, A. N. et al. Molecular determination of *Mycobacterium leprae* viability by use of real-time PCR. *J Clin Microbiol.*, v. 47, n. 7, p. 2124-2130, 2009.
- MARTINEZ, A. N. et al. Evaluation of qPCR-based assays for leprosy diagnosis directly in clinical specimens. *PLoS Negl Trop Dis.*, v. 5, n. 10, p. 1354-1361, 2011.
- MARTINEZ, A. N. et al. PCR-based techniques for leprosy diagnosis: from the laboratory to the clinic. *PLoS Negl Trop Dis.*, v. 8, n. 4, p. 2655-2662, 2014.
- MARTINS, A. C. et al. Nasal mucosa study of leprosy contacts with positive serology for the phenolic glycolipid 1 antigen. *Braz J Otorhinolaryngol.*, v. 76, n. 5, p. 579-587, 2010.
- MARTINS, C. A. P. *Quantificação de DNA por PCR em tempo real em diferentes amostras forenses*. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Forenses) - Universidade do Porto, Portugal, 2016.
- MATSUOKA, M. et al. *Mycobacterium leprae* DNA in daily using water as a possible source of leprosy infection. *Indian J Lepr.*, v. 71, n. 1, p. 61-67, 1999.
- McGUINNESS, S. et al. Development and validation of a rapid real-time PCR based method for the specific detection of Salmonella on fresh meat. *Meat Sci.*, v. 83, n. 3, p. 555-562, 2009.
- MENZEL, S. et al. Antibodies to a synthetic analog of phenolic glycolipid-I of *Mycobacterium leprae* in healthy household contacts of patients with leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.*, v. 55, n. 4, p. 617-625, 1987.
- MONOT, M. et al. On the origin of leprosy. *Science*, v. 308, n. 5724, p. 1040-1042, 2005.
- MONOT, M. et al. Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. *Nat Genet.*, v. 41, n. 12, p. 1282-1289, 2009.
- MOSTAFA, H. M. et al. Acid-fast bacilli from former leprosy regions in coastal Norway showing PCR positivity for *Mycobacterium leprae*. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.*, v. 63, n. 1, p. 97-99, 1995.
- MOURA, R. S. et al. Leprosy serology using PGL-I: a systematic review. *Rev Soc Bras Med Trop.*, v. 41, p. 11-18, 2008.
- MOREIRA, O. C. et al. Towards the establishment of a consensus real-time qPCR to monitor *Trypanosoma cruzi* parasitemia in patients with chronic Chagas disease cardiomyopathy: a substudy from the BENEFIT trial. *Acta Trop.*, v. 125, n. 1, p. 23-31, 2013.

MOREIRA, O. C.; YADON, Z. E.; CUPOLILLO, E. The applicability of real-time PCR in the diagnostic of cutaneous leishmaniasis and parasite quantification for clinical management: Current status and perspectives. *Acta Trop.*, v. 184, p. 29-37, 2018.

NASCIMENTO, M. S. D.; RODRIGUES, Z. L. The Lacen and the importance of laboratory data smear microscopy for confirmation of diagnosis, classification of cases, monitoring and high patient with leprosy. *Revista Intersaberes*, v. 10, p. 285-312, 2010.

NERY, J. A. et al. Reactional states in multibacillary Hansen disease patients during multidrug therapy. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, v. 40, n. 6, p. 363-3, 1998.

NEUMANN, A. da S. et al. Experimental Infection of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Triatominae) with *Mycobacterium leprae* Indicates Potential for Leprosy Transmission. *PLoS One*, v. 11, n. 5, p. 156037-156050, 2016.

NG, V. et al. Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. *Cell*, v. 103, n. 3, p. 511-524, 2000.

NISHIMURA, M. et al. An improved method for DNA diagnosis of leprosy using formaldehyde-fixed, paraffin-embedded skin biopsies. *Mod Pathol.*, v. 7, n. 2, p. 253-256, 1994.

NOORDEEN, S. K. Eliminating leprosy as a public health problem; why the optimism is justified. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.*, v. 63, n. 4, p. 559-566, 1995.

NOVAIS, C. M.; ALVES, M. P. PCR em tempo real. *Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, v 33, p. 10-13, 2004.

OPROMOLLA, D. V. A. Terapêutica da hanseníase. *Medicina* (Ribeirao Preto. Online), v. 30, n. 3, p. 345-350, 1997.

OPROMOLLA, D. V. A.; URA, S. *Atlas de hanseníase*. Instituto Lauro de Souza Lima, 2002.

PATROCÍNIO, L. G. et al. Detection of *Mycobacterium leprae* in nasal mucosa biopsies by the polymerase chain reaction. *FEMS Immunol Med Microbiol.*, v. 44, n. 3, p. 311-316, 2005.

PEDRINI, S. C. et al. Search for *Mycobacterium leprae* in wild mammals. *Braz J Infect Dis.*, v. 14, n. 1, p. 47-53, 2010.

PELT-VERKUIJL E.; BELKUM, A.; HAYS, J. P. *Principles and Technical Aspects of PCR Amplification*. Berlim: Edições Springer Science, 2008.

PENNA, G. O. et al. Dermatological diseases of compulsory notification in Brazil. *An Bras Dermatol.*, v. 86, n. 5, p. 865-877, 2011.

PENNA, M. L. et al. Anti-PGL-1 Positivity as a Risk Marker for the Development of Leprosy among Contacts of Leprosy Cases: Systematic Review and Meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis.*, v. 10, n. 5, p. 4703-4713, 2016.

- PINTO, T. G. T. *Interação patógeno-hospedeiro na hanseníase: indução da via de interferon tipo I como potencial mecanismo de sobrevivência do *Mycobacterium leprae* em macrófagos humanos*. 2013. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2013.
- REIBEL, F.; CAMBAU, E.; AUBRY, A. Update on the epidemiology, diagnosis, and treatment of leprosy. *Med Mal Infect.*, v. 45, n. 9, p. 383-393, 2015.
- REIS, E. M. et al. *Mycobacterium leprae* DNA in peripheral blood may indicate a bacilli migration route and high-risk for leprosy onset. *Clin Microbiol Infect.*, v. 20, n. 5, p. 447-452, 2014.
- RESS, R. F. W. The microbiology of leprosy. In: HASTINGS R. C. (ed). *Leprosy*. New York: Churchill Livingstone Inc., p. 31-52, 1985.
- RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. A classification of leprosy for research purposes. *Lepr Rev.*, v. 33, p. 119-128, 1962.
- RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.*, v. 34, n. 3, p. 255-273, 1966.
- ROBBINS, G. et al. Ancient skeletal evidence for leprosy in India (2000 B.C.). *PLoS One*, v. 4, n. 5, p. 5669-5676, 2009.
- ROCHA, D. et al. The Brazilian experience of nucleic acid testing to detect human immunodeficiency virus, hepatitis C virus, and hepatitis B virus infections in blood donors. *Transfusion*, v. 58, n. 4, p. 862-870, 2018.
- SALES, A. M. et al. Leprosy among patient contacts: a multilevel study of risk factors. *PLoS Negl Trop Dis.*, v. 5, n. 3, p. 1013-1018, 2011.
- SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. A. *Dermatologia*. 2. ed. São Paulo: Artes Médicas, p. 467-470, 1998.
- SANTOS, A.R. et al. Use of PCR-mediated amplification of *Mycobacterium leprae* DNA in different types of clinical samples for the diagnosis of leprosy. *J Med Microbiol.*, v. 39, n. 4, p. 298-304, 1993.
- SANTOS, D. F. D. et al. Revisiting primary neural leprosy: Clinical, serological, molecular, and neurophysiological aspects. *PLoS Negl Trop Dis.*, v. 11, n. 11, p. 6086-6099, 2017.
- SAHA, K. et al. Viability of *Mycobacterium leprae* within the gut of *Aedes aegypti* after they feed on multibacillary lepromatous patients: a study by fluorescent and electron microscopes. *Lepr Rev.*, v. 56, n. 4, p. 279-290, 1985.
- SARNO, E. N. et al. Leprosy exposure, infection and disease: a 25-year surveillance study of leprosy patient contacts. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 107, n. 8, p. 1054-1059, 2012.
- SCHUENEMANN, V. J. et al. Genome-wide comparison of medieval and modern *Mycobacterium leprae*. *Science*, v. 341, n. 6142, p. 179-183, 2013.

- SCOLLARD, D. M.; GILLIS, T. P.; WILLIAMS, D. L. Polymerase chain reaction assay for the detection and identification of *Mycobacterium leprae* in patients in the United States. *Am J Clin Pathol.*, v. 109, n. 5, p. 642-646, 1998.
- SCOLLARD, D. M. et al. The Continuing Challenges of Leprosy. *Clin Microbiol Rev.*, v. 19, n. 2, p. 338-381, 2006.
- SHARMA, R. et al. Zoonotic Leprosy in the Southeastern United States. *Emerg Infect Dis.*, v. 21, n. 12, p. 2127-2134, 2015.
- SHARMA, R. et al. Simultaneous detection and serotyping of dengue infection using single tube multiplex CDC Dengue Real-Time RT-PCR from India. *Virusdisease*, v. 29, n. 1, p. 40-45, 2018.
- SHEPARD, C. C. The nasal excretion of *Mycobacterium leprae* in leprosy. *Int J Lepr.*, v. 30, p. 10-18, 1962.
- SHEPARD, C. C. Temperature optimum of *Mycobacterium leprae* in mice. *J Bacteriol.*, v. 90, n. 5, p. 1271-1275, 1965.
- SHEPARD, C. C.; HABAS, J. A. Relation of infection to tissue temperature in mice infected with *Mycobacterium marinum* and *Mycobacterium leprae*. *J Bacteriol.*, v. 93, n. 3, p. 790-796, 1967.
- SHEPARD, C. C.; McRAE, D. H. A method for counting acid-fast bacteria. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.*, v. 36, n. 1, p. 78-82, 1968.
- SIWAL, N. et al. Malaria diagnosis by PCR revealed differential distribution of mono and mixed species infections by *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* in India. *PLoS One*, v. 13, n. 3, p. 0193046-0193059, 2018.
- SKINSNES, O. K. Notes from the history of leprosy. I. Interpretive chronology of leprosy concept and practice. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.*, v. 41, n. 2, p. 220-233, 1973.
- de SOUZA-ARAÚJO, H. C. Leprosário Souza Araújo, o mais modesto do país, fundado em 1930.
- SPENCER, J. S.; BRENNAN, P. J. The role of *Mycobacterium leprae* phenolic glycolipid I (PGL-I) in serodiagnosis and in the pathogenesis of leprosy. *Lepr Rev.*, v. 82, n. 4, p. 344-357, 2011.
- SREEVATSA. Leprosy and arthropods. *Indian J Lepr.*, v. 65, n. 2, p. 189-200, 1993.
- STEINMANN, P. et al. Innovative tools and approaches to end the transmission of *Mycobacterium leprae*. *Lancet Infect Dis.*, v. 17, n. 9, p. 298-305, 2017.
- STINEAR, T. P.; BROSCHE, R. Leprosy in red squirrels. *Science*, v. 354, n. 6313, p. 702-703, 2016.

SUNG, K. J. et al. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA in formalin-fixed, paraffin-embedded samples from multibacillary and paucibacillary leprosy patients by polymerase chain reaction. *Int J Dermatol.*, v. 32, n. 10, p. 710-713, 1993.

TALHARI, S.; NEVES, R. G. Hanseníase: Dermatologia Tropical. 3. ed. Manaus: Gráfica Tropical, 1997.

TRAUTMAN, J. R. A brief history of Hansen's disease. *Bull N Y Acad Med.*, v. 60, n. 7, p. 689-695, 1984.

TRUMAN, R.; FINE, P. E. 'Environmental' sources of *Mycobacterium leprae*: issues and evidence. *Lepr Rev.*, v. 81, n. 2, p. 89-95, 2010.

TRUMAN, R. et al. Genotypic variation and stability of four variable-number tandem repeats and their suitability for discriminating strains of *Mycobacterium leprae*. *J Clin Microbiol.*, v. 42, n. 6, p. 2558-2565, 2004.

TRUMAN, R. W. Leprosy in wild armadillos. *Lepr Rev.*, v. 76, n. 3, p. 198-208, 2005.

TRUMAN, R. W. et al. Enumeration of *Mycobacterium leprae* using real-time PCR. *PLoS Negl Trop Dis.*, v. 2, n. 11, p. 328-334, 2008.

