



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

VITÓRIA CARLA CARVALHO

VALIDAÇÃO DE MÉTODO MOLECULAR PARA IDENTIFICAÇÃO DE
***Mycobacterium leprae* EM AMOSTRAS DE SANGUE**

FORTALEZA

2023

VITÓRIA CARLA CARVALHO

VALIDAÇÃO DE MÉTODO MOLECULAR PARA IDENTIFICAÇÃO DE *Mycobacterium leprae* EM AMOSTRAS DE SANGUE

Trabalho de conclusão apresentado ao curso de Graduação em Farmácia, da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Paula Sacha Frota Nogueira.

Coorientadora: Profa. Dra. Aparecida Tiemi Nagao Dias.

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C329v Carvalho, Vitória Carla.
Validação de método molecular para identificação de *Mycobacterium leprae* em amostras de sangue /
Vitória Carla Carvalho. – 2023.
44 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia,
Odontologia e Enfermagem, Curso de Farmácia, Fortaleza, 2023.

Orientação: Profa. Dra. Paula Sacha Frota Nogueira.

Coorientação: Profa. Dra. Aparecida Tiemi Nagao Dias.

1. Hanseníase. 2. *Mycobacterium leprae*. 3. Diagnóstico. 4. PCR em Tempo Real. I. Título.

CDD 615

VITÓRIA CARLA CARVALHO

VALIDAÇÃO DE MÉTODO MOLECULAR PARA IDENTIFICAÇÃO DE *Mycobacterium leprae* EM AMOSTRAS DE SANGUE

Trabalho de conclusão apresentado ao curso de Graduação em Farmácia, da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Aprovado em 07/07/23

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Paula Sacha Frota Nogueira (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Raphael de Oliveira Rodrigues
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Caroline Mary Gurgel Dias Florencio
Universidade Federal do Ceará (UFC)

À minha mãe, Eliane, que não mediu os esforços para me ajudar. A conclusão desse trabalho e da minha graduação não seriam possíveis sem ela.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por sempre ter me dado exatamente aquilo que eu precisava e por ter sido minha companhia em uma caminhada por vezes solitária.

Aos meu pais, Carlos e Eliane, por serem meus maiores incentivadores, respeitarem meus sonhos e acreditarem em mim em todas as circunstâncias.

Ao meu irmão, Vitor, por ser minha motivação para buscar ser a melhor versão de mim todos os dias.

Aos meus padrinhos, Cícero e Neila, que me acolheram e me deram um novo lar quando precisei sair de perto da minha família para correr atrás dos meus objetivos.

À minha família como um todo pelo carinho e pela torcida.

À minha orientadora, professora Dra. Sacha, pela paciência, orientação e por ter me recebido de braços abertos. À professora Dra. Aparecida, minha coorientadora, que contribuiu para a minha paixão pela Imunologia e que me presenteou com esse trabalho tão significativo.

À farmacêutica doutoranda Andressa, que compartilhou comigo seus conhecimentos sobre sua pesquisa e contribuiu tanto na construção da minha monografia, enriquecendo-a com sugestões que foram recebidas com muita gratidão.

À banca examinadora, professora Dra. Caroline e farmacêutico Dr. Raphael, pela disponibilidade e contribuição.

Aos meus amigos, os de longa data, que sempre torceram por mim e acreditaram no meu potencial quando eu não fui capaz, e os novos, que tornaram essa etapa final mais leve. Aos amigos que conquistei ao longo dos anos de faculdade, Berlânia Santos, Diego Joca, Gabriela Rodrigues, Natasha Pinheiro e Victor Gabriel, que partilharam comigo as angústias e alegrias da vida acadêmica, em especial aos dois últimos citados, que têm sido meus parceiros desde o início.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pelo financiamento deste projeto.

Por fim, à Universidade Federal do Ceará pela possibilidade de me graduar em uma universidade pública de qualidade, e aos professores pelos ensinamentos repassados.

“O maior inimigo do conhecimento não é a
ignorância, é a ilusão do conhecimento.”
(Stephen Hawking).

RESUMO

Hanseníase é uma doença infecciosa crônica de evolução lenta e diagnóstico difícil e, portanto, muitas vezes tardio, tendo o agente etiológico, o bacilo *Mycobacterium leprae*, já causado algum grau de incapacidade física. O tratamento da doença depende da forma clínica da doença, se multibacilar ou paucibacilar. Devido sua alta endemicidade no Brasil, sendo o segundo país no mundo em casos novos de hanseníase, busca-se diferentes formas diagnóstica mais eficazes e rápidas que o diagnóstico clínico. O trabalho justifica-se na identificação de um teste molecular de menor custo, com uma amostra de fácil acesso e que permita um diagnóstico precoce, pautando-se na análise de amostras de sangue de contatos menores de 15 anos e sem necessariamente apresentarem lesões suspeitas. Para a validação do método de diagnóstico em Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR) SYBR Green, utilizou-se alvos de regiões específicas do *M. leprae*, o RLEP e 16SrRNA, para a realização de teste de especificidade e sensibilidade analíticas. A fim de avaliar a frequência de positividade do método, foram utilizadas amostras de sangue coletadas de casos índices e de contatos de três municípios endêmicos. Nos testes, encontrou-se alta sensibilidade e especificidade para o método, especialmente para o alvo RLEP que apresentou menor taxa de detecção e especificidade de 100%, apresentando resultados melhores que o método de qPCR já validado para diagnóstico de hanseníase em amostras de biópsia de lesão de pele, o NAT Hanseníase. Quanto à frequência de positividade, houve baixo índice entre os pacientes, portanto já era esperado devido à doença já estar bem estabelecida e em curso de tratamento, enquanto para os contatos foram encontrados resultados significativos para o risco de desenvolver a doença entre contatos PB e MB, no entanto, era necessário o acompanhamento desses pacientes para averiguar a evolução do quadro, o que não foi possível por consequência da pandemia por COVID 19. Percebe-se, assim, a necessidade da realização de mais estudos longitudinais e de continuidade utilizando o método SYBR Green entre contato para a avaliação da sensibilidade diagnóstica do teste.

Palavras-chave: Hanseníase; *Mycobacterium leprae*; Diagnóstico; PCR em Tempo Real.

ABSTRACT

Leprosy is a chronic infectious disease with slow evolution and a difficult diagnosis and, therefore, often late, with the etiological agent, the bacillus *Mycobacterium leprae*, already causing some degree of physical disability. The treatment of the disease depends on the clinical form of the disease, whether multibacillary or paucibacillary. Due to its high endemicity in Brazil, the second country in the world in new cases of leprosy, different forms of diagnosis that are more effective and faster than the clinical diagnosis are sought. This study is justified in the identification of a molecular test of lower cost, with a sample of easy access that allows an early diagnosis, based on the analysis of blood samples of contacts younger than 15 years and without necessarily presenting suspicious lesions. To validate the SYBR Green Real-Time Polymerase Chain Reaction (qPCR) diagnostic method, targets from specific regions of *M. leprae*, RLEP and 16SrRNA, were used to perform analytical specificity and sensitivity tests. To evaluate the frequency of positivity of the method, blood samples collected from index cases and contacts from three endemic municipalities were used. In the tests, high sensitivity and specificity were found for the method, especially for the RLEP target, which presented a lower detection rate and specificity of 100%, presenting better results than qPCR method already validated for the diagnosis of leprosy in samples of skin lesion biopsy, the NAT Hanseníase. As for the frequency of positivity, there was a low rate among patients, therefore it was expected due to the disease being well established and undergoing treatment, while for contacts, significant results were found for the risk of developing the disease between PB and MB contacts, however, it was necessary to monitor these patients to verify the evolution of the condition, which was not possible due to the COVID 19 pandemic. It is clear that more longitudinal and continuity studies are needed, using the SYBR Green method between contacts to assess the test's diagnostic sensitivity.

Keywords: Leprosy; *Mycobacterium leprae*; Diagnosis; Real-Time PCR.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ΔR_n	Variação de fluorescência
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
BB	<i>Borderline-borderline</i>
BT	<i>Borderline</i> tuberculóide
BV	<i>Borderline</i> virchowiana
CDC	Centro de Controle Diagnóstico de Doenças Infecciosas
Cq	Ciclo de quantificação
Ct	<i>Cycle threshold</i>
DTNs	Doenças tropicais negligenciadas
GIF	Grau de Incapacidade Física
Fg	Fentogramas
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
LAM	Lipoarabinomanana
MB	Multibacilar
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	<i>Odds ratio</i>
PB	Paucibacilar
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PGL-1	Antígeno glicolípido fenólico – 1
PQT	Poliquimioterapia
qPCR	Reação em cadeia polimerase em tempo real
RFU	Unidades de fluorescência relativa
RLEP	Elemento genético repetitivo
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
Th1	Linfócito T auxiliar tipo 1
Th2	Linfócito T auxiliar tipo 2
TNF	Fator de necrose tumoral
TT	Tuberculóide
VV	Virchowiano

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	05
2	JUSTIFICATIVA	07
3	OBJETIVOS	08
3.1	Objetivo geral	08
3.2	Objetivos específicos	08
4	REFERENCIAL TEÓRICO	09
4.1	Epidemiologia	09
4.2	<i>Mycobacterium leprae</i>	10
4.3	Caracterização da Hanseníase	11
4.4	Imunopatogenia da hanseníase	12
4.5	Diagnóstico clínico-laboratorial da hanseníase	13
5	MATERIAIS E MÉTODOS	15
5.1	Captação de contatos e pacientes de hanseníase	15
5.1.1	<i>Delineamento e municípios selecionados</i>	15
5.1.2	<i>População</i>	15
5.1.3	<i>Avaliação dermatoneurológica</i>	16
5.1.4	<i>Coleta de amostras de sangue</i>	16
5.1.5	<i>Extração de DNA das amostras de sangue</i>	15
5.2	Estabelecimento de teste molecular utilizando SYBR Green	16
5.2.1	<i>Alvos e primers</i>	16
5.2.2	<i>Validação de primers</i>	17
5.2.3	<i>Ciclos de amplificação</i>	18
5.2.4	<i>Análise da especificidade analítica dos primers</i>	18
5.2.5	<i>Análise da sensibilidade analítica dos primers</i>	19
5.2.6	<i>Eficiência das reações</i>	19
5.3	Detecção molecular de <i>M. leprae</i> nas amostras de DNAs isolados de sangue utilizando qPCR- SYBR Green	20
5.4	Aspectos éticos	20
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
6.1	Estabelecimento de teste molecular utilizando SYBR Green	21
6.2	Perfil clínico demográfico dos contatos e casos índices	30

6.3	Detecção molecular de <i>M. leprae</i> utilizando método qPCR-SYBR	
	Green em amostras de contatos e casos índices	31
6.3.1	<i>Resultados de qPCR em amostras de casos índices</i>	31
6.3.2	<i>Resultados de qPCR em amostras de contatos</i>	32
7	CONCLUSÃO	34
	REFERÊNCIAS	35
	ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA	38
	ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)	41
	ANEXO C – TERMO DE ASSENTIMENTO	43
	ANEXO D – PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA DO KIT EXTRAÇÃO MINI SPIN PLUS (BIOPUR, BRASIL)	45

1 INTRODUÇÃO

A Hanseníase é uma doença infecciosa, de evolução crônica, caracterizada por um diagnóstico difícil, uma vez que é essencialmente clínico, e por evidenciar o desafio quanto ao despreparo dos profissionais para identificar os sinais e sintomas da doença (BRASIL, 2022a). É causada pelo *Mycobacterium leprae*, um bacilo com tropismo pela pele e nervos, característica essa que pode levar a doença a cursar com um prognóstico pior, dado o risco de ocasionar perda funcional e incapacidades físicas (BRITTON; LOCKWOOD, 2004). Além disso, fatores como diagnóstico tardio, elevada carga bacilar e reações hansênicas são fatores de risco para o aparecimento de incapacidades físicas (BRASIL, 2022a).

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde, o Brasil ocupa o segundo lugar no mundo em casos de hanseníase, depois da Índia (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2021a). Trata-se de uma das vinte Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs), segundo a OMS, as quais, geralmente estão associadas a condições socioeconômicas precárias, principalmente em países pobres e subdesenvolvidos. O estigma e a discriminação associados a essa doença têm contribuído para a dificuldade em realizar um diagnóstico precoce e para que muitos indivíduos fiquem desassistidos e sem o tratamento adequado (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2021b).

Parâmetros como a avaliação do Grau de Incapacidade Física (GIF) no momento do diagnóstico e a taxa de casos em menores de 15 anos de idade são importantes para estimar a eficiência do diagnóstico, se precoce ou tardio, e se a transmissão está ativa em uma população. Em 2020, o Brasil registrou um alto número de casos novos com GIF 2, ou seja, pacientes apresentando perda funcional e alterações morfológicas nos olhos, mãos e/ou pés, estando acima da média mundial (acima de 1.000 casos novos) (BRASIL, 2010; BRASIL, 2022b).

O tratamento da hanseníase tem por objetivo a cura e a prevenção de incapacidades físicas. A equipe de saúde deve estar preparada para classificar corretamente a forma clínica da doença e indicar o esquema terapêutico adequado, uma vez que o tempo para poliquimioterapia (PQT-U) muda com a classificação operacional da doença, sendo 6 doses mensais para a forma Paucibacilar (PB) e 12 doses mensais para a Multibacilar (MB). A PQT consiste na associação dos antimicrobianos dapsona, rifampicina e clofazimina, os quais estão disponíveis de forma gratuita pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Esse esquema terapêutico leva à cura em até 98% dos casos tratados, com taxa de recidiva de 1% no período de 5 a 10 anos. Com a adoção

mundial da PQT, a prevalência de casos de hanseníase caiu de 3 milhões de casos em 1991 para menos de 200 mil casos em 2019. No que concerne ao tratamento, há fatores externos que podem interferir no mesmo, tais como a vulnerabilidade social e estigma da doença (BRASIL, 2022a).

Nas últimas décadas, a OMS tem definido metas para o combate da hanseníase. A estratégia atual, denominada Estratégia Global para a Hanseníase 2021-2030, tem por meta a interrupção da transmissão, com os objetivos de zero doença, zero incapacidades e zero discriminação. Essa estratégia compõe o roteiro da OMS para o combate às DTNs, e possui os pilares de implementar um roteiro de zero hanseníase nos países endêmicos, ampliar atividades de prevenção e detecção ativa de casos novos, controlar a hanseníase e de combater os estigmas (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2021b).

No contexto brasileiro, a hanseníase ainda é um importante problema de saúde pública, por isso tem-se buscado novas formas diagnósticas que auxiliem na identificação precoce de casos novos. Visto isso, em setembro de 2021 foi aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) o primeiro teste comercial para detecção molecular de *M. leprae* em amostras de contatos de casos confirmados de hanseníase, através do método da Reação em Cadeia de Polimerase, denominado de NAT-Hanseníase. O NAT Hanseníase foi desenvolvido pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, RJ), juntamente com o Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP) e foi incorporado ao SUS para realização em biópsias suspeitas de contatos de pacientes com hanseníase (BRASIL, 2022a).

2 JUSTIFICATIVA

O Brasil é o segundo país com maior número de casos novos de hanseníase no mundo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2021b). Dado o fato de que o diagnóstico da doença é essencialmente clínico, tem-se buscado ferramentas diagnósticas passíveis de serem empregadas. Recentemente, foi aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) um teste de reação em cadeia de polimerase em tempo real (qPCR) para detecção molecular de *Mycobacterium leprae*, baseado no método de Taqman (NAT Hanseníase), em amostras de biópsia de lesão. Como se trata de uma técnica de alto custo, apesar de sua elevada sensibilidade e especificidade analíticas, foi proposto no presente projeto o desenvolvimento de um teste para detecção molecular de *M. leprae*, baseado no método de SYBR Green, em amostras de sangue de pacientes e contatos menores de 15 anos de idade, que, além do menor custo, possui uma amostra de coleta mais simples e permite a investigação em indivíduos que ainda não apresentam lesões, viabilizando um diagnóstico precoce.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Realizar validação de método para identificação molecular de *Mycobacterium leprae* em amostras de sangue.