TRUMAN, R. W. et al. Probable zoonotic leprosy in the southern United States, New England. *N Engl J Med.*, v. 364, n. 17, p. 1626-1633, 2011.

TSANG, H. F. et al. Implementation and new insights in molecular diagnostics for HIV infection. *Expert Rev Mol Diagn.*, v. 18, n. 5, p. 433-441, 2018.

VAN BEERS, S. M.; de WIT, M. Y.; KLASTAR, P. R. The epidemiology of *Mycobacterium leprae*: recent insight. *FEMS Microbiol Lett.*, v. 136, n. 3, p. 221-230, 1996.

VAN BEERS, S. M.; HATTA, M.; KLASTAR, P. R. Seroprevalence rates of antibodies to phenolic glycolipid-I among schoolchildren as an indicator of leprosy endemicity. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.*, v. 67, n. 3, p. 243-249, 1999.

VISSA, V. D.; BRENNAN, P. J. The genome of *Mycobacterium leprae*: a minimal mycobacterial gene set. *Genome Biol.*, v. 2, n. 8, reviews, p. 1023.1-1023.8, 2001.

VOGELSANG, T. H. M. Gerhard Henrik Armauer Hansen 1841-1912. The discoverer of the leprosy bacillus. His life and his work. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.*, v. 46, n. 3-4, p. 257-332, 1978.

WALSH, G. P.; MEYERS, W. M.; BINFORD, C. H. Naturally acquired leprosy in the nine-banded armadillo: a decade of experience 1975-1985. *J Leukoc Biol.*, v. 40, n. 5, p. 645-656, 1986.

WALSH, G. P. et al. Leprosy as a zoonosis: an update. *Acta Leprol.*, v. 6, n. 1, p. 51-60, 1988.

WATERS, M. F. Chemotherapy of leprosy-current status and future prospects. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, v. 87, n. 5, p. 500-503, 1993.

WHEAT, W. H. et al. Long-term survival and virulence of *Mycobacterium leprae* in amoebal cysts. *PLoS Negl Trop Dis.*, v. 8, n. 12, p. 3405-3418, 2014.

WILLIAMS, D. L. et al. The use of a specific DNA probe and polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae*. *J Infect Dis.*, v. 162, n. 1, p. 193-200, 1990.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Expert Committee on leprosy: eighth report, n. 968, p. 1-61, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global leprosy update, 2015: time for action, accountability and inclusion. Department of Control of Neglected Tropical Diseases, n. 35, p. 405-420, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global leprosy update, 2016: accelerating reduction of disease burden. *Wkly Epid Rec.*, v. 92, n. 35, p. 501-520, 2017.

WOODS, S. A.; COLE, S. T. A rapid method for the detection of potentially viable *Mycobacterium leprae* in human biopsies: a novel application of PCR. *FEMS Microbiol Lett.*, v. 53, n. 3, p. 305-309, 1989.

APÊNDICE – Procedimento Operacional Padrão



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Laboratório de Hanseníase
Ambulatório Souza Araújo
Av. Brasil, 4365 – Manguinhos
21040-900 – Rio de Janeiro / RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1556

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	REVISÃO 00	PÁGINA 1/37	CÓDIGO POP – LAHAN – AOP 013
TÍTULO DIAGNÓSTICO MOLECULAR			
SUMÁRIO 1. OBJETIVO GERAL 1.1. Objetivos Específicos 2. CAMPO DE APLICAÇÃO 3. SIGLAS / DEFINIÇÕES 4. RESPONSABILIDADES 4.1. Profissionais do ASA 4.2. Profissionais do LAHAN 5. PROCEDIMENTO 5.1. Conferência e Recebimento das Amostras 5.2. Identificação da Amostra 5.3. Armazenamento 5.4. Livro de registro de amostras da sala 19 – LAHAN 5.5. Protocolo de Ensaio 6. ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS 6.1. Sangue 6.2. Raspado Intradérmico 6.3. Biópsia de Pele 6.4. Biópsia de Nervo 7. EXTRAÇÃO DE DNA 7.1. Sangue 7.2. Raspado Dérmico 7.3. Biópsia de Pele 7.4. Biópsia de Nervo 8. QUANTIFICAÇÃO DE DNA			
ELABORADO Suelen Justo Maria Moreira	VERIFICADO Dilzamar V. do Nascimento	APROVADO Milton Ozório Moraes	DATA 02/04/2018



Ministério da Saúde
 Fundação Oswaldo Cruz
 Instituto Oswaldo Cruz
 Laboratório de Hanseníase
 Ambulatório Souza Araújo
 Av. Brasil, 4365 – Manguinhos
 21040-900 – Rio de Janeiro / RJ – BRASIL
 Tel.: (21) 2562-1556

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	REVISÃO 00	PÁGINA 2/37	CÓDIGO POP – LAHAN – AOP 013
TÍTULO DIAGNÓSTICO MOLECULAR			
9. DIAGNÓSTICO MOLECULAR 9.1. PCR em Tempo Real 9.2. Análise dos Resultados 10. LIBERAÇÃO DO RESULTADO 11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 12. ANEXOS 12.1. Anexo 1: Modelo da placa de PCR na máquina 12.2. Anexo 2: Relatório de discrepância no recebimento			



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Laboratório de Hanseníase
Ambulatório Souza Araújo
Av. Brasil, 4365 – Manguinhos
21040-900 – Rio de Janeiro / RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1556

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	REVISÃO 00	PÁGINA 3/37	CÓDIGO POP – LAHAN – AOP 013
TÍTULO DIAGNÓSTICO MOLECULAR			
1. OBJETIVO GERAL Este procedimento operacional padrão (POP) tem como objetivo: Estabelecer e definir os procedimentos necessários utilizados na rotina do diagnóstico molecular realizada no Laboratório de Hanseníase (LAHAN) - Sala 19 – IOC/FIOCRUZ. 1.1. Objetivos Específicos - Estabelecer os procedimentos para o recebimento, o transporte, o armazenamento e a distribuição do material biológico (sangue, raspado dérmico, biópsias de pele e nervo) provenientes de pacientes hansenianos, suspeitos paucibacilares e de seus respectivos contatos atendidos no Ambulatório Souza Araújo / ASA; - Estabelecer os procedimentos necessários para a extração de material genômico (DNA/RNA) a partir de diferentes amostras biológicas; - Estabelecer a metodologia de amplificação de DNA/RNA por PCR em tempo real para detecção e /ou quantificação de <i>Mycobacterium leprae</i>; - Estabelecer os procedimentos necessários para a análise e liberação dos resultados obtidos, possibilitando assim um diagnóstico complementar para a hanseníase. 2. CAMPO DE APLICAÇÃO Este POP aplica-se às amostras biológicas oriundas do Ambulatório Souza Araújo (ASA) e armazenadas no Laboratório de Hanseníase/Patologia, ambos locais prestadores de serviço público de Referência Internacional em Hanseníase.			



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Laboratório de Hanseníase
Ambulatório Souza Araújo
Av. Brasil, 4365 – Mangueiras
21040-900 – Rio de Janeiro / RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1556

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	REVISÃO 00	PÁGINA 4/37	CÓDIGO POP – LAHAN – AOP 013																														
TÍTULO DIAGNÓSTICO MOLECULAR																																	
3. SIGLAS / DEFINIÇÕES Neste POP são adotadas as seguintes siglas e definições: <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="width: 30%;">FIOCRUZ</td><td>Fundação Oswaldo Cruz</td></tr> <tr><td>IOC</td><td>Instituto Oswaldo Cruz</td></tr> <tr><td>ASA</td><td>Ambulatório Souza Araújo</td></tr> <tr><td>LAHAN</td><td>Laboratório de Hanseníase</td></tr> <tr><td>POP</td><td>Procedimento Operacional Padrão</td></tr> <tr><td>PCR</td><td>Reação em cadeia da polimerase</td></tr> <tr><td>MIX</td><td>Mistura dos reagentes para PCR</td></tr> <tr><td>DNA</td><td>Acido desoxirribonucleico</td></tr> <tr><td>RNA</td><td>Acido ribonucleico</td></tr> <tr><td><i>M. leprae</i></td><td><i>Mycobacterium leprae</i></td></tr> <tr><td>PB</td><td>Pacientes paucibacilares</td></tr> <tr><td>PBS</td><td>Tampão Fosfato-Salino</td></tr> <tr><td>NRI</td><td>Número de registro do indivíduo</td></tr> <tr><td>NRA</td><td>Número de registro de amostra coletada</td></tr> <tr><td>GAL</td><td>Gerenciador de Ambiente Laboratorial</td></tr> </table>				FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz	IOC	Instituto Oswaldo Cruz	ASA	Ambulatório Souza Araújo	LAHAN	Laboratório de Hanseníase	POP	Procedimento Operacional Padrão	PCR	Reação em cadeia da polimerase	MIX	Mistura dos reagentes para PCR	DNA	Acido desoxirribonucleico	RNA	Acido ribonucleico	<i>M. leprae</i>	<i>Mycobacterium leprae</i>	PB	Pacientes paucibacilares	PBS	Tampão Fosfato-Salino	NRI	Número de registro do indivíduo	NRA	Número de registro de amostra coletada	GAL	Gerenciador de Ambiente Laboratorial
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz																																
IOC	Instituto Oswaldo Cruz																																
ASA	Ambulatório Souza Araújo																																
LAHAN	Laboratório de Hanseníase																																
POP	Procedimento Operacional Padrão																																
PCR	Reação em cadeia da polimerase																																
MIX	Mistura dos reagentes para PCR																																
DNA	Acido desoxirribonucleico																																
RNA	Acido ribonucleico																																
<i>M. leprae</i>	<i>Mycobacterium leprae</i>																																
PB	Pacientes paucibacilares																																
PBS	Tampão Fosfato-Salino																																
NRI	Número de registro do indivíduo																																
NRA	Número de registro de amostra coletada																																
GAL	Gerenciador de Ambiente Laboratorial																																
4. RESPONSABILIDADES 4.1. Profissionais do ASA a) Receber, conferir e identificar as amostras; b) Emitir o número de Registro do indivíduo no ato da entrada (NRI);																																	



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Laboratório de Hanseníase
Ambulatório Souza Araújo
Av. Brasil, 4365 – Manguinhos
21040-900 – Rio de Janeiro / RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1556

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	REVISÃO 00	PÁGINA 5/37	CÓDIGO POP – LAHAN – AOP 013
TÍTULO DIAGNÓSTICO MOLECULAR			
c) Emitir o número de Registro da amostra coletada (NRA); d) Realizar o cadastro da requisição do exame do paciente no sistema de gerenciador de Ambiente Laboratorial (GAL). 4.2. Profissionais do LAHAN a) Receber, conferir, assinar o livro de recebido, transportar as amostras do ASA até o LAHAN e acondicioná-las em freezers (-20°C) localizados no corredor em frente a sala 19 – LAHAN; b) Extrair o DNA e RNA a partir de diferentes amostras biológicas; c) Amplificar o DNA e/ou RNA por PCR em tempo real; d) Analisar os resultados obtidos; e) Liberar os resultados (positivo ou negativo para hanseníase) para os profissionais do ASA; f) Inserir os dados da confirmação (positivo/negativo) para hanseníase no sistema GAL, assim como o número de genomas encontrado. 5. PROCEDIMENTO 5.1. Conferência e Recebimento das Amostras 5.1.1. Atualmente, os profissionais Valcemir França, Suelen Moreira e Fernanda Manta (LAHAN / sala 19) são os responsáveis por receber as amostras de sangue e raspado intradérmico. Os profissionais Daniel Chaves, Adelaide Amorim e Vânia Valentim (LAHAN / sala 7) são os responsáveis pelo recebimento de amostras de biópsias de pele e de nervo. Quando houver necessidade, e sob a orientação do grupo do LAHAN,			



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Laboratório de Hanseníase
Ambulatório Souza Araújo
Av. Brasil, 4365 – Manguinhos
21040-900 – Rio de Janeiro / RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1556

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	REVISÃO 00	PÁGINA 6/37	CÓDIGO POP – LAHAN – AOP 013
TÍTULO DIAGNÓSTICO MOLECULAR			
algumas amostras de raspado dérmico e/ou biópsias de pele e/ou nervo serão solicitadas para o ensaio de PCR em tempo real de acordo com o projeto; 5.1.2. No ato de recebimento das amostras, serão observadas as fichas de requisição de exames e a identificação das mesmas; 5.1.3. A conferência do material biológico é realizada na sala de recebimento de amostras. As amostras não devem ser abertas neste local; 5.1.4. Qualquer discrepância identificada na conferência deve ser registrada no formulário de Registro de discrepância no recebimento (Anexo 2). 5.1.5. Caso a amostra chegue em uma embalagem especial (exemplo: caixa térmica), o responsável pelo recebimento das amostras deve identificar o invólucro com um número de registro diferenciado, sem danificá-lo, para o caso do cliente solicitar a devolução da embalagem. 5.2. Identificação da amostra 5.2.1. Cada embalagem e/ou caixa e/ou frasco e/ou amostra recebe a identificação do número de registro escrito a tinta (Caneta esferográfica, hidrocor, Piloto) ou quando apropriado através de uma etiqueta ou fita; 5.2.2. Esta identificação deve ser mantida, dentro do possível, durante todo o manuseio da amostra no LAHAN até o seu descarte. 5.3. Armazenamento 5.3.1. As amostras devem ser mantidas e armazenadas nas condições definidas. Tais condições estão descritas no respectivo manual de coleta do LAHAN (sendo estas diferenciadas de			



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Laboratório de Hanseníase
Ambulatório Souza Araújo
Av. Brasil, 4365 – Manguinhos
21040-900 – Rio de Janeiro / RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1556

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	REVISÃO 00	PÁGINA 7/37	CÓDIGO POP – LAHAN – AOP 013
---------------------------------	---------------	----------------	------------------------------------

TÍTULO
DIAGNÓSTICO MOLECULAR

acordo com o tipo de amostras e o tipo de análises que serão realizadas) e devem ser obedecidas logo após o material ter sido identificado com o número de entrada atribuído no ato da conferência da amostra.