3.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer o teste de detecção molecular utilizando o método de SYBR Green;
- Caracterizar o perfil clínico demográfico dos pacientes de hanseníase e contatos menores de 15 anos de idade envolvidos no projeto;
- Analisar a presença molecular de *Mycobacterium leprae* através do teste SYBR Green nas amostras de DNA isolado de sangue de pacientes e contatos;

4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 Epidemiologia

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), até o final de 2020 foram registrados 127.396 casos novos de hanseníase no mundo, sendo 15,1% desses ocorridos nas Américas (Norte, Central e Sul). Dos 15,1% registrados nas Américas, 93,6% (17.979) correspondem a casos notificados no Brasil. Juntos, Brasil, Índia e Indonésia correspondem a 74% dos casos novos detectados em 2020, sendo o Brasil, o segundo lugar no mundo em número de casos de hanseníase e a Índia, o primeiro lugar (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2021a).

Dos 127 países que notificaram à OMS em 2020, 62 apresentaram casos novos de hanseníase em crianças (menores de 15 anos de idade). Foram 8.629 casos novos no mundo, correspondendo a 6,8% do total de casos novos registrados, enquanto, no Brasil, 878 dos casos novos ocorreram em crianças (4,8%). A detecção da doença em crianças é um indicativo de uma alta taxa de transmissão na comunidade, visto o longo período de incubação da doença e sua evolução lenta (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2021a; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2021b). Diante desse fato, vê-se a importância de ações diagnósticas voltadas para crianças, com o intuito de entender melhor a situação endêmica de uma região.

Outro parâmetro importante é o Grau de Incapacidade Física (GIF), que indica o grau de acometimento neural da doença, variando de zero (0) a dois (2), afetando olhos, mãos e pés (BRASIL, 2010). Um maior GIF em casos novos indica um atraso no diagnóstico, o que pode estar associado com a falta de conhecimento da população sobre a doença e com a falta de preparo de grande parte dos profissionais para diagnosticar a doença. Em 2020, o Brasil registrou 1.504 casos novos com GIF 2, sendo 35 destes ocorridos em crianças (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2021a).

Em 2021, a região Nordeste registrou 6.648 casos novos de Hanseníase, representando 43,86% do total de casos novos no Brasil no mesmo ano. Desses, 510 apresentaram GIF 2 no momento do diagnóstico, sendo 7,67% dos casos novos no Nordeste. Vale a pena destacar que a proporção de avaliação quanto ao grau de incapacidade no momento do diagnóstico nessa região é de apenas 78,4%. Nos Estados do Ceará e de Alagoas foram registrados 1.033 e 229 casos novos, respectivamente, representando uma diminuição na taxa de detecção nesses Estados ao se observar a perspectiva histórica de 2010 a 2020. No entanto,

é preciso considerar que essa diminuição de casos novos acompanha o padrão nacional e mundial para os últimos dois anos (2020 e 2021), onde os esforços dos sistemas de saúde estavam voltados para o combate da pandemia por COVID-19, não podendo-se dizer que houve necessariamente uma diminuição na disseminação da hanseníase (BRASIL, 2022b).

Os contatos dos casos com hanseníase são as pessoas que apresentam maior risco de adoecimento, quando comparado com a população em geral. Dessa forma, é importante realizar a investigação nesse grupo com o objetivo de detectar precocemente casos novos da doença. Entre 2016 e 2020, houve uma redução de 31,8% na forma de detecção por exame de coletividade e um aumento de 14,1% na detecção por exame de contato. Em 2020, a proporção de contatos de casos novos examinados foi de 82,0% (BRASIL, 2022b).

4.2 *Mycobacterium leprae*

O *Mycobacterium leprae* é um bacilo álcool-ácido resistente, também conhecido por bacilo de Hansen. Trata-se de um parasita intracelular obrigatório com tropismo por células de Schwann, células que produzem bainha de mielina no sistema nervoso periférico. Mede aproximadamente 0,3µm de diâmetro e entre 1 a 8µm de comprimento e se reproduz por divisão binária. Pelo fato de ser fagocitado por macrófagos na pele e outros órgãos, pode ser considerado como patógeno intravesicular, com capacidade de sobreviver e de se multiplicar no interior dos fagolisossomas, em caso de haver microambiente favorável (BRITTON; LOCKWOOD, 2004; MACIEIRA, 2000).

O genoma do *M. leprae* possui 3.268.203 pares de bases, sendo 1.604 genes ativos, que codificam proteínas, e 1.116 genes inativos ou pseudogenes. Possui um genoma mais simples em comparação com o *M. tuberculosis*, que apresenta aproximadamente 4.000 genes ativos, sendo 1.439 comuns em ambos os patógenos (COLE *et al.*, 2001). *M. leprae* apresentou, com a evolução, uma redução em seu genoma, o que levou à perda de vias metabólicas e genes reguladores, tornando-o dependente de metabólitos intracelulares do hospedeiro. Entretanto, tal redução da diversidade genética do patógeno não parece ter afetado sua virulência (BRITTON; LOCKWOOD, 2004).

A parede celular micobacteriana possui alguns componentes importantes para sua sobrevivência, como peptidoglicanos, que confere rigidez à parede, o lipoarabinomana (LAM), que modula a atividade bactericida de macrófagos, além de componentes lipídicos, como o glicolípido fenólico I (PGL-1) (BRITTON; LOCKWOOD, 2004). O PGL-1 é um

antígeno específico do *M. leprae*, que atua provocando ativação funcional de macrófagos, além de estimular resposta imune potente formada principalmente por anticorpos do isotipo IgM (MACIEIRA, 2000).

4.3 Caracterização da Hanseníase

A Hanseníase é uma doença infecciosa e de evolução crônica, mas curável, causada pelo *Mycobacterium leprae*. É endêmica de regiões mais pobres e populosas e, no Brasil, ainda é um importante problema de saúde pública, tendo sido reportado mais de 10.000 casos novos em 2020, segundo dados da Organização Mundial da Saúde (BRASIL, 2022a).

Possui evolução lenta, tendo um período de incubação que pode durar em média 5 anos ou mais. A principal fonte de infecção são indivíduos acometidos pela doença e que apresentam alta carga bacilar. Acredita-se que a principal via de transmissão ocorra através de perdigotos (gotículas contendo a micobactéria) expelidos durante a fala, espirro, tosse provenientes de indivíduos com a forma multibacilar da doença (casos índices) e que não estejam em tratamento (SCOLLARD, 2017; BRASIL, 2022a). Necessita-se de um contato prolongado para que a infecção se desenvolva; assim sendo, acredita-se que os indivíduos com maior risco de adoecimento são aqueles que convivem com o caso índice dentro ou próximo do domicílio, como parentes próximos e vizinhos (BRASIL, 2022c).

O bacilo afeta principalmente a pele e nervos periféricos, mas pode atingir linfonodos, olhos, mucosa do trato respiratório superior, entre outros. Trata-se de uma doença incapacitante, cursando com perda funcional principalmente em olhos, mãos e pés. Geralmente, um maior Grau de Incapacidade Física (GIF), está associado com diagnóstico tardio da doença (BRASIL, 2022a).

A hanseníase pode ser caracterizada segundo a classificação operacional da Organização Mundial da Saúde (OMS), a classificação de Madri (1953) e a classificação de Ridley-Jopling (1966). Segundo a OMS, a hanseníase apresenta-se na forma Paucibacilar (PB) quando há a presença de 1 a 5 lesões cutâneas e baciloscopia de raspado intradérmico negativa e/ou acometimento de um tronco nervoso, e como Multibacilar (MB) quando há a presença de mais de cinco lesões de pele e/ou baciloscopia de raspado intradérmico positiva e/ou acometimento de dois ou mais troncos nervosos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2019). A classificação de Madri considera a existência de uma forma clínica inicial, denominada Indeterminada, onde ainda não há uma resposta imune definida, além de duas

formas estáveis e opostas da doença, chamadas de Tuberculóide e Virchowiana, existindo, entre elas, formas clínicas instáveis denominadas de dimorfas (BRASIL, 2022c). Na classificação de Ridley-Jopling, que é adotada internacionalmente, além dos polos Tuberculóide (TT), com alta imunidade celular, e Virchowiano (VV), com alta carga bacilar, as formas dimorfas são classificadas em *borderline* tuberculóide (BT), *borderline-borderline* (BB) e *borderline* virchowiana (BV), representando uma diminuição da resposta imune celular do polo TT para o polo VV (RIDLEY; JOPLING, 1966).

4.4 Imunopatogenia da Hanseníase

A hanseníase pode se manifestar de diferentes formas, dependendo da interação entre o *M. leprae* e o sistema imune do indivíduo. No primeiro contato do bacilo com o sistema imune, há a ativação da resposta imune inata e inespecífica, devido ao reconhecimento de padrões moleculares de micobactérias por receptores presentes nas células, como os receptores *Toll-like* (TLR), levando à ativação de macrófagos e células dendríticas, responsáveis pela ativação e diferenciação de células T em perfil Th1 através da secreção da citocina pró-inflamatória IL-12. As células Th1 estão diretamente envolvidas com a eliminação do bacilo (MENDONÇA *et al.*, 2008).

Entretanto, a principal responsável pelo combate à infecção pelo *M. leprae* é a resposta imune adaptativa, podendo esta ser celular (tipo 1) ou humoral (tipo 2). O tipo de resposta imune influencia na evolução da doença e na definição da forma clínica. Tal resposta imunológica depende basicamente da ativação de macrófagos que podem se diferenciar em M1 (macrófagos classicamente ativados), predominante na forma clínica onde há uma maior resposta imune celular (tuberculóide), ou M2 (macrófagos alternativamente ativados), predominante na forma onde há uma maior carga bacilar (virchowiana) (MENDONÇA *et al.*, 2008).

Quando há o envolvimento de macrófagos M1, há ativação de linfócitos T CD4 perfil Th1, sendo que estes produzem citocinas IL-2, TNF e IFN- γ . A citocina IFN- γ possui um papel fundamental de ativar macrófagos, o que leva a uma atividade fagocítica intensa, e o TNF colabora na formação e manutenção dos granulomas, o que favorece a eliminação das bactérias. Por outro lado, macrófagos M2 estimulam linfócitos T CD4 perfil Th2, que produzem citocinas IL-4, IL-5 e IL-10, levando a uma supressão macrofágica e a um perfil anti-inflamatório, diminuindo a expressão de receptores e suprimindo a produção da citocina IL-12, favorecendo

formas disseminadas da doença e uma resposta imune humoral, a qual é ineficaz para eliminar bactérias intravesiculares (BRASIL, 2022a; MENDONÇA *et al.*, 2008).

4.5 Diagnóstico clínico-laboratorial da hanseníase

O diagnóstico da hanseníase é principalmente clínico, baseado em exames físicos e na avaliação da pele e nervos do paciente. O nervo facial pode ser avaliado observando a simetria dos movimentos palpebrais e das sobrancelhas. É importante também observar e palpar os nervos do pescoço, punho, cotovelo, pés, joelhos e tornozelos, analisando se estão espessos, assimétricos, endurecidos, dolorosos ou com sensação de choque. Para confirmar uma possível alteração nerval deve-se realizar o teste de sensibilidade na região inervada (BRASIL, 2022c).

A primeira sensibilidade que se perde é a térmica, seguida da dolorosa e, por fim, a tátil. No teste de sensibilidade térmica, deve ser analisada as áreas suspeitas, utilizando tubos de vidro contendo água fria e quente. É importante testar primeiro o tubo em áreas sem lesões e realizar uma comparação com uma área lesionada. O paciente não deve estar olhando no momento da avaliação. O teste de sensibilidade dolorosa deve ser realizado utilizando uma agulha aplicada com leve pressão sobre a área lesionada, alternando entre o centro e a borda da lesão. Já o teste de sensibilidade tátil pode ser realizado utilizando o monofilamento verde (gramatura de 0,05g) do kit de estesiômetro para avaliar uma diferença de sensibilidade entre a área lesionada e a normal (BRASIL, 2022c).

Os exames subsidiários também podem ser utilizados para auxiliar no diagnóstico quando necessário, sendo eles a baciloscopia de raspado intradérmico e a biópsia de pele. A baciloscopia de raspado intradérmico apresenta-se negativa em pacientes com a forma tuberculóide da doença, positiva ou negativa nas formas intermediárias e geralmente positiva na forma virchowiana. Quanto ao exame histopatológico, a amostra é coletada e corada para avaliação histopatológica e procura de bacilos. Na hanseníase indeterminada encontra-se um infiltrado inflamatório, enquanto na tuberculóide encontra-se granulomas do tipo tuberculóide, sendo que ambas apresentam ausência de bacilos. A forma virchowiana, por outro lado, apresenta infiltrado de macrófagos no exame e bacilos em números incontáveis (BRASIL, 2022c).

Outras formas de diagnóstico incluem a prova de histamina exógena e endógena, que avalia a funcionalidade do sistema nervoso autônomo, quanto à dilatação de vasos cutâneos superficiais para a formação do eritema, e a avaliação da sudorese, que consiste em

investigar a presença de áreas de hipoidrose ou anidrose (BRASIL, 2022c). Destaca-se ainda a sorologia anti-PGL-1, que apresenta uma utilidade na detecção de contatos com maior risco de desenvolver a doença, mas que não pode ser utilizado isoladamente como teste diagnóstico. O teste ML Flow é um teste imunocromatográfico rápido que detecta anticorpos IgM contra o antígeno PGL-1 e que está aprovado para uso exclusivo na investigação de contatos de casos confirmados dentro do Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2022a).

Em dezembro de 2021, através da Portaria SCTIE/MS nº 78, foi incorporado ao SUS um teste de reação em cadeia de polimerase em tempo real (qPCR) para detectar marcadores genéticos específicos do *M. leprae*. Esse teste de biologia molecular, desenvolvido pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) em parceria com o Instituto Carlos Chagas e o Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP), utiliza como amostra material coletado de biópsia de lesão de pele ou nervo. O Kit NAT Hanseníase é o primeiro teste molecular desenvolvido no Brasil para a detecção da doença e aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). O teste está aprovado, no SUS, para uso no diagnóstico de contatos de casos confirmados de hanseníase no nível da Atenção Especializada (BRASIL, 2022a; FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2021).

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Captação de contatos e pacientes de hanseníase

5.1.1 Delineamento e municípios selecionados

Configura-se como um estudo transversal realizado com pacientes notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) e seus contatos na faixa etária de 4 a 15 anos de idade, residentes nos municípios de São Gonçalo do Amarante – CE, Canindé – CE e Santana do Ipanema - AL. A escolha dos municípios se deu por conta do alto número de casos entre pacientes menores de 15 anos e devido a existência de contato já pré-estabelecido com os profissionais de saúde destes, facilitando a coleta de dados.

5.1.2 População

Os casos índices foram selecionados a partir das fichas de notificação do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) notificados até 5 anos antes da realização do estudo em cada município. A coleta de amostras nos municípios do Ceará ocorreu em 2019, já em Santana do Ipanema - AL foram utilizadas amostras de estudo anterior realizado em 2014.

O projeto foi explicado aos participantes em visitas domiciliares realizadas junto aos agentes comunitários de saúde, seguido do agendamento de consulta no posto de saúde para avaliação dermatoneurológica e coleta das amostras de sangue. Os participantes (casos índices e contatos) foram convidados a responder um questionário para coleta de dados sociodemográficos, após assinatura do termo de consentimento e do termo de assentimento (se a criança estivesse na faixa etária de 8 a 15 anos de idade).

Como critérios de inclusão, os participantes são contatos de casos positivos, entre 4 e 15 anos de idade, residindo com o caso índice (intradomiciliares) ou a uma distância de 5 casas à esquerda ou à direita ou na moradia à frente do caso índice (peridomiciliares), bem como aqueles que frequentam a moradia. Critérios de exclusão foram considerados como aqueles que não realizaram alguma etapa do processo, seja na participação no momento de responder ao questionário, na avaliação dermatoneurológica ou na coleta de sangue.

5.1.3 Avaliação Dermatoneurológica

A avaliação dermatoneurológica foi realizada seguindo as orientações do Guia Prático sobre a Hanseníase, elaborado pelo Ministério da Saúde (2017). Os responsáveis por sua realização foram os membros da Liga Acadêmica de Doenças Estigmatizantes (LADES-UFC) nos municípios de São Gonçalo do Amarante – CE e Canindé - CE, sob supervisão da professora Paula Sacha Frota Nogueira, do Departamento de Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, e por profissionais da saúde locais no município de Santana do Ipanema – AL, sob supervisão da enfermeira professora Dra. Clódís Maria Tavares, da Universidade Federal de Alagoas.

5.1.4 Coleta de amostras de sangue

Foram coletados 4mL de sangue total em tubo contendo EDTA. Essas amostras foram aliquotadas e armazenadas a -20°C até a realização da extração de DNA.