5.4. Livro de registro de amostras da sala 19 – LAHAN

- 5.4.1. O livro de registro de amostras é o documento principal para a rastreabilidade do material e dos ensaios realizados;
- 5.4.2. No livro de registro de amostra são inseridos os dados da amostra desde o recebimento até os resultados dos ensaios/exames realizados;
- 5.4.3. Os dados referentes a entrada das amostras são preenchidos pelos profissionais do ASA. Após o recebimento das amostras pelos profissionais do LAHAN, os dados são atualizados pelos mesmos no livro de registro;
- 5.4.4. O caderno de entrada deve ser mantido arquivado por período indeterminado;
- 5.4.5. As informações existentes no livro de registro de amostra são as seguintes:



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Laboratório de Hanseníase
Ambulatório Souza Araújo
Av. Brasil, 4365 – Mangueiras
21040-900 – Rio de Janeiro / RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1556

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	REVISÃO 00	PÁGINA 8/37	CÓDIGO POP – LAHAN – AOP 013
---------------------------------	---------------	----------------	------------------------------------

TÍTULO
DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Preenchimento do Livro de registro de amostras			
Descrição Do campo	Como	Quem	Quando
Nº. registro da amostra (NRA)	Número do registro da amostra Número que inicia com o ano seguido por mais quatro dígitos sequenciais. Ex.: 20180001, 20184752	Responsável pela conferência	Data de recebimento da amostra
Data do registro	Data do registro da amostra ou do recebimento da amostra		
Identificação do paciente	Nome, sexo, idade		
Material	Tipo da amostra (ex: biópsia de pele, biópsia de nervo, raspado intradérmico)		
Data da coleta	Data da coleta da amostra		
Data entrega	Data da entrega do resultado		
PCR	Qual alvo analisado?		
Resultado	Positivo ou negativo?	Profissional do LAHAN	Após a realização do
Encaminh. para	Para quem o resultado foi encaminhado	Chefia do LAHAN	exame
Responsável	Responsável pelo encaminhamento do resultado (laudo)		

5.4.6. Mesmo que a decisão final seja de não realizar o ensaio/exame, por qualquer motivo, deve ser registrada a entrada da amostra no livro de registro de amostra.



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Laboratório de Hanseníase
Ambulatório Souza Araújo
Av. Brasil, 4365 – Manguinhos
21040-900 – Rio de Janeiro / RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1556

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	REVISÃO 00	PÁGINA 9/37	CÓDIGO POP – LAHAN – AOP 013
TÍTULO DIAGNÓSTICO MOLECULAR			
5.5. Protocolo de Ensaio 5.5.1. Os dados originais ou leituras das medições devem ser registrados em um formulário denominado “protocolo de ensaio” específico para cada ensaio; 5.5.2. Os protocolos devem ser rubricados e datados pelo profissional que realizou o ensaio/exame e caso haja qualquer cálculo ou transferência de dados do protocolo há a necessidade de um segundo profissional do laboratório conferir ou analisar criticamente; 5.5.3. Informações mínimas que devem conter os protocolos de ensaio: a) Número do registro; b) Dados originais; c) Procedimento do ensaio/metodologia; d) Data ou período de realização do ensaio/exame; e) Quem realizou o ensaio (rubrica e data); f) Quem conferiu ou analisou criticamente o protocolo (rubrica e data) g) Resultados dos ensaios. 5.5.4. Caso a chefia do Laboratório desejar anexar ou adicionar requisitos ou metodologias específicas definidas pelo cliente, pode ser utilizado para este fim, o campo de “observações” do protocolo ou um anexo que deverá ser grampeado no mesmo formulário.			



Ministério da Saúde
 Fundação Oswaldo Cruz
 Instituto Oswaldo Cruz
 Laboratório de Hanseníase
 Ambulatório Souza Araújo
 Av. Brasil, 4365 – Manguinhos
 21040-900 – Rio de Janeiro / RJ – BRASIL
 Tel.: (21) 2562-1556

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	REVISÃO 00	PÁGINA 10/37	CÓDIGO POP – LAHAN – AOP 013
TÍTULO DIAGNÓSTICO MOLECULAR			
6. ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS 6.1. Sangue As amostras de sangue serão armazenadas a - 20°C em freezer até o seu processamento. 6.2. Raspado Dérmico As amostras de raspado intradérmico serão armazenadas a - 20°C em freezer até o seu processamento. 6.3. Biópsias de Pele e Nervo As amostras de biópsia de pele conservadas em etanol 70% serão armazenadas a -20°C em freezer até o seu processamento. As demais biópsias de pele e as de nervo deverão ficar armazenadas em freezer - 80°C ou em nitrogênio líquido até seu processamento. 7. EXTRAÇÃO DE DNA/RNA 7.1. Materiais necessários para a execução do procedimento: • Centrífuga clínica; • Banho Seco ou Estufa; • Pipetas automáticas; • Ponteiras 10uL, 200uL e 1000uL; • Tubos Eppendorf 1,5/2mL; • Luvas; • PBS 1X estéril, pH 7,4;			



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Laboratório de Hanseníase
Ambulatório Souza Araújo
Av. Brasil, 4365 – Manguinhos
21040-900 – Rio de Janeiro / RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1556

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	REVISÃO 00	PÁGINA 11/37	CÓDIGO POP – LAHAN – AOP 013
TÍTULO DIAGNÓSTICO MOLECULAR			
• Etanol absoluto; • Isopropanol; • Clorofórmio; • Trizol; • Tampão Tris/EDTA; • Tubos para FastPrep® - Lysing Matrix B (MPBio); • Equipamento FastPrep® (MPBiomedicals); • <i>Kit DNeasy Blood and Tissue</i> QIAGEN. 7.2. Sangue: Observação: Previamente preparar e rotular tubos novos de 1,5 a 2 mL para o processamento das amostras. Este procedimento é válido em todas as etapas da extração. 1^a) Para Sangue com eritrócitos não nucleados: Pipetar 20 µl de proteinase K em um tubo de microcentrifuga de 1,5 ou 2 mL. Adicionar 50 – 100 µl de sangue anticoagulado. Ajustar o volume para 220 µl com PBS 1X. Continuar para o passo 2; 1^b) Para Sangue nucleado: Pipetar 20 µl de proteinase K em um tubo de microcentrifuga de 1,5 ou 2 mL. Adicionar 5 – 10 µl de sangue anticoagulado. Ajustar o volume para 220 µl com PBS 1X. Continuar para o passo 2; 2) Adicionar 200 µL do tampão AL para a lise de hemácias. Homogeneizar no vórtex por 15s e incubar a 56°C por 1 hora. Homogeneizar no vórtex uma vez a amostra durante a incubação; 3) Adicionar 200 µL de etanol (96-100%). Homogeneizar no vórtex por 15s;			



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Laboratório de Hanseníase
Ambulatório Souza Araújo
Av. Brasil, 4365 – Manguinhos
21040-900 – Rio de Janeiro / RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1556

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	REVISÃO 00	PÁGINA 12/37	CÓDIGO POP – LAHAN – AOP 013
TÍTULO DIAGNÓSTICO MOLECULAR			
4) Pipetar a mistura em uma mini coluna com seu respectivo tubo coletor de 2mL (fornecidos pelo <i>kit</i> DNeasy Blood and Tissue QIAGEN); 5) Centrifugar a ≥ 8000 rpm (6000 x g) por 1 minuto. Repetir a centrifugação por mais 1 minuto. Descartar o tubo coletor que recebeu o fluido; 6) Acoplar a coluna em um novo tubo coletor de 2 mL. Adicionar 500 μL de tampão AW1 para lavagem (desnaturação de proteínas). Centrifugar por 1 minuto a ≥ 8000 rpm (6000 x g). Descartar o tubo coletor com o fluido; Obs.: Os tampões AW1 e AW2 são fornecidos concentrados. Antes de utilizá-los pela primeira vez, adicionar o volume necessário de etanol (96-100%), conforme indicado no frasco. 7) Acoplar outro tubo coletor na coluna, adicionar 500 μL do tampão AW2 para lavagem (remoção de sais). Centrifugar por 3 minutos a 14000 rpm (20000 x g). Descartar o tubo coletor com o fluido; 8) Transferir a coluna para um novo tubo de 1,5 a 2 mL e adicionar 100 μL do tampão AE para eluição. Incubar de 5 a 10 minutos a temperatura ambiente e centrifugar por 1 minuto a ≥ 8000 rpm. Obs.: Recomenda-se repetir a etapa (8) utilizando outro tubo, para maior rendimento do DNA. Obs.: Os tampões AW1 e AW2 são fornecidos concentrados. Antes de utilizá-los pela primeira vez, adicione o volume necessário de etanol (96-100%), conforme indicado no frasco.			



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Laboratório de Hanseníase
Ambulatório Souza Araújo
Av. Brasil, 4365 – Manguinhos
21040-900 – Rio de Janeiro / RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1536

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	REVISÃO 00	PÁGINA 13/37	CÓDIGO POP – LAHAN – AOP 013
TÍTULO DIAGNÓSTICO MOLECULAR			
7.3. Raspado Dérmico: 1) Centrifugar a amostra a 2000 rpm por 10 minutos (0000 x g), descartar o sobrenadante e deixar secar a temperatura ambiente de 20 - 30 minutos. Se necessário, secar a 37°C de 10 - 15 minutos em banho seco/estufa; 2) Pipetar 20 µL de proteinase K para degradação das proteínas (inativa as nucleases que degradam o DNA) no próprio tubo da amostra. Ajustar o volume para 220 µL com PBS 1X, que é um tampão de lavagem celular que ajuda a manter o pH do meio constante; 3) Adicionar 200 µL do tampão AL para a lise de hemácias. Homogeneizar no vórtex por 15s e incubar a 56°C por 1 hora. Durante a incubação, a amostra deverá ser homogeneizada uma vez em vórtex; 4) Adicionar 200 µL de etanol (96-100%). Homogeneizar no vórtex por 15s. Dar um <i>spin</i>; 5) Transferir a mistura para uma mini coluna com seu respectivo tubo coletor de 2 mL (fornecidos pelo <i>kit</i> DNeasy Blood and Tissue QIAGEN). Centrifugar a ≥8000 rpm (6000 x g) por 1 minuto. Descartar o tubo coletor que recebeu o fluido; 6) Acoplar a coluna em um tubo novo coletor de 2 mL. Adicionar 500 µL de tampão AW1 para lavagem (desnaturação de proteínas). Centrifugar por 1 minuto a ≥8000 rpm. Descartar o tubo coletor com o fluido; 7) Acoplar outro tubo coletor na coluna, adicionar 500 µL do tampão AW2 para lavagem (remoção de sais). Centrifugar por 3 minutos a 14000 rpm (20000 x g). Descartar o tubo coletor com o fluido; Obs.: Remova a coluna cuidadosamente sem que ela entre em contato com o fluido.			