5.1.5 Extração de DNA das amostras de sangue

A extração de DNA de sangue total foi realizada utilizando o Kit Mini Spin Plus, da linha Biopur Spin, seguindo as instruções do fabricante (ANEXO D). O princípio da extração baseia-se na adesão do DNA à coluna de sílica do Kit, que, após duas lavagens, é eluído com tampão e armazenado em microtubos. O DNA extraído foi armazenado a -20°C até a realização da qPCR (reação em cadeia de polimerase em tempo real).

5.2 Estabelecimento de teste molecular utilizando SYBR Green

5.2.1 Alvos e primers

Os alvos de *Mycobacterium leprae* selecionados foram o 16SrRNA e o elemento repetitivo RLEP2, conforme descrito em outros trabalhos na literatura corrente (MARTINEZ *et al.*, 2009; TRUMAN *et al.*, 2008). Foi proposto ainda um terceiro alvo, em outra região do

mesmo gene RLEP, denominado de RLEP1. A sequência RLEP1 foi desenhada pela Doutoranda Andressa Almeida Albuquerque, utilizando o programa Primer Express™ 3.0, enquanto a sequência RLEP2 foi escolhida a partir do trabalho de Truman *et al.* (2008). A escolha do *primer* para o gene 16SrRNA foi baseada no estudo de Martinez *et al.* (2009). A fim de verificar a qualidade da quantificação de DNA, foi utilizado como controle da reação a RNaseP humana (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2020). Segue abaixo quadro (Quadro 1) demonstrando as regiões e sequências utilizadas.

Quadro 1: Sequências de *primers* utilizadas na detecção molecular do *M. leprae*

Região	Primer	Sequência do primer
16SrRNA (MARTINEZ, A. N. <i>et al.</i> , 2009)	16S (Senso)	5'-GCATGTCTTGTGGTGGAA AGC-3'
	16S (Antisenso)	5'-CACCCACCAACAAGCTGAT-3'
RLEP1 (Desenhado no programa Primer Express™ 3.0)	RLEP1 (Senso)	5'-GGCGTTTTAGTGTGCATGTCA-3'
	RLEP1 (Antisenso)	5'-GCAGAAATGGTGCAAGGGATA-3'
RLEP2 (TRUMAN <i>et al.</i> , 2008)	RLEP2 (Senso)	5'- GCAGTATCGTGTTAGTGAACAGTGCA -3'
	RLEP2 (Antisenso)	5'-GCACATACGGCAACCTTCTAGCG-3'
RNaseP (CDC, 2020)	RNaseP (Senso)	5'- AGATTTGGACCTGCGAGCG-3'
	RNaseP (Antisenso)	5'- GAGCGGCTGTCTCCACAAGT -3'

Fonte: Albuquerque, A. A. (2022) (dados não publicados); Martinez *et al.* (2009); Truman *et al.* (2008).

5.2.2 Validação de primers

Inicialmente, os *primers* foram analisados no software Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) para verificação de especificidade *in silico* com o genoma de *M. leprae*, ou seja, se os *primers* demonstravam reação com outros bacilos e para DNA humano.

Para realizar a validação dos *primers* foi utilizado o PowerUp™ SYBR® Green Master Mix (Thermo Scientific, EUA). Definida a quantidade final no poço da placa para análise de 15 µL, foi utilizado 7,5 µL de Mix, 2 µL de amostra de DNA de *M. leprae* extraída

de bacilos liofilizados e a quantidade total foi completada com os *primers* senso, antisenso e quantidade suficiente de água (ALBUQUERQUE, 2022) (dados não publicados).

Baseado na literatura existente, definiu-se as concentrações 200nM, 400nM e 800nM para analisar os alvos e escolher a concentração ideal, todas em duplicata. Como controle positivo utilizou-se DNA extraído de bacilo *M. leprae* liofilizado com concentração de 200.000 fg/ μ L (BEI Resources, ATCC, EUA) e para controle negativo utilizou-se água para injeção livre de DNA (ALBUQUERQUE, 2022) (dados não publicados).

O critério de escolha para a concentração dos *primers* levou em consideração o menor ciclo de quantificação (Cq) e a maior variação de fluorescência (ΔRn), além do controle negativo para aquela concentração não ter apresentado pico na curva *melt*. O Cq corresponde ao ciclo no qual a curva de amplificação atinge o limiar de detecção, gerando um sinal de fluorescência (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2016) (ALBUQUERQUE, 2022) (dados não publicados).

5.2.3 Ciclos de amplificação

A técnica de PCR, baseada em ciclos de amplificação, foi realizada no termociclador Bio-Rad CFX96™ cedido pelo Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas (LACT/FFOE/UFC), sob as seguintes condições: 50°C por 2 minutos, seguidos de incubação em 95°C por 10 minutos, e de 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 45 segundos. Ao final da PCR foi adicionada uma curva *melting* de 60°C a 95°C, variando 0,5°C a cada 20 segundos (ALBUQUERQUE, 2022) (dados não publicados).

5.2.4 Análise da especificidade analítica dos primers

Para análise de especificidade analítica dos *primers* foram realizadas PCRs utilizando amostras padrões do DNA de *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* obtidas pela ATCC, de referências 6538P ATCC, 19433 ATCC, 8739 ATCC e 27853 ATCC, respectivamente. As amostras de *M. bovis*, *M. fortuitum* e *M. gordonae* foram gentilmente doadas pelo Prof. Dr. Célio Lopes Silva, da Universidade de São Paulo (USP), enquanto o DNA de *M. tuberculosis* foi gentilmente doado pela Profa. Dra. Cristiane Cunha Frota, do Laboratório de Pesquisa em Micobactérias do

Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará. Para a realização da PCR, foram utilizados 10 ng de DNA de cada uma das cepas avaliadas.

Foi também analisada a especificidade de um controle positivo de DNA extraído de bacilo liofilizado de *M. leprae* para o alvo 16SrRNA e para os alvos do RLEP, todos em duplicata. A água para injeção foi utilizada como controle negativo. Para confirmar os resultados de especificidade analítica para a corrida de qPCR, foi realizada eletroforese com agarose 5%, a 100V, por 1 hora, revelada com SYBR™ Safe DNA Gel Stain (THERMO SCIENTIFIC, EUA) (ALBUQUERQUE, 2022) (dados não publicados).

5.2.5 Análise da sensibilidade analítica dos primers

Três curvas padrões, com 6 pontos em duplicatas diluídas na razão de 1 para 8, foram realizadas em dias diferentes para cada alvo. O mix é constituído de PowerUp™ SYBR® Green Master Mix (THERMO SCIENTIFIC, EUA), *primers* nas concentrações definidas pela validação e água em quantidade suficiente para 13 µL. O protocolo do equipamento de PCR também foi o mesmo definido na validação. O controle positivo foi 2 µL do DNA de *M. leprae*, nas concentrações 50.000 fg/poço, 6.250 fg/poço, 781,25 fg/poço, 97,66 fg/poço, 12,21 fg/poço e 1,53 fg/poço, sendo que, em cada curva, foram utilizados 2 poços para o controle negativo com o intuito de verificar contaminação da PCR (ALBUQUERQUE, 2022) (dados não publicados).

Para a primeira curva de cada alvo foi definido um valor fixo de *Threshold*, sendo este o valor em que a curva obteve eficiência mais próxima a 100% (ALBUQUERQUE, 2022) (dados não publicados). O *threshold* é o limiar de detecção, ou seja, valores abaixo dele são considerados como ruído e não como sinal de amplificação, ao contrário dos valores que ultrapassam o limiar, considerados como sinal de amplificação da fita de DNA (KUBISTA *et al*, 2006).

5.2.6 Eficiência das reações

Para cada curva de calibração foi avaliada a eficiência, levando em consideração a linearidade da reta (R^2) e a inclinação (Slope). Quanto mais próximo de 1,0 for o R^2 , mais linear é a curva, sendo possível estabelecer uma boa correlação entre os pontos da mesma, utilizando um ponto para prever outros valores da curva (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2016).

5.3 Detecção molecular de *M. leprae* nas amostras de DNAs isolados de sangue utilizando qPCR- SYBR Green

A análise do DNA extraído das amostras coletadas foi realizada no Laboratório de Imunologia (LABIM) da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, no ano de 2022. Para a realização da PCR utilizando o sistema SYBR Green, validado conforme demonstrado anteriormente, foi utilizado mix de 7,5 µL de PowerUp™ SYBR® Green Master Mix, 2,4 µL de *primer* senso e antisenso com concentração de 5 µM e quantidade de água suficiente para completar 13 µL para os alvos RNaseP (controle interno humano), 16SrRNA e RLEP2. Para o RLEP1, o mix foi de 7,5 µL de PowerUp™ SYBR® Green Master Mix, 1,2 µL de cada primer com concentração de 5 µM e quantidade de água suficiente para completar 13 µL. Visto que a quantidade total definida para os poços da placa foi de 15 µL, foram utilizados 2 µL de amostra (pacientes ou contatos) para completar com os 13 µL de mix. O controle positivo utilizado foi o DNA extraído de *M. leprae* e o controle negativo foi água. As quantidades e concentrações dos primers (descritos no quadro 1) foram definidas através da sua validação (ALBUQUERQUE, 2022) (dados não publicados).

5.4 Aspectos Éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC) da Universidade Federal do Ceará (UFC) sob o parecer de número 532.850/2014.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Estabelecimento de teste molecular utilizando SYBR Green

No quadro abaixo, observa-se que o menor Cq e maior ΔRn (ou RFU) para os alvos RNase P e RLEP 2 foram obtidos na concentração de 800nM. Quanto ao 16SrRNA, o menor Cq foi obtido na concentração de 200nM, no entanto a concentração de 800nM apresentou a maior ΔRn . Já o alvo RLEP 1 apresentou menor Cq em 400nM e maior ΔRn em 800nM (Quadro 2).

Quadro 2: Média dos valores de Cq e RFU encontrados para as concentrações analisadas.

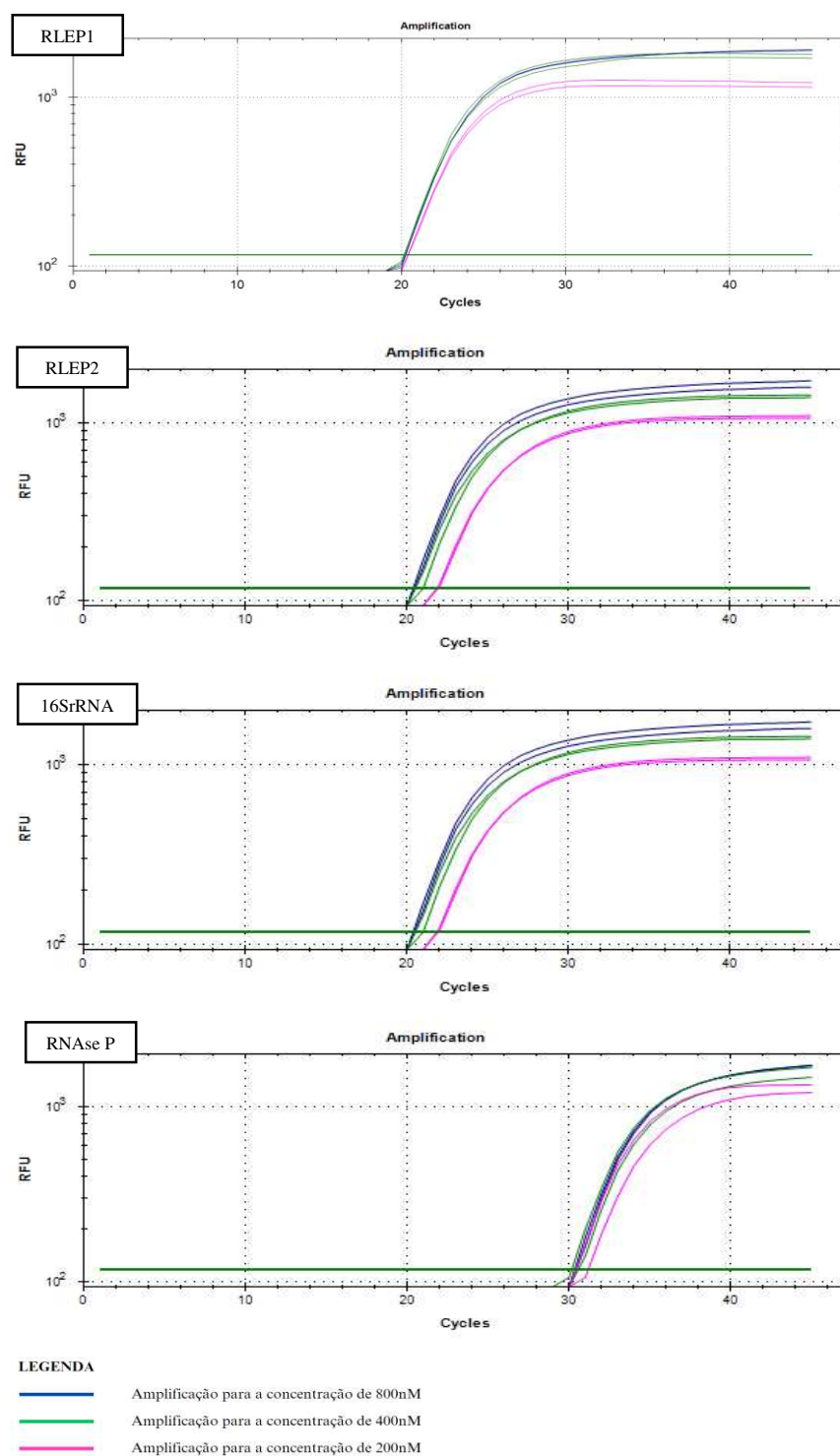
Concentração de primers	RNase P		RLEP1		RLEP2		16SrRNA	
	Cq	RFU	Cq	RFU	Cq	RFU	Cq	RFU
800nM	30,36	1729,75	20,2	1905,04	20,42	1650,31	24,87	2134,91
400nM	30,38	1582,34	20,13	1753,62	20,8	1407,2	24,94	1955,21
200nM	30,75	1275,39	20,4	1187,74	21,93	1187,74	24,81	1466,15

Fonte: Elaborado pela autora.

O menor Cq possuiu maior influência na escolha da concentração para os casos em que os dois parâmetros não foram atendidos, no entanto, para o alvo 16SrRNA foi considerado a concentração que obteve maior variação ΔRn devido ao fato do menor Cq ter apresentado a menor variação de fluorescência. A partir destes resultados e visto que em nenhum controle negativo houve sinal de amplificação, foram definidas as concentrações 800nM para os alvos 16SrRNA, RLEP 2 e RNase P, e 400nM para o alvo RLEP 1.

Abaixo estão representadas as curvas de amplificação (Cq x RFU) dos alvos RLEP1, RLEP2, 16SrRNA e RNaseP, respectivamente (Figura 1). A curva em azul representa a amplificação obtida para a concentração de 800nM, a curva verde para a concentração de 400nM e a curva rosa para a concentração de 200nM para todos os alvos. A linha verde representa o limiar de detecção (*threshold*) definido para o alvo.

Figura 1 - Curvas de amplificação dos alvos para as concentrações analisadas.