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Laboratório de Hanseníase
Ambulatório Souza Araújo
Av. Brasil, 4365 – Manguinhos
21040-900 – Rio de Janeiro / RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1556

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	REVISÃO 00	PÁGINA 14/37	CÓDIGO POP – LAHAN – AOP 013
TÍTULO DIAGNÓSTICO MOLECULAR			
8) Transferir a coluna para um tubo novo de 1,5 a 2 mL devidamente identificado. Adicionar 100 µL do tampão AE para eluição diretamente sobre a membrana. Incubar de 5 a 10 minutos a temperatura ambiente e centrifugar por 1 minuto a ≥ 8000 rpm. Obs.: Recomenda-se repetir esta etapa (8) utilizando outro tubo para maior rendimento do DNA. 7.4. Biópsia de Pele: 1) Pesar cada tecido e anotar no caderno de protocolo (opcional); 2) Cortar o tecido (com lâmina de bisturi) em pedaços bem pequenos e colocá-los em tubos de 1,5 a 2 mL. Adicionar 180 µL de tampão ATL para lise de tecido; 3) Pipetar 20 µL de proteinase K para degradação das proteínas (inativa as nucleases que degradam o DNA) no próprio tubo da amostra. Homogeneizar no vórtex por 15s e incubar a 56°C por 3 horas ou até que o tecido esteja completamente lisado. Homogeneizar a amostra no vórtex a cada uma hora durante o período de incubação; Obs.: O tempo de lise pode variar de acordo com o tipo de tecido. A lise completa pode ocorrer de 1 a 3 horas, já para os tecidos mais rígidos de 6 a 8 horas. 4) Homogeneizar no vórtex por 15s. Adicionar 200 µL do tampão AL para a lise de células. Homogeneizar no vórtex. Incubar a 56°C por 10 minutos. Depois, adicionar 200 µL de etanol (96-100%). Homogeneizar no vórtex. Dar um <i>spin</i>; Obs.: É essencial que a amostra, o tampão AL e o etanol sejam misturados imediatamente e homogeneizados no vórtex ou por pipetagem para produzir uma solução homogênea.			



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Laboratório de Hanseníase
Ambulatório Souza Araújo
Av. Brasil, 4365 – Manguinhos
21040-900 – Rio de Janeiro / RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1556

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	REVISÃO 00	PÁGINA 15/37	CÓDIGO POP – LAHAN – AOP 013
TÍTULO DIAGNÓSTICO MOLECULAR			
5) Pipetar a mistura da etapa anterior (4) para uma mini coluna DNeasy com um tubo coletor de 2 mL. Centrifugar a ≥ 8000 rpm (6000 x g) por 1 minuto. Descartar o tubo coletor que recebeu o fluido. Repetir a centrifugação; 6) Acoplar a coluna em um novo tubo coletor de 2 mL. Adicionar 500 μL de tampão AW1 para lavagem (desnaturação de proteínas). Centrifugar por 1 minuto a ≥ 8000 rpm. Descartar o tubo coletor com o fluido; 7) Acoplar outro tubo coletor na coluna, adicionar 500 μL do tampão AW2 para lavagem (remoção de sais). Centrifugar por 3 minutos a 14000 rpm (20000 x g). Descartar o tubo coletor com o fluido. Obs.: Remova a coluna cuidadosamente sem que ela entre em contato com o fluido. 8) Transferir a coluna para um novo tubo de 1,5 a 2 mL (devidamente identificado) e adicionar 100 μL do tampão AE para eluição diretamente sobre a membrana. Incubar de 5 a 10 minutos a temperatura ambiente e centrifugar por 1 minuto a ≥ 8000 rpm. Obs.: Recomenda-se repetir esta etapa (8) para maior rendimento do DNA. 7.5. Biópsia de Nervo: Protocolo de Extração de RNA com reagente TRIzol™ Obs.: É imprescindível, limpar a capela e todos os materiais que serão utilizados com etanol 70% e deixar a UV ligada por pelo menos 15 minutos antes de iniciar a extração. - Separação de Fases 1) Identificar os tubos de 1,5 mL que serão utilizados e adicionar 1 mL de Trizol (reagente que			



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Laboratório de Hanseníase
Ambulatório Souza Araújo
Av. Brasil, 4365 – Manguinhos
21040-900 – Rio de Janeiro / RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1556

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	REVISÃO 00	PÁGINA 16/37	CÓDIGO POP – LAHAN – AOP 013
---------------------------------	---------------	-----------------	------------------------------------

TÍTULO DIAGNÓSTICO MOLECULAR

rompe as células e mantém a integridade do RNA);

- 2) Rapidamente fragmentar a biópsia de nervo com lâmina de bisturi ou macerar e transferir o material para o tubo contendo Trizol. Deixar a temperatura ambiente por 3 minutos;
- 3) Transferir todo o material para tubos de FastPrep e homogeneizar a uma velocidade de 6,5 m/s por 45 seg. Posteriormente, colocar o tubo em gelo hídrico;
Obs: Promover o resfriamento da centrifuga (4°C).
- 4) Adicionar 200 µL de clorofórmio ou clorofórmio: álcool isoamílico 24:1 (separará a solução em fase aquosa e orgânica, sendo que o RNA permanece na fase aquosa). Agitar a mão até obter uma consistência leitosa (15-20 seg) e deixar por 5 min a temperatura ambiente;
- 5) Centrifugar a 12000 xg por 15 min a 4°C.
- 6) Adicionar 500 µL de Isopropanol (precipitará o RNA) em outro tubo de 1,5 mL e transferir o sobrenadante (fase aquosa superior ~400 µL contendo RNA) para este novo tubo. Agitar muito bem. Muito cuidado para não coletar o DNA (fase intermediária), nem proteínas e restos celulares (fase orgânica inferior).

Precipitação do RNA

- 7) Nessa etapa, as amostras podem ser armazenadas a -70° por no mínimo 30 min ou -20°C overnight. Para armazenamento maior que 1 dia, deixar a -70°C;
- 8) Ao retirar do freezer, adicionar 1mL de Glycoblue (corante azul que é utilizado como co-precipitante de ácido nucleico) em cada tubo de amostra e centrifugar a 12000xg por 20 minutos a 4°C;
- 9) Descartar o sobrenadante utilizando-se a bomba de vácuo e uma pipeta Pasteur com ponta fina (ou com uma ponteira de 10 µL), tomar cuidado para não sugar o *pellet*, ou vertendo o tubo;



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Laboratório de Hanseníase
Ambulatório Souza Araújo
Av. Brasil, 4365 – Manguinhos
21040-900 – Rio de Janeiro / RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1556

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	REVISÃO 00	PÁGINA 17/37	CÓDIGO POP – LAHAN – AOP 013
TÍTULO DIAGNÓSTICO MOLECULAR			
10) Adicionar 500 µL de etanol 75% (removerá os resíduos de sais) e misturar por inversão 1 - 2 vezes sem dissolver o <i>pellet</i>. Centrifugar a 10000 xg por 10 minutos a 4°C. 11) Desprezar o sobrenadante com a bomba de vácuo ou vertendo o tubo. Deixar secar por 5 - 10 minutos até que não tenha resquício residual de etanol no tubo; Ressuspensão do RNA 12) Ressuspender o RNA em H₂O RF ou tampão Na₂HPO₄ ou TE (5 mM Tris, 0,1 mM EDTA – pH 8 - 8,5 RF). Obs.: Pode-se, opcionalmente, incubar o RNA com um dos tampões a 60°C por 5 - 10min para facilitar a ressuspensão. Extração de DNA com Trizol (A partir da fase orgânica após a extração do RNA) Após a extração do RNA, o DNA na presente fase fenólica e interfase pode ser isolado. Primeira etapa: 1) No próprio tubo do FastPrep adicionar 100 µL de TE (200 mM Tris e 5 mM EDTA) e 150 µL de clorofórmio ou clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) a fase orgânica remanescente após a extração do RNA. 2) Centrifugar a 12000 rpm (14000 x g) por 10 min a temperatura ambiente; 3) Transferir a fase aquosa para um novo tubo (~150 µL). Adicionar 300 µL (ou 2x o volume)			



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Laboratório de Hanseníase
Ambulatório Souza Araújo
Av. Brasil, 4365 – Manguinhos
21040-900 – Rio de Janeiro / RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1556

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	REVISÃO 00	PÁGINA 18/37	CÓDIGO POP – LAHAN – AOP 013
TÍTULO DIAGNÓSTICO MOLECULAR			
de isopropanol. Misturar gentilmente; 4) Precipitar o DNA durante a noite a 4°C ou por pelo menos 4 horas a - 20°C; Segunda etapa: 5) Esperar descongelar o material e adicionar 1 µL de Glycoblue; 6) Centrifugar a 12000 rpm (14000 x g) por 30 min a temperatura ambiente; 7) Verter o material e adicionar 500 µL de etanol 75%. Centrifugar a 12000 rpm por 15 min a 4°C; 8) Desprezar o sobrenadante e deixar o <i>pellet</i> secar completamente a temperatura ambiente; 9) Ressuspender o DNA em 20 - 30 µL de TE (5 mM Tris e 0,1 mM EDTA). O volume de ressuspensão dependerá do tamanho do <i>pellet</i> resultante.			



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Laboratório de Hanseníase
Ambulatório Souza Araújo
Av. Brasil, 4365 – Manguinhos
21040-900 – Rio de Janeiro / RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1556

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	REVISÃO 00	PÁGINA 19/37	CÓDIGO POP – LAHAN – AOP 013
TÍTULO DIAGNÓSTICO MOLECULAR			
8. QUANTIFICAÇÃO DE DNA: Para realizar a quantificação de ácidos nucleicos, utiliza-se o equipamento NanoDrop®. Este deverá ser ligado juntamente com o computador a ele acoplado. O programa “ND-1000 V3.8.1” deverá ser aberto e a opção “Quantificação de ácidos nucleicos” selecionada. Antes da quantificação de DNA, 1 µL de água deverá ser utilizado para zerar o aparelho, após essa medição, o branco da quantificação é definido através da análise de 1µL da mesma solução em que está o DNA a ser quantificado. Definindo o branco, inicia-se a medição da quantidade de DNA das amostras, sempre utilizando o volume de 1 µL. O aparelho deverá ser limpo com lenço de papel entre as medições. 9. DIAGNÓSTICO MOLECULAR: 9.1. PCR em tempo real: 1) Fazer um mapa da placa de acordo com a localização das amostras (o exemplo do modelo de placa se encontra no final desse protocolo – anexo 1); 2) Em fluxo laminar ao abrigo de luz, preparar o mix. O volume de mix utilizado por reação é de 10,83µL, dos quais 8,33µL são compostos pelos reagentes da reação-mix (tampão TaqMan master mix, pronto para uso), 25 nM do primer senso, 25 nM do primer anti-senso e 10 nM da sonda para o alvo 16S rRNA; já no caso do alvo 18S2, são utilizados 10 nM do primer senso, 10 nM do primer anti-senso e 5 nM da sonda fluorogênica. Durante todo o procedimento o tubo contendo os diferentes reagentes deverá ser envolvido em papel alumínio, pois a sonda é fotossensível.			