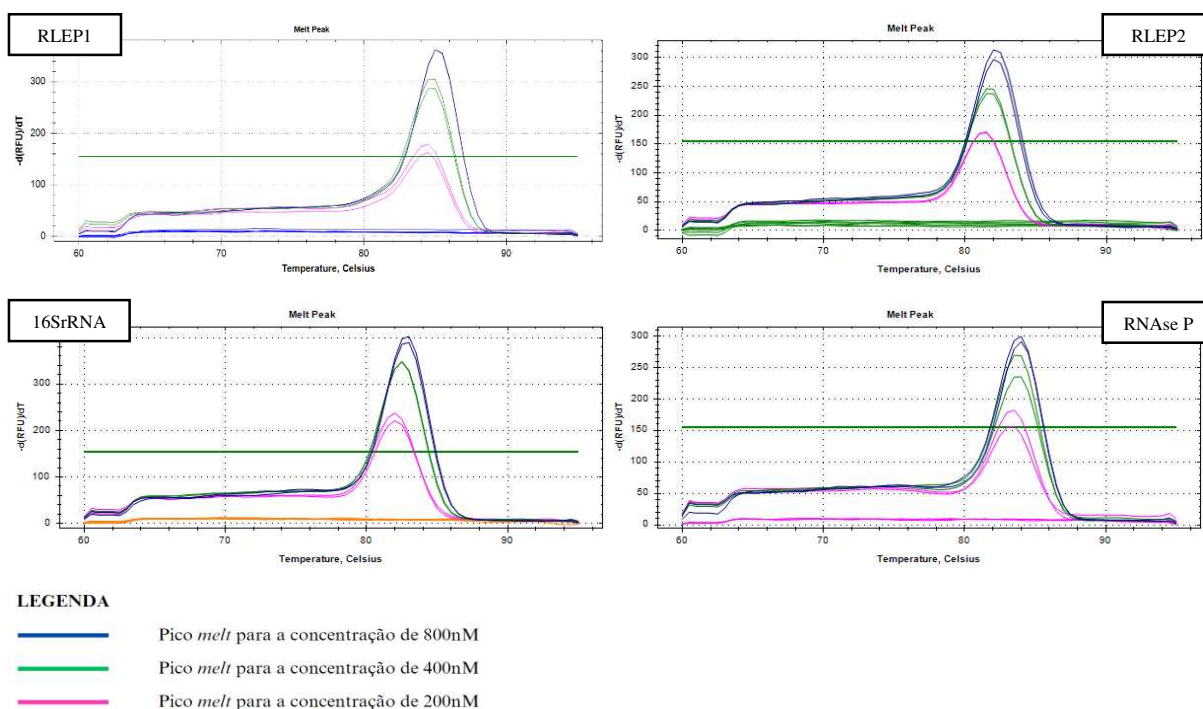


Fonte: Elaborado pela autora.

Já a curva *melting* é um parâmetro utilizado para definir o momento teórico em que metade das fitas de DNA estão dissociadas e metade ainda estão como fita dupla. O pico *melt*

varia de acordo com o tamanho do *amplicon* de cada amostra e com a quantidade de ligações Guanina-Citosina da dupla fita, pois quanto mais ligações, maior será a temperatura necessária para quebrá-las. Dessa forma, como cada *amplicon* deverá gerar um pico de temperatura próprio, sua análise permite analisar a especificidade da reação, uma vez que se espera que o pico seja semelhante para cada alvo (SALES, 2017).

Figura 2 - Gráficos contendo as curvas *melting* para cada alvo.



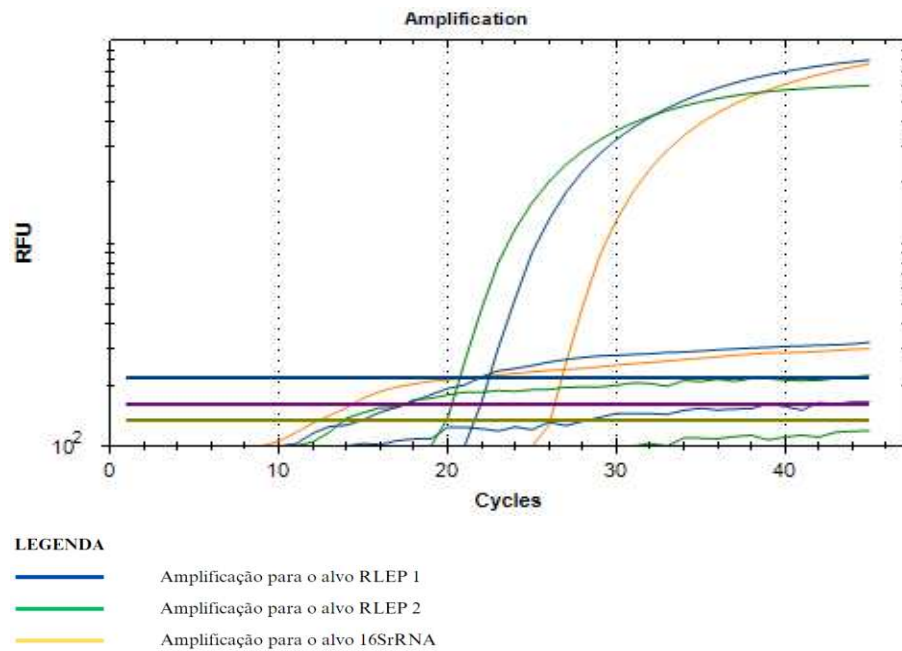
Fonte: Elaborado pela autora.

Como demonstrado nos gráficos acima (Figura 2), todas as concentrações de cada alvo possuem aproximadamente a mesma temperatura de pico, sendo estas 85°C para o RLEP1, 81,5°C para o RLEP2, 82,5°C para o 16SrRNA e 84°C para a RNase P, atestando a especificidade para esses alvos. As curvas em azul, verde e rosa representam, respectivamente, as concentrações 800nM, 400nM e 200nM para todos os alvos.

Para as bactérias Gram negativas e Gram positivas testadas no teste de especificidade, nenhuma apresentou amplificação na PCR. Os “traços” observados não chegaram a formar curvas sigmóides, de forma que foram considerados como ruído, diferente do observado para o controle *M. leprae*. Isso indicou a especificidade dos alvos escolhidos para a *M. leprae*, visto que não foram capazes de se ligar à uma região da fita de DNA molde das outras bactérias para induzir a replicação. Na imagem abaixo (figura 3), as curvas azul, verde e

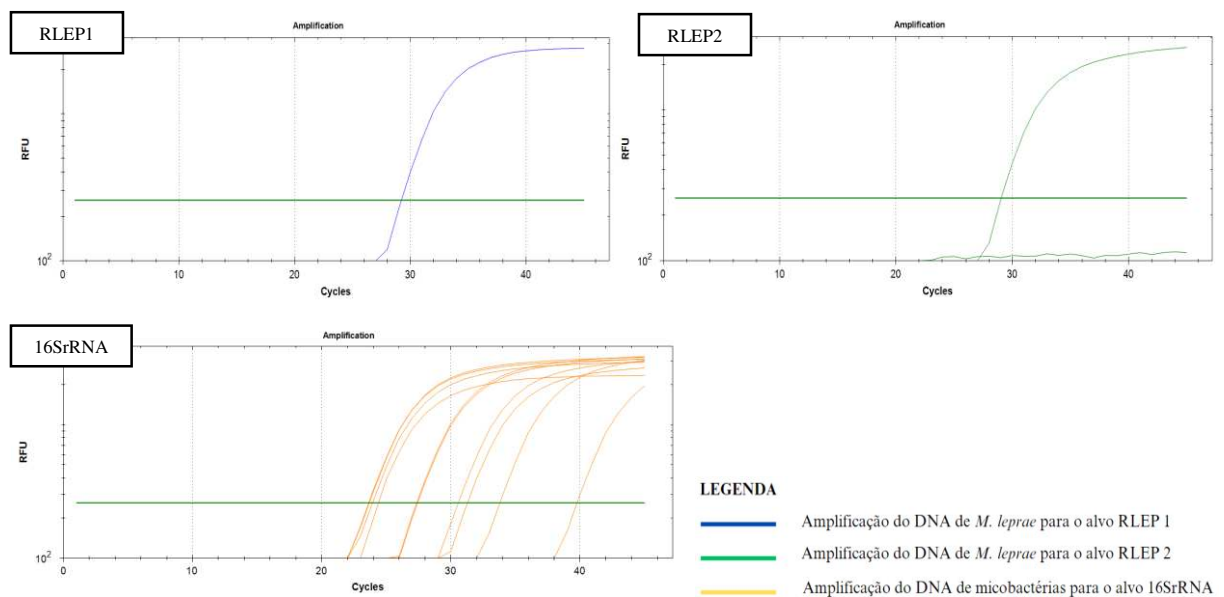
amarela representam os alvos RLEP1, RLEP2 e 16SrRNA, respectivamente, com amplificação observada apenas para o *M. leprae*.

Figura 3 - Curvas de amplificação para as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e o controle positivo *Mycobacterium leprae*.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 4 – Curvas de amplificação para *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium leprae*.