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Laboratório de Hanseníase
Ambulatório Souza Araújo
Av. Brasil, 4365 – Manguinhos
21040-900 – Rio de Janeiro / RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1556

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	REVISÃO 00	PÁGINA 20/37	CÓDIGO POP – LAHAN – AOP 013
TÍTULO DIAGNÓSTICO MOLECULAR			
Obs.: Fazer os cálculos para além do número de amostras que serão avaliadas (pelo menos 6 amostras a mais), incluindo também os controles da amplificação. O cálculo extra de amostras servirá para evitar a falta de reagentes em caso de erros de pipetagem ou de pipetas com problemas de calibração. 3) A concentração final de DNA utilizada na reação é de 50ng. O volume de reação da PCR é de 25µL (DNA + H₂O + Mix), sendo 10,83µl do mix adquirido pronto para uso. Os 14,2µl restantes serão constituídos por amostra de DNA e água. Para saber as quantidades de água e de DNA necessários, divide-se 50ng (concentração desejada) por "X" (concentração de DNA obtida pelo equipamento Nanodrop). O valor obtido deverá ser diminuído de 14,2µl, sendo o resultado o volume de H₂O a ser aplicado. Exemplos: Amostra 1: 7ng/µL ($50\text{ng} \div 7 = 7,1\mu\text{L}$ de DNA + 7,1 µL de água) Amostra 2: 23ng/µL ($50\text{ng} \div 23 = 2,2\mu\text{L}$ de DNA + 12 µL de água) Amostra 3: 5ng/µL ($50\text{ng} \div 5 = 10\mu\text{L}$ de DNA + 4,2 µL de água) 4) O mix para a amplificação deverá ser distribuído em todos os poços da placa, onde posteriormente serão aplicadas as amostras, os controles positivos (C+ e C+ DNA humano) e negativos (H₂O e C-). A distribuição dos reagentes deverá ser feita com o auxílio de uma pipeta (podendo ser multicanal) ajustada para um volume de 10,8 µL. Deve-se evitar a formação de bolhas durante esta etapa. Obs.: Há a necessidade de duas capelas para montagem da PCR. A primeira capela a ser utilizada é a denominada de "limpa", nessa será preparado o mix (<i>Mastermix</i>, primers, sondas e água) que será distribuído na placa. A outra capela, chamada de "suja", é o local onde será aplicado o volume de DNA de cada amostra. Durante todo o processo deverá ser tomado o cuidado devido para não contaminar o experimento. Obs.: Após a aplicação do mix, os poços do controle negativo (H11 e H12) deverão ser vedados com <i>strip</i> (tampa óptica) antes de a placa ir para a capela suja, pois estes serão os			



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Laboratório de Hanseníase
Ambulatório Souza Araújo
Av. Brasil, 4365 – Manguinhos
21040-900 – Rio de Janeiro / RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1556

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	REVISÃO 00	PÁGINA 21/37	CÓDIGO POP – LAHAN – AOP 013
TÍTULO DIAGNÓSTICO MOLECULAR			
controles de contaminação dos reagentes (Mastermix, primers e sondas) que estão no mix da PCR. 5) Remover a tampa óptica da placa, adicionar o volume necessário de cada amostra de DNA e homogeneizar o material com o mix que já se encontra no poço. Cada amostra deverá ser avaliada em triplicata, homogeneizando cada poço individualmente. As ponteiros utilizadas para a aplicação de material deverão ser trocadas para cada amostra, inclusive para os experimentos conduzidos em triplicata; 6) Por último devem ser aplicados os controles positivos: i) DNA de <i>M. leprae</i> purificado (1 µL da amostra / ± 5ng de DNA); ii) amostra positiva de paciente hanseniano (1 µL da amostra / ± 5ng de DNA); 7) Após a etapa de aplicação de amostras contendo DNA, a tampa que veda os controles negativos deverá ser removida com muito cuidado para que, posteriormente, a placa seja selada com adesivo óptico e centrifugada por 30 segundos em velocidade máxima. Enquanto é realizada a programação do termociclador, a placa deverá ser mantida em gelo e coberta com papel alumínio. Após o ajuste, o material deverá ser submetido ao equipamento para execução do processo de amplificação.			



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Laboratório de Hanseníase
Ambulatório Souza Araújo
Av. Brasil, 4365 – Manguinhos
21040-900 – Rio de Janeiro / RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1556

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

22/37

CÓDIGO

POP – LAHAN –
AOP 013

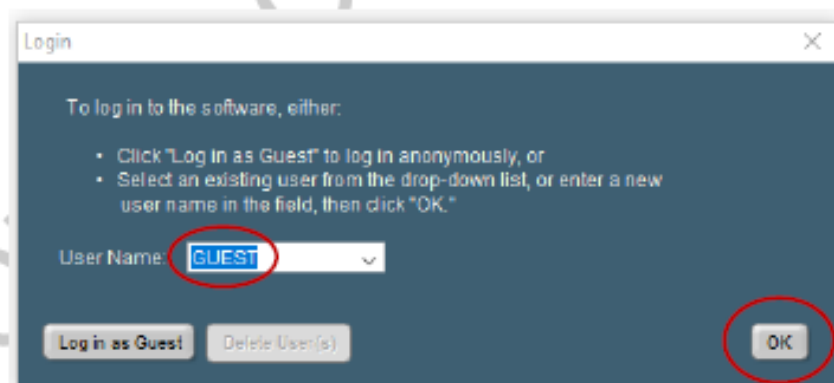
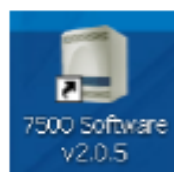
TÍTULO

DIAGNÓSTICO MOLECULAR

10. PROGRAMAÇÃO DO TERMOCICLADOR 7500 REAL-TIME PCR SYSTEM (Applied Biosystems®)

Ligar a máquina de PCR 7500 (clicando no botão que se encontra na parte de trás da máquina) e o computador acoplado ao equipamento.

Selecionar o ícone *7500 System Software* (abaixo), localizado na área de trabalho do computador. Fazer login como GUEST e clicar em “ok”.





Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Laboratório de Hanseníase
Ambulatório Souza Araújo
Av. Brasil, 4365 – Manguinhos
21040-900 – Rio de Janeiro / RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1556

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

23/37

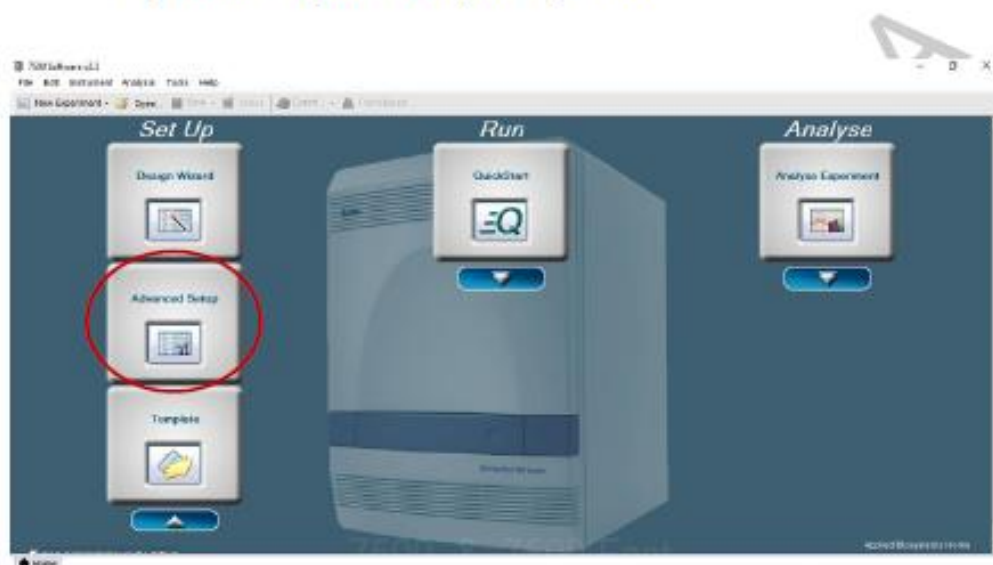
CÓDIGO

POP – LAHAN –
AOP 013

TÍTULO

DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Após a iniciar o *software*, clicar no ícone **Advanced Setup** (abaixo) e preencher os campos necessários para identificação do experimento.



Ao abrir a janela (abaixo), na aba **Setup**, subpasta **Experiment Properties**, no campo **Experiment Name**: nomear a placa com todas as informações necessárias para uma rápida busca e identificação da reação. Exemplo: PLACA 1_ ALVOS XXX_ TIPO DE AMOSTRA XXX_ DATA XXX, onde “XXX” deverá ser substituído pela informação acerca dos alvos utilizados (16S e 18S2), pelo tipo de amostra avaliada (raspado dérmico (RD), biópsia de pele (BP) ou biópsia de nervo (BN)) e pela data (10012018) de execução do experimento.



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Laboratório de Hanseníase
Ambulatório Souza Araújo
Av. Brasil, 4365 – Manguinhos
21040-900 – Rio de Janeiro / RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1556

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

24/37

CÓDIGO

POP – LAHAN –
AOP 013

TÍTULO DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Em seguida, devem ser selecionadas as abas 7500 (96 Wells), Quantitation – Comparative Ct ($\Delta\Delta Ct$), TaqMan® Reagents e Standard (~ 2 hours to complete a run) para o tipo de corrida que será realizada.

7500 Software v2.0.5

File Edit Instrument Analysis Tools Help

New Experiment... Open... Save... Close... Export... Print Report...

Experiment: Hanseniasse_ambulatorio_souza_araujo Type: Standard Curve Reagents: TaqMan® Reagents START RUN

Experiment Properties

Enter an experiment name, select the instrument type, select the type of experiment to set up, then select reagents and methods for the PCR reactions and instrument run.

How do you want to identify this experiment?

Experiment Name: Hanseniasse_ambulatorio_souza_araujo

Barcode (Optional):

User Name (Optional):

Comments (Optional):

Which instrument are you using to run this experiment?

7500 Fast (96 Wells) 7500 Fast (96 Wells)

Old 7500 software versions supported a 4 or 5 color, 96-well system.

What type of experiment do you want to set up?

Quantitation - Standard Curve Quantitation - Relative Standard Curve Quantitation - Comparative Ct ($\Delta\Delta Ct$)

1800 Curve Decoupling Permeabilization

Use standards to determine the absolute quantity of target nucleic acid sequence in samples.

Which reagents do you want to use to detect the target sequence?

TaqMan® Reagents SYBR Green Reagents Other

The PCR reactions contain primers designed to amplify the target sequence and a TaqMan® probe designed to detect amplification of the target sequence.

Which time interval do you want to use in the instrument run?

Standard (~ 2 hours to complete a run)

Fit up to 100 reactions with the standard curve method. Applied Biosystems recommends using standard reagents for your PCR reactions.



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Laboratório de Hanseníase
Ambulatório Souza Araújo
Av. Brasil, 4365 – Manguinhos
21040-900 – Rio de Janeiro / RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1556

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

25/37

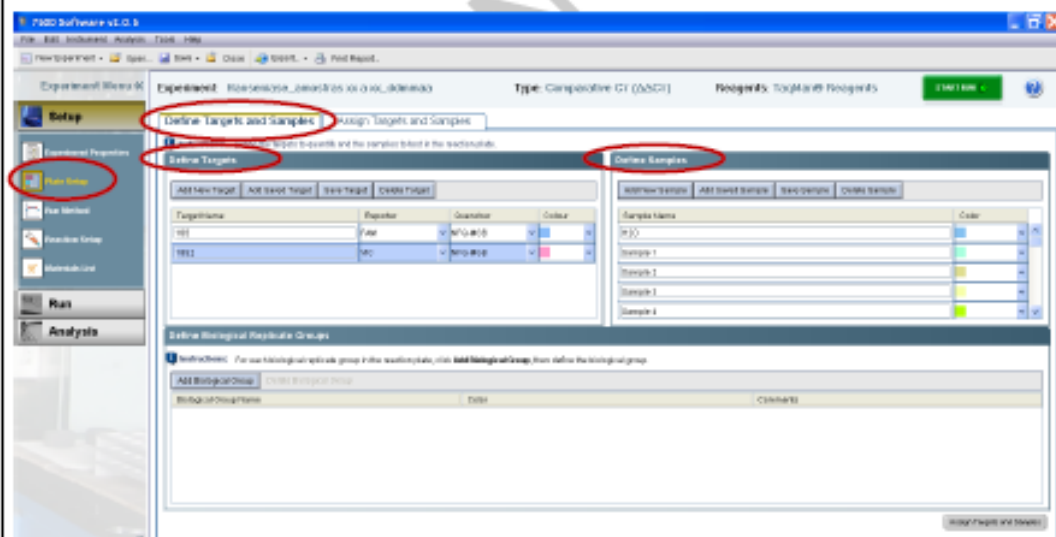
CÓDIGO

POP – LAHAN –
AOP 013

TÍTULO

DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Ainda na aba **SETUP**, clicar na próxima subpasta **Plate Setup**, na aba **Define Targets and Samples**, na opção **Define Targets**, adicionar os alvos na opção “Target Name”, lembrando de especificar o fluoróforo de cada um (16S FAM e 18S2 VIC, por exemplo). Na opção ao lado direito em **Define Samples**, clicar em “Add New Sample” de acordo com o número de amostras, sem esquecer dos controles. Adicionar as identificações das amostras na opção “Sample 1, 2, 3,...”. *Sample* são as amostras analisadas de 1 (H₂O) a 29, os poços H7 e H8 são os controles positivos (C+), H9 e H10 os controles de DNA humano (C+ DNA humano) e os poços H11 e H12 são os controles negativos (C-). Lembrando que, *sample 1* (H₂O) será sempre usada com água pura + mix de reagentes, esse funcionará como um controle para verificação de uma possível contaminação por pipetagem na montagem da placa.





Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Laboratório de Hanseníase
Ambulatório Souza Araújo
Av. Brasil, 4365 – Manguinhos
21040-900 – Rio de Janeiro / RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1556

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

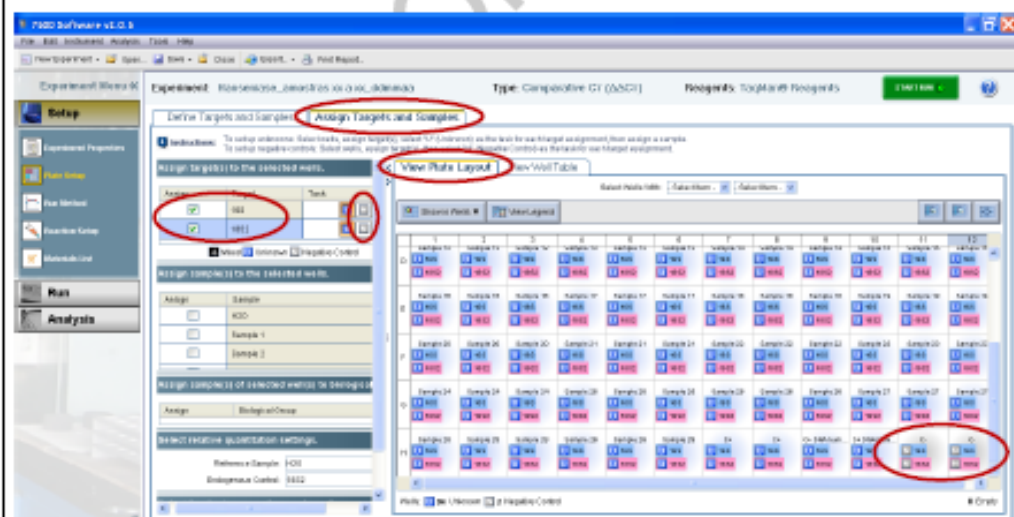
26/37

CÓDIGO

POP – LAHAN –
AOP 013

TÍTULO DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Ainda na aba **SETUP**, na subpasta **Plate Setup**, clicar na aba **Assign Targets and Samples** e na subpasta **View Plate Layout**, marcar os poços em triplicata (A1, A2, A3) e adicionar as identificações das amostras que se encontram em “Assign sample (s) to the selected wells”. Fazer o mesmo para toda a placa, de acordo com o modelo desenhado para o experimento (exemplo abaixo). Em seguida, selecionar toda a placa e em “Assign target (s) to the selected wells”, marcar os alvos/sondas utilizados (16S e 18S2, por exemplo) em “Assign”. Verificar se todos os poços estão assinalados como “Unknown” . Selecionar os controles negativos (poços H11 e H12) no modelo da placa e clicar na caixa de marcação com um  “Negative Control”, na opção “Task”, para os dois alvos (16S e 18S2).





Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Laboratório de Hanseníase
Ambulatório Souza Araújo
Av. Brasil, 4365 – Manguinhos
21040-900 – Rio de Janeiro / RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1556

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	REVISÃO 00	PÁGINA 27/37	CÓDIGO POP – LAHAN – AOP 013
TÍTULO DIAGNÓSTICO MOLECULAR			
Ainda na aba SETUP, na subpasta Run Method, na aba Graphical View adicionar o volume final da reação (25 µL) no campo “Reaction Volume Per Well”. Verificar se os dados dos ciclos de amplificação estão de acordo com as informações que seguem: 50°C por 2 minutos e 95°C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto utilizando o sistema PCR em tempo real (Applied Biosystems®). Além disso, verificar se o ícone de coleta de dados () está habilitado na temperatura de 60°C por 1 minuto, pois é neste passo que será feita a captura da fluorescência da(s) sonda(s) utilizada(s) no teste. Lembrando que todos os outros ícones de coleta de dados devem estar desabilitados () para as demais temperaturas que fazem parte do ciclo de amplificação.			



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Laboratório de Hanseníase
Ambulatório Souza Araújo
Av. Brasil, 4365 – Manguinhos
21040-900 – Rio de Janeiro / RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1556

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	REVISÃO 00	PÁGINA 29/37	CÓDIGO POP – LAHAN – AOP 013
---------------------------------	---------------	-----------------	------------------------------------

TÍTULO
DIAGNÓSTICO MOLECULAR

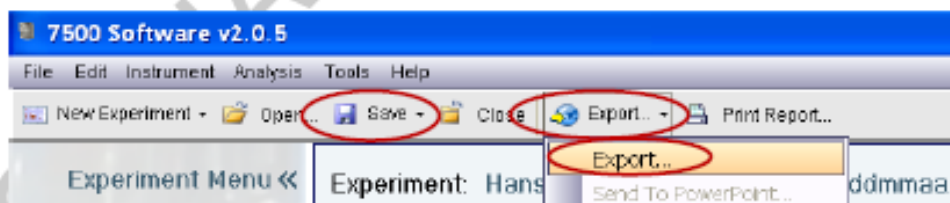
A placa deverá ser inserida na posição correta na máquina, através do encaixe da parte superior esquerda na posição A1. Posteriormente, a gaveta contendo a placa para a análise deverá ser fechada corretamente.

Clicar no ícone **Start Run** para iniciar o processo



Ao final do experimento, clicar em **Save**, abrir a gaveta para a remoção da placa do equipamento e posterior descarte, que deverá ser realizado de acordo com as normas de Biossegurança.

Para exportar os dados, clicar no ícone **Export** e selecionar **Export**.





Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Laboratório de Hanseníase
Ambulatório Souza Araújo
Av. Brasil, 4365 – Manguinhos
21040-900 – Rio de Janeiro / RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1556

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	REVISÃO 00	PÁGINA 30/37	CÓDIGO POP – LAHAN – AOP 013
---------------------------------	---------------	-----------------	------------------------------------

TÍTULO
DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Ao abrir a janela abaixo, deverá ser selecionada somente a opção **Results** e posteriormente deve-se clicar em **Browse**, para definir o lugar para o qual os dados serão exportados (a melhor opção é a sua pasta). Após selecionar sua pasta, clicar em **Open**.

Export Data

Select the type of data to export, select whether to export one file or separate files, then enter export file properties. (Optional) Click "Customise Export" to change the export format and to select fields to export. Click "Start Export" to export your data.

Export Properties | Customise Export

☐ Sample Setup ☒ **Results** ☐ Multi-component Data

1. Select data to export:
☐ Raw Data
☐ Amplification Data

2. Select one file or separate files: One File Select to export all data in one file or in separate files for each data type.

3. Enter export file properties:

Export File Name: Hanseniasis_ambosouza_araujo_ddmmsa_data File Type: CSV

Export File Location: C:\Applied Biosystems\7500\Experiments

☐ Open file(s) when export is complete

☐ Save current settings as the default



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Laboratório de Hanseníase
Ambulatório Souza Araújo
Av. Brasil, 4365 – Manguinhos
21040-900 – Rio de Janeiro / RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1556

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	REVISÃO 00	PÁGINA 31/37	CÓDIGO POP – LAHAN – AOP 013
TÍTULO DIAGNÓSTICO MOLECULAR			

Em seguida, clicar em *Start Export*. Ao final, clicar em “Close Export Tool” e fechar o arquivo.

Start Export

Caso não seja previsto outro experimento, desligar o computador e a máquina clicando no símbolo de ligar e desligar , que se encontra na tela da mesma. Em seguida, aparecerá uma caixa de texto para confirmar a ação de desligar (**Power Off**), clicar em “Yes” na tela da máquina para executar a tarefa. Quando a tela apagar, desligar a máquina apertando o botão que se encontra na parte de trás da mesma.

Para visualizar o resultado do experimento, clicar na pasta “Shortcut to Experiments” ou na pasta de salvamento dos arquivos na área de trabalho, abrir sua pasta e clicar no experimento. Para copiar o arquivo bruto ou exportado, será necessário um CD/DVD para gravação.



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Laboratório de Hanseníase
Ambulatório Souza Araújo
Av. Brasil, 4365 – Manguinhos
21040-900 – Rio de Janeiro / RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1556

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	REVISÃO 00	PÁGINA 32/37	CÓDIGO POP – LAHAN – AOP 013
TÍTULO DIAGNÓSTICO MOLECULAR			
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005 – Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração – 30 de outubro de 2005. NIT-DICLA-028 - critérios para o credenciamento de laboratório de ensaio segundo os princípios das boas práticas de laboratórios – BPL. Inmetro dez/2000. NIT-DICLA-083 – Critérios gerais para competência de Laboratórios Clínicos – rev. 00 – Inmetro abril/2001. Absolute Quantitation Using Standard Curve Getting Started Guide – Applied Biosystems 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System. Getting Started Guide – Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System Presence/Absence Experiments. Maintenance Guide – Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR Systems System Maintenance. 12. ANEXOS ANEXO 1 – Modelos da placa de PCR na máquina ANEXO 2 – Relatório de discrepância no recebimento			



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Laboratório de Hanseníase
Ambulatório Souza Araújo
Av. Brasil, 4365 – Manguinhos
21040-900 – Rio de Janeiro / RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1556

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO
00

PÁGINA
33/37

CÓDIGO
POP – LAHAN –
AOP 013

TÍTULO
DIAGNÓSTICO MOLECULAR

ANEXO 1 – Modelos da placa de PCR na máquina

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	H2O	H2O	H2O	Sample 1	Sample 1	Sample 1	Sample 2	Sample 2	Sample 2	Sample 3	Sample 3	Sample 3
B	Sample 4	Sample 4	Sample 4	Sample 5	Sample 5	Sample 5	Sample 6	Sample 6	Sample 6	Sample 7	Sample 7	Sample 7
C	Sample 8	Sample 8	Sample 8	Sample 9	Sample 9	Sample 9	Sample 10	Sample 10	Sample 10	Sample 11	Sample 11	Sample 11
D	Sample 12	Sample 12	Sample 12	Sample 13	Sample 13	Sample 13	Sample 14	Sample 14	Sample 14	Sample 15	Sample 15	Sample 15
E	Sample 16	Sample 16	Sample 16	Sample 17	Sample 17	Sample 17	Sample 18	Sample 18	Sample 18	Sample 19	Sample 19	Sample 19
F	Sample 20	Sample 20	Sample 20	Sample 21	Sample 21	Sample 21	Sample 22	Sample 22	Sample 22	Sample 23	Sample 23	Sample 23
G	Sample 24	Sample 24	Sample 24	Sample 25	Sample 25	Sample 25	Sample 26	Sample 26	Sample 26	Sample 27	Sample 27	Sample 27
H	Sample 28	Sample 28	Sample 28	Sample 29	Sample 29	Sample 29	CH	CH	CH + M65 base...	CH + M65 base...	E	E



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Laboratório de Hanseníase
Ambulatório Souza Araújo
Av. Brasil, 4365 – Manguinhos
21040-900 – Rio de Janeiro / RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1556

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

34/37

CÓDIGO

POP – LAHAN –
AOP 013

TÍTULO

DIAGNÓSTICO MOLECULAR

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	HO2 U 1852 U 1852	HO2 U 1852 U 1852	HO2 U 1852 U 1852	Sample 1 U 1852 U 1852	Sample 1 U 1852 U 1852	Sample 1 U 1852 U 1852	Sample 2 U 1852 U 1852	Sample 2 U 1852 U 1852	Sample 2 U 1852 U 1852	Sample 3 U 1852 U 1852	Sample 3 U 1852 U 1852	Sample 3 U 1852 U 1852
B	Sample 4 U 1852 U 1852	Sample 4 U 1852 U 1852	Sample 4 U 1852 U 1852	Sample 5 U 1852 U 1852	Sample 5 U 1852 U 1852	Sample 5 U 1852 U 1852	Sample 6 U 1852 U 1852	Sample 6 U 1852 U 1852	Sample 6 U 1852 U 1852	Sample 7 U 1852 U 1852	Sample 7 U 1852 U 1852	Sample 7 U 1852 U 1852
C	Sample 8 U 1852 U 1852	Sample 8 U 1852 U 1852	Sample 8 U 1852 U 1852	Sample 9 U 1852 U 1852	Sample 9 U 1852 U 1852	Sample 9 U 1852 U 1852	Sample 10 U 1852 U 1852	Sample 10 U 1852 U 1852	Sample 10 U 1852 U 1852	Sample 11 U 1852 U 1852	Sample 11 U 1852 U 1852	Sample 11 U 1852 U 1852
D	Sample 12 U 1852 U 1852	Sample 12 U 1852 U 1852	Sample 12 U 1852 U 1852	Sample 13 U 1852 U 1852	Sample 13 U 1852 U 1852	Sample 13 U 1852 U 1852	Sample 14 U 1852 U 1852	Sample 14 U 1852 U 1852	Sample 14 U 1852 U 1852	Sample 15 U 1852 U 1852	Sample 15 U 1852 U 1852	Sample 15 U 1852 U 1852
E	Sample 16 U 1852 U 1852	Sample 16 U 1852 U 1852	Sample 16 U 1852 U 1852	Sample 17 U 1852 U 1852	Sample 17 U 1852 U 1852	Sample 17 U 1852 U 1852	Sample 18 U 1852 U 1852	Sample 18 U 1852 U 1852	Sample 18 U 1852 U 1852	Sample 19 U 1852 U 1852	Sample 19 U 1852 U 1852	Sample 19 U 1852 U 1852
F	Sample 20 U 1852 U 1852	Sample 20 U 1852 U 1852	Sample 20 U 1852 U 1852	Sample 21 U 1852 U 1852	Sample 21 U 1852 U 1852	Sample 21 U 1852 U 1852	Sample 22 U 1852 U 1852	Sample 22 U 1852 U 1852	Sample 22 U 1852 U 1852	Sample 23 U 1852 U 1852	Sample 23 U 1852 U 1852	Sample 23 U 1852 U 1852
G	Sample 24 U 1852 U 1852	Sample 24 U 1852 U 1852	Sample 24 U 1852 U 1852	Sample 25 U 1852 U 1852	Sample 25 U 1852 U 1852	Sample 25 U 1852 U 1852	Sample 26 U 1852 U 1852	Sample 26 U 1852 U 1852	Sample 26 U 1852 U 1852	Sample 27 U 1852 U 1852	Sample 27 U 1852 U 1852	Sample 27 U 1852 U 1852
H	Sample 28 U 1852 U 1852	Sample 28 U 1852 U 1852	Sample 28 U 1852 U 1852	Sample 29 U 1852 U 1852	Sample 29 U 1852 U 1852	Sample 29 U 1852 U 1852	C+	C+	C+ DNA pos...	C+ DNA pos...	C-	C-

Wells: 1 94 Unknown 2 Negative Control

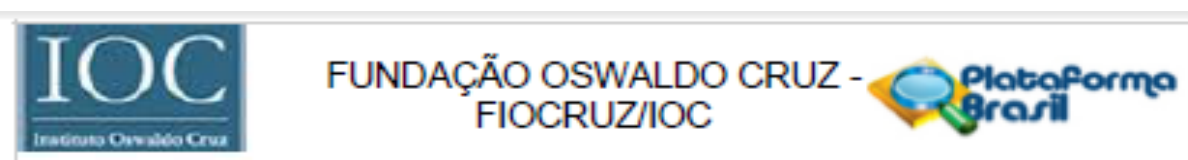
0 Empty



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Laboratório de Hanseníase
Ambulatório Souza Araújo
Av. Brasil, 4365 – Mangueiras
21040-900 – Rio de Janeiro / RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1556

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	REVISÃO 00	PÁGINA 36/37	CÓDIGO POP – LAHAN – AOP 013
TÍTULO DIAGNÓSTICO MOLECULAR			
ANEXO 2 – Relatório de discrepância no recebimento			
1-Identificação do Cliente		2-NR:	
3-Material:	4-Data coleta	5-Data receb. amostra	
6-Nome	7-Sexo:	8-Idade	
9-Discrepância / Ocorrência			
10-Análise e parecer da Chefia do laboratório			
☐ Devolver sem realizar os Ensaio ☐ Devolver as amostras ☐ Descartar as amostras ☐ Continuar os Ensaio ☐ Comunicar ao Cliente ☐ Solicitar mais amostras ☐ Aguardar parecer do cliente ☐ Interromper o Início do Ensaio ☐ Retornar com o "de acordo" do cliente, por fax.			
11-Conferência realizada por (rubrica e data)		12-Chefia do laboratório (rubrica e data)	

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: O papel da reação em cadeia da polimerase (PCR) na identificação da infecção subclínica em contatos de pacientes com hanseníase e no diagnóstico das formas paucibacilares

Pesquisador: Euzenir Nunes Sarno

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 38053314.2.0000.5248

Instituição Proponente: Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ/IOC

Patrocinador Principal: Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ/IOC

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 976.330

Data da Relatoria: 10/03/2015

Apresentação do Projeto:

Segundo a pesquisadora principal, para alcançar a meta de diminuição da taxa de detecção de casos novos, tão representativa do controle da doença, é crucial garantir que os pacientes com hanseníase na fase inicial sejam diagnosticados e recebam tratamento com PQT e que todos os contatos com infecção subclínica sejam identificados e tratados profilaticamente. Até o momento, não existe um método eficaz que permita a identificação dos contatos com maior risco de adoecer e o diagnóstico de casos de hanseníase recente, ainda representa um desafio mesmo em centros de referência. Sendo assim, no presente projeto foi proposta como meta estabelecer o papel da técnica de PCR na identificação de contatos com infecção subclínica e no diagnóstico da hanseníase paucibacilar. Para tanto será realizado um estudo observacional prospectivo que será conduzido no Ambulatório Souza Araújo (ASA) – Laboratório de Hanseníase – IOC-Fiocruz. Nele serão incluídos todos os contatos intra e extradomiciliares de pacientes com hanseníase que compareceram ao exame de família, e todos os casos de hanseníase paucibacilar diagnosticados com base no resultado da PCR, entre setembro de 2011 e setembro de 2016. Serão usados como critério de inclusão: 1- Indivíduos com mais de 12 anos, 2- Contatos de pacientes de hanseníase que se submeteram ao raspado dérmico para a realização da PCR e 3- Casos suspeitos de hanseníase paucibacilar diagnosticados pela PCR. Como Critérios de exclusão: os contatos com

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
 Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360
 UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
 Telefone: (21)3882-9011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -
FIOCRUZ/IOC



Continuação do Parecer: 976.330

HIV/AIDS e outras patologias que cursem com imunossupressão, Infecção por tuberculose e gestantes. Segundo a pesquisadora principal, na rotina do ASA, na primeira visita ao ambulatório, todos os contatos são submetidos a exames dermatológico, neurológico e/ou avaliação fisioterápica além de coleta de sangue para sorologia PGL-1 e raspado dérmico para PCR. Um grupo de contatos, população de estudo de um ensaio clínico em andamento, receberá quimioprofilaxia. Dois grupos serão estudados: contatos atendidos no ambulatório de 2011 a 2014 e os contatos que serão atendidos em 2015, participantes do estudo para avaliação da efetividade da quimioprofilaxia que será desenvolvido no ASA. Após a conclusão diagnóstica serão classificados em: caso incidente ou contato sadio. Os pacientes atendidos, entre setembro de 2011 e setembro de 2016, com suspeita de hanseníase paucibacilar, cujo exame histopatológico era inconclusivo, e que foram diagnosticados pela PCR, serão convocados para exame dermatológico e fisioterápico após 12 meses do início do tratamento (da PQT). Estes pacientes serão classificados de acordo com a evolução em: regressão ou não das lesões cutâneas. Pretende-se por meio de análise multivariada, regressão de Cox, definir se o resultado do PCR está associado ao risco de adoecimento na hanseníase, assim como quantificar a sua ocorrência nos contatos. Os desfechos avaliados serão o adoecimento do contato e a evolução clínica dos casos inconclusivos.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo geral:

- Estabelecer o papel da PCR no diagnóstico da Infecção subclínica nos contatos e na hanseníase paucibacilar.

Objetivos específicos:

1. Demonstrar o papel da PCR na identificação dos contatos de pacientes com hanseníase com maior risco de adoecimento.
2. Avaliar a evolução clínica dos casos suspeitos de hanseníase paucibacilar, submetidos e não submetidos à poliquimioterapia, diagnosticados com base no resultado da PCR.
3. Avaliar o risco de adoecimento nos contatos de pacientes de hanseníase multibacilares submetidos e não submetidos à quimioprofilaxia segundo o resultado da PCR.

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
 Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360
 UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
 Telefone: (21)3882-9011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepfocruz@ioc.fiocruz.br



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -
FIOCRUZ/IOC



Continuação do Parecer: 976.330

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

- Este estudo não oferece riscos adicionais uma vez que realiza somente os exames necessários para o diagnóstico e acompanhamento de contatos preconizados pelo Ministério da saúde.
- Risco de infecção secundária nos locais de coleta de sangue, raspado dérmico e biópsia pode ocorrer e será prontamente tratada.

Benefícios:

. Os contatos de pacientes de hanseníase serão reavaliados em dois anos e se apresentarem qualquer sinal ou sintoma da doença serão tratados precocemente evitando doença avançada e incapacidades. Os pacientes paucibacilares que foram diagnosticados baseados no resultado do PCR serão reavaliados por um dermatologista após 12 meses para confirmação da regressão das lesões.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é de alta relevância, o laboratório tem uma equipe com grande experiência neste tipo de abordagem.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados os seguintes documentos:

1. Folha de Rosto devidamente preenchida e assinada pelo pesquisador e pela diretoria do IOC.
2. Projeto Detalhado
3. Cronograma atualizado
2. TCLE - Modelo de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Atendendo a Resolução CNS 466/12.
3. Autorização de acesso ao arquivo de prontuários.

Recomendações:

- Desenvolver o projeto conforme delineado;
- Justificar fundamentadamente, perante ao CEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
 Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360
 UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
 Telefone: (21)3882-9011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepflocruz@ioc.fiocruz.br



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -
FIOCRUZ/IOC



Continuação do Parecer: 076.330

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O TCLE tem linguagem acessível e as pendências emitidas na 201ª Reunião foram atendidas. Sendo assim, o projeto, na forma como foi apresentado, está em conformidade com a Res. CNS 466/2012.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 466/2012, manifesta-se por APROVAR Ad Referendum o projeto de pesquisa CAAE: 38053314.2.0000.5248 . Comunicando que:

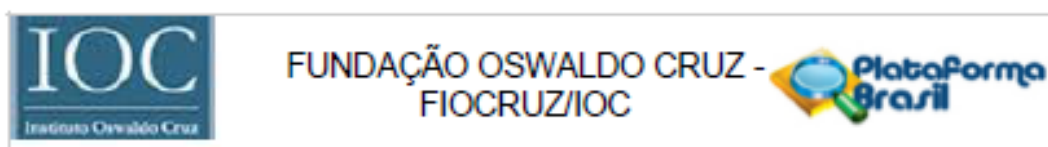
Apresentar relatórios parciais (anuais) e relatório final do projeto de pesquisa é responsabilidade indelegável do pesquisador principal.

Qualquer modificação ou emenda ao projeto de pesquisa em pauta deve ser submetida à apreciação do CEP Fiocruz/IOC.

O participante de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

O pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido- TCLE apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 975.330

RIO DE JANEIRO, 07 de Março de 2015

Assinado por:
Maria Regina Reis Amendoela
(Coordenador)

ANEXO B – Termo de consentimento livre e esclarecido dos contatos**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DOS CONTATOS DE PACIENTES COM HANSENÍASE**

Título do projeto: O papel da Reação em Cadeia da Polimerase na identificação de infecção subclínica em contatos de pacientes com hanseníase e no diagnóstico das formas paucibacilares

Identificação do voluntário adulto

Nome: _____

Documento de identidade nº: _____

Sexo: _____ Data de nascimento: ____/____/____

Endereço: _____ Telefones de contato: _____

Instituição onde será realizada a pesquisa: Laboratório de Hanseníase, Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Fiocruz. Ambulatório Souza Araujo - Fiocruz Endereço: Av Brasil, nº 4365 – Manguinhos – CEP: 21040-360 – RJ - Brasil Telefone/Fax: 21 2562-1588

Pesquisador responsável: _____

Data do preenchimento: ____/____/____

Assinatura do pesquisador responsável

Informações ao voluntário adulto

Estamos convidando você para participar como voluntário de um projeto de pesquisa desenvolvido por pesquisadores desta instituição. A hanseníase é uma doença que tem cura, através das medicações que matam o agente causador da doença. Após o início do tratamento não ocorre transmissão, porém, as pessoas que tiveram contato frequente com os doentes podem apresentar sintomas nos dois anos seguintes. A pesquisa tem como objetivo avaliar o risco das pessoas que convivem com pacientes de hanseníase adoecerem. Nesta pesquisa queremos estudar um exame que identifique os contatos que têm mais chance de desenvolver a doença para que eles possam tomar um medicamento e não adoecer.

Descrição do estudo

Serão convidados para participar desta pesquisa homens e mulheres adultos, contatos de pacientes de hanseníase, atendidos no Ambulatório Souza Araújo da Fundação Oswaldo Cruz, que é um Centro de Referência para pesquisas em hanseníase. Você não fará nenhum procedimento diferente daqueles já preconizados para os contatos de pacientes com hanseníase pelo Ministério da Saúde do Brasil. Os exames serão realizados na primeira consulta e você será chamado para uma segunda consulta, após 2 anos, para ser examinado pelo médico e pelo fisioterapeuta para avaliação de sinais da hanseníase. Os seus dados serão descritos no seu prontuário médico e depois serão passados para o computador para serem utilizados na pesquisa.

Riscos possíveis

Desconforto para a coleta de sangue e raspado dérmico poderá ocorrer e consistem em dor momentânea. Em alguns casos, poderá ocorrer um pequeno inchaço e vermelhidão nesses locais. Há risco de infecção nos locais da coleta, portanto toda coleta será realizada com material descartável e precedida de rigorosa antissepsia local. Se houver infecção esta será tratada.

Armazenamento de amostras biológicas para uso em pesquisas futuras

As amostras de raspado dérmico e soro serão guardadas no laboratório do centro de referência para que possam ser utilizados em novas pesquisas que precisem de amostras de contatos de pacientes com hanseníase.

Esclarecimentos sobre as garantias dos pacientes que quiserem participar do estudo

- 1- Você pode pedir esclarecimento aos profissionais de saúde, em qualquer momento, se tiver alguma dúvida em relação à participação na pesquisa, ou sobre riscos, benefícios e resultados.
- 2- Sua participação nesta pesquisa é totalmente voluntária. Se você não quiser mais participar da pesquisa você pode retirar seu consentimento a qualquer momento. Isto não vai trazer nenhum prejuízo ao atendimento rotineiro, a que tem direito na unidade de saúde aonde vem sendo tratado. Os responsáveis pelo estudo poderão interromper a participação dos pacientes voluntários neste estudo se eles acharem que esta seja a melhor conduta para você.
- 3- Todas as informações da pesquisa serão sigilosas. Ninguém divulgará o nome dos participantes e os resultados dos exames identificados com o nome dos participantes. Se for solicitado por lei, somente o grupo de estudo, o Ministério da Saúde (Brasil) e os Comitês de Ética terão acesso às informações confidenciais que identificam o paciente pelo nome. Você não será identificado em qualquer relatório ou publicação que resulte deste estudo.
- 4- A participação nesta pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, você não receberá nenhuma gratificação pela participação no estudo. Porém, durante o acompanhamento, você terá direito ao ressarcimento das despesas com transporte para as visitas às unidades de saúde relacionadas com a pesquisa.

- 5- As amostras de sangue e outras que serão guardadas no nosso laboratório só serão utilizadas para novos estudos após a aprovação dos respectivos comitês de ética em pesquisa e o sigilo sobre as informações particulares de cada pessoa que participou da pesquisa será mantido. As informações de contato de cada um dos pacientes serão mantidas, caso haja necessidade de informá-lo sobre novos resultados de exames realizados após a finalização do estudo que possam ser de benefício no cuidado da sua saúde.

Perguntas e contatos

Nós estaremos disponíveis para responder suas perguntas relacionadas à hanseníase e sobre esta pesquisa. Todas as dúvidas e perguntas podem ser feitas diretamente à pesquisador responsável no Ambulatório Souza Araújo ou pelo e-mail: rbarbi@gmail.com (Raquel R. Barbieri).

O Comitê de Ética em Pesquisa - CEP é um centro que existe em todas as instituições que realizam pesquisas envolvendo seres humanos no Brasil. Ele foi criado para defender os interesses das pessoas que participam dos estudos, garantido a segurança dos participantes e também contribuindo para que os estudos sejam realizados com qualidade. Endereço do Comitê de ética em Pesquisa do IOC-FIOCRUZ- RJ: Avenida Brasil, 4.036 - Sala: 705 (Prédio da Expansão) Manguinhos, RJ - CEP: 21.040-360 - Tels: (21) 3882-9011 Fax: (21) 2561-4815. Horário de funcionamento: 8:00h às 17:00h E-mail: etica@fiocruz.br

Para ser um voluntário nesta pesquisa você deverá assinar este termo de consentimento. O termo será assinado em duas vias e todas as páginas deverão ser rubricadas no momento da assinatura. Você receberá uma via desse termo de igual teor. Essa via deverá ficar guardada com você pois, nela contém as informações da pesquisa e o contato dos pesquisadores.

EU, _____, LI AS INFORMAÇÕES CONTIDAS ACIMA E COMPREENDI CLARAMENTE A MINHA PARTICIPAÇÃO NO REFERIDO ESTUDO E CONSINTO VOLUNTARIAMENTE PARTICIPAR DO MESMO.

Local: _____
 _____ Data _____

Assinatura do voluntário

_____ Data _____

Assinatura do pesquisador

_____ Data _____

Assinatura da testemunha

ANEXO C – Termo de consentimento livre e esclarecido dos pacientes

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DOS PACIENTES COM HANSENÍASE PAUCIBACILAR

Título do projeto: O papel da reação em Cadeia da Polimerase na identificação de infecção subclínica em contatos de pacientes com hanseníase e no diagnóstico das formas paucibacilares

Identificação do voluntário adulto

Nome: _____

Documento de identidade nº: _____

Sexo: _____ | _____ Data de nascimento: ____/____/____

Endereço: _____ Telefones de contato: _____

Instituição onde será realizada a pesquisa: Laboratório de Hanseníase, Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Fiocruz. Ambulatório Souza Araujo - Fiocruz Endereço: Av Brasil, nº 4365 – Manguinhos – CEP: 21040-360 – RJ - Brasil Telefone/Fax: 21 2562-1588

Pesquisador responsável: _____

Data do preenchimento: ____/____/____

Assinatura do pesquisador responsável

Informações ao voluntário adulto

Estamos convidando você para participar como voluntário de um projeto de pesquisa desenvolvido por pesquisadores desta instituição. Quando a hanseníase é muito recente, pode se parecer com outras doenças de pele. Nesta pesquisa queremos estudar um exame que identifique a doença logo no início, para que a pessoa possa fazer o tratamento antes de ter sequelas. A hanseníase tem cura através das medicações que matam o agente causador.

Descrição do estudo

Serão convidados para participar desta pesquisa homens e mulheres adultos, que tenham lesões suspeitas de hanseníase, atendidos no Ambulatório Souza Araújo da Fundação Oswaldo Cruz, que é um Centro de Referência para pesquisas em hanseníase. Você não fará nenhum procedimento diferente daqueles já preconizados para o diagnóstico da hanseníase pelo Ministério da Saúde do Brasil. Os exames serão realizados na primeira consulta e o tratamento será iniciado, se for necessário. Você será chamado para uma segunda consulta, após 1 ano, para ser examinado pelo médico e pelo fisioterapeuta para avaliarem se houve

melhora da lesão. Os seus dados serão descritos no seu prontuário médico e depois serão passados para o computador para serem utilizados na pesquisa.

Riscos possíveis

Desconforto para a coleta de sangue, raspado dérmico e biópsia de pele poderá ocorrer e consistem em dor momentânea. Em alguns casos, poderá ocorrer um pequeno inchaço e vermelhidão nesses locais. Há risco de infecção nos locais da coleta, portanto toda coleta será realizada com material descartável e precedida de rigorosa antisepsia local. Se houver infecção esta será tratada.

Armazenamento de amostras biológicas para uso em pesquisas futuras

As amostras de raspado dérmico, soro e biópsia serão guardadas no laboratório do centro de referência para que possam ser utilizados em novas pesquisas que precisem de amostras de pacientes com hanseníase.

Esclarecimentos sobre as garantias dos pacientes que quiserem participar do estudo

- 1- Você pode pedir esclarecimento aos profissionais de saúde, em qualquer momento, se tiver alguma dúvida em relação à participação na pesquisa, ou sobre riscos, benefícios e resultados.
- 2- Sua participação nesta pesquisa é totalmente voluntária. Se você não quiser mais participar da pesquisa você pode retirar seu consentimento a qualquer momento. Isto não vai trazer nenhum prejuízo ao atendimento rotineiro, a que tem direito na unidade de saúde aonde vem sendo tratado. Os responsáveis pelo estudo poderão interromper a participação dos pacientes voluntários neste estudo se eles acharem que esta seja a melhor conduta para você.
- 3- Todas as informações da pesquisa serão sigilosas. Ninguém divulgará o nome dos participantes e os resultados dos exames identificados com o nome dos participantes. Se for solicitado por lei, somente o grupo de estudo, o Ministério da Saúde (Brasil) e os Comitês de Ética terão acesso às informações confidenciais que identificam o paciente pelo nome. Você não será identificado em qualquer relatório ou publicação que resulte deste estudo.
- 4- A participação nesta pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, você não receberá nenhuma gratificação pela participação no estudo. Porém, durante o acompanhamento, você terá direito ao ressarcimento das despesas com transporte para as visitas às unidades de saúde relacionadas com a pesquisa.
- 5- As amostras de sangue e outras que serão guardadas no nosso laboratório só serão utilizadas para novos estudos após a aprovação dos respectivos comitês de ética em pesquisa e o sigilo sobre as informações particulares de cada pessoa que participou da pesquisa será mantido. As informações de contato de cada um dos pacientes serão mantidas, caso haja necessidade de informá-lo sobre novos resultados de exames realizados após a finalização do estudo que possam ser de benefício no cuidado da sua saúde.

Perguntas e contatos

Nós estaremos disponíveis para responder suas perguntas relacionadas à hanseníase e sobre esta pesquisa. Todas as dúvidas e perguntas podem ser feitas diretamente à pesquisadora responsável no Ambulatório Souza Araújo ou pelo e-mail: rbarbi@gmail.com (Raquel R. Barbieri).

O Comitê de Ética em Pesquisa - CEP é um centro que existe em todas as instituições que realizam pesquisas envolvendo seres humanos no Brasil. Ele foi criado para defender os interesses das pessoas que participam dos estudos, garantindo a segurança dos participantes e também contribuindo para que os estudos sejam realizados com qualidade. Endereço do Comitê de ética em Pesquisa do IOC-FIOCRUZ- RJ: Avenida Brasil, 4.036 - Sala: 705 (Prédio da Expansão) Manguinhos, RJ - CEP: 21.040-360 - Tels: (21) 3882-9011 Fax: (21) 2561-4815. Horário de funcionamento: 8:00h às 17:00h E-mail: etica@fiocruz.br

Para ser um voluntário nesta pesquisa você deverá assinar este termo de consentimento. O termo será assinado em duas vias e todas as páginas deverão ser rubricadas no momento da assinatura. Você receberá uma via desse termo de igual teor. Essa via deverá ficar guardada com você pois, nela contém as informações da pesquisa e o contato dos pesquisadores

EU, _____, LI AS
INFORMAÇÕES CONTIDAS ACIMA E COMPREENDI CLARAMENTE A MINHA
PARTICIPAÇÃO NO REFERIDO ESTUDO E CONSINTO VOLUNTARIAMENTE PARTICIPAR
DO MESMO.

Local: _____
_____ Data _____

Assinatura do voluntário

_____ Data _____

Assinatura do pesquisador

_____ Data _____

Assinatura da testemunha