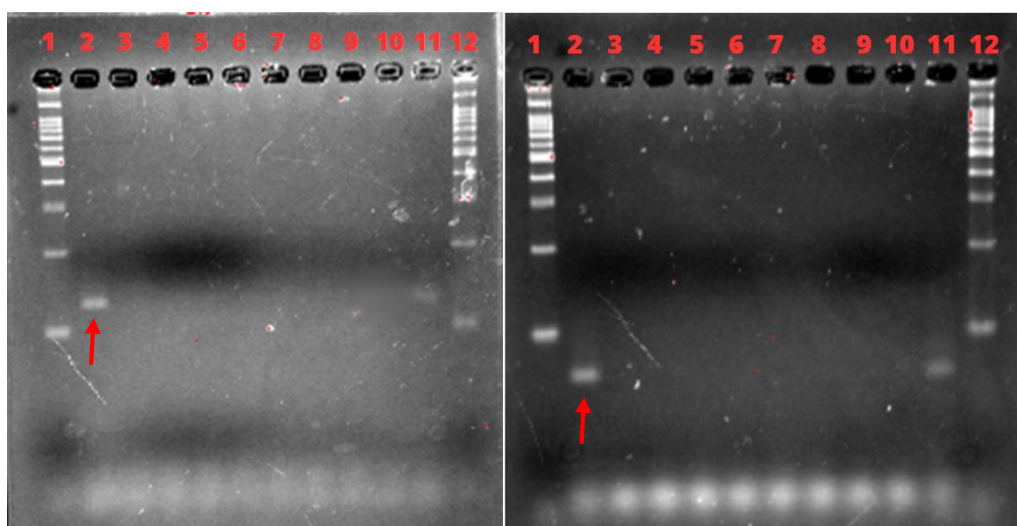


Fonte: Elaborada pela autora.

Já o teste com as micobactérias apresentou resultado similar para os alvos RLEP 1 e RLEP 2, onde nenhuma apresentou amplificação além da *M. leprae*. Em contraposição, para o alvo 16SrRNA observou-se amplificação para todas as amostras visto que a região é conservada no DNA do gênero *Mycobacterium*, conforme imagem acima (Figura 4) (BÖDDINGHAUS, 1990).

Os resultados da eletroforese em gel, realizada com o intuito de confirmar o resultado do teste de especificidade na PCR, resultaram na não formação de bandas para 7 das 8 bactérias analisadas na placa de agarose, sendo a exceção o alvo 16SrRNA, que formou banda para as micobactérias, conforme as figuras abaixo (Figuras 5 e 6).

Figura 5 - Eletroforese em gel para os alvos RLEP 1 e RLEP 2, respectivamente.



LEGENDA

- | | |
|---|--|
| 1 - Marcador de 100 pares de base. | 7 - <i>S. aureus</i> . |
| 2 - Controle positivo de <i>M. leprae</i> . | 8 - <i>E. faecalis</i> . |
| 3 - <i>M. tuberculosis</i> . | 9 - <i>E. coli</i> . |
| 4 - <i>M. bovis</i> . | 10 - <i>P. aeruginosa</i> . |
| 5 - <i>M. fortuitum</i> . | 11 - Controle positivo de <i>M. leprae</i> . |
| 6 - <i>M. gordonae</i> . | 12 - Marcador de 100 pares de bases. |

→ Banda formada para o CP de *M. leprae*.

Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 6 - Eletroforese em gel para o alvo 16SrRNA.



Fonte: Elaborado pela autora.

Nos 12 poços feitos nas placas foram colocados os controles e as amostras na seguinte ordem da esquerda para a direita: Marcador de 100 pares de bases, Controle positivo de *M. leprae*, *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, Controle positivo de *M. leprae* e Marcador de 100 pares de bases. É possível visualizar que, para o alvo 16SrRNA, as bandas formadas nas amostras com micobactérias assumiram a mesma altura no gel.

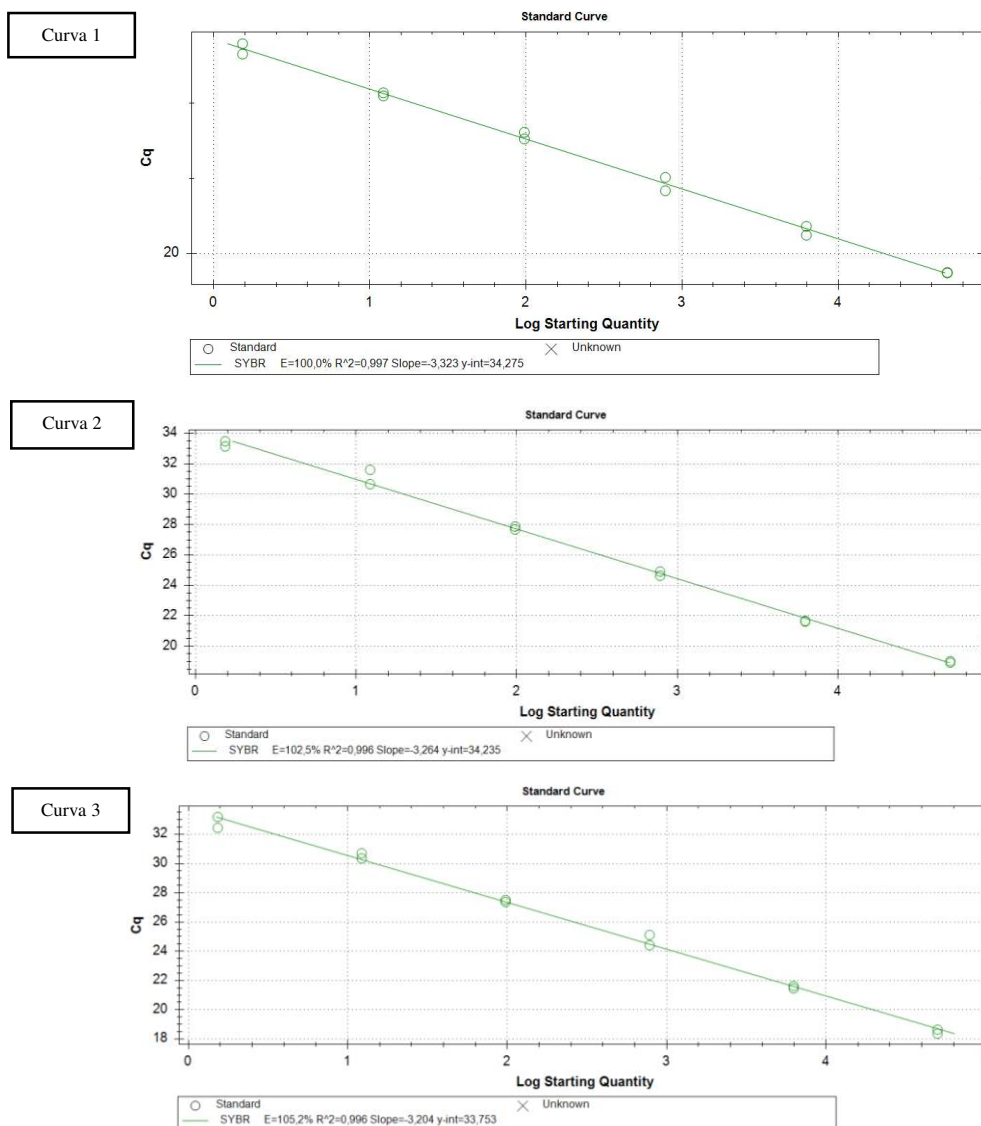
Pode-se notar que a especificidade analítica do método não foi de 100% visto a reatividade com outros tipos de micobactérias para o alvo 16SrRNA, no entanto, ainda trata-se de uma especificidade elevada, sendo esta de 100% para os alvos RLEP dentre as bactérias analisadas neste estudo. Não seria viável a eliminação do alvo 16S devido sua elevada sensibilidade para o *M. leprae*, de forma que este alvo compõe o kit de PCR utilizado para diagnóstico pelo SUS (INSTITUTO DE BIOLOGIA MOLECULAR DO PARANÁ, 2022).

A construção das curvas padrões foi realizada com o intuito de verificar a sensibilidade dos *primers* para o *M. leprae* e a eficiência do método, o qual deve ser o mais próximo possível de 100%. O valor de *threshold* para cada alvo foi definido de acordo com aquele que a eficiência fosse mais próxima de 100% para a primeira curva padrão, sendo 133,58 RFU para o alvo 16SrRNA e 216,48 RFU para os alvos RLEP 1 e RLEP 2.

Quanto às curvas padrões, para o alvo RLEP 1 (Figura 7) foram obtidas as eficiências de 100,0% ($R^2=0,997$; Slope = -3,323), de 102,5% ($R^2= 0,996$; Slope = -3,264) e de

105,2% ($R^2=0,996$; Slope = -3,204), respectivamente, com detecção de até 1,53fg de DNA. A eficiência média das três curvas foi de 102,5%. Nesse alvo, o R^2 das curvas foi acima de 0,99, considerado como uma linearidade ideal para relacionar os pontos da curva através da equação da reta formada.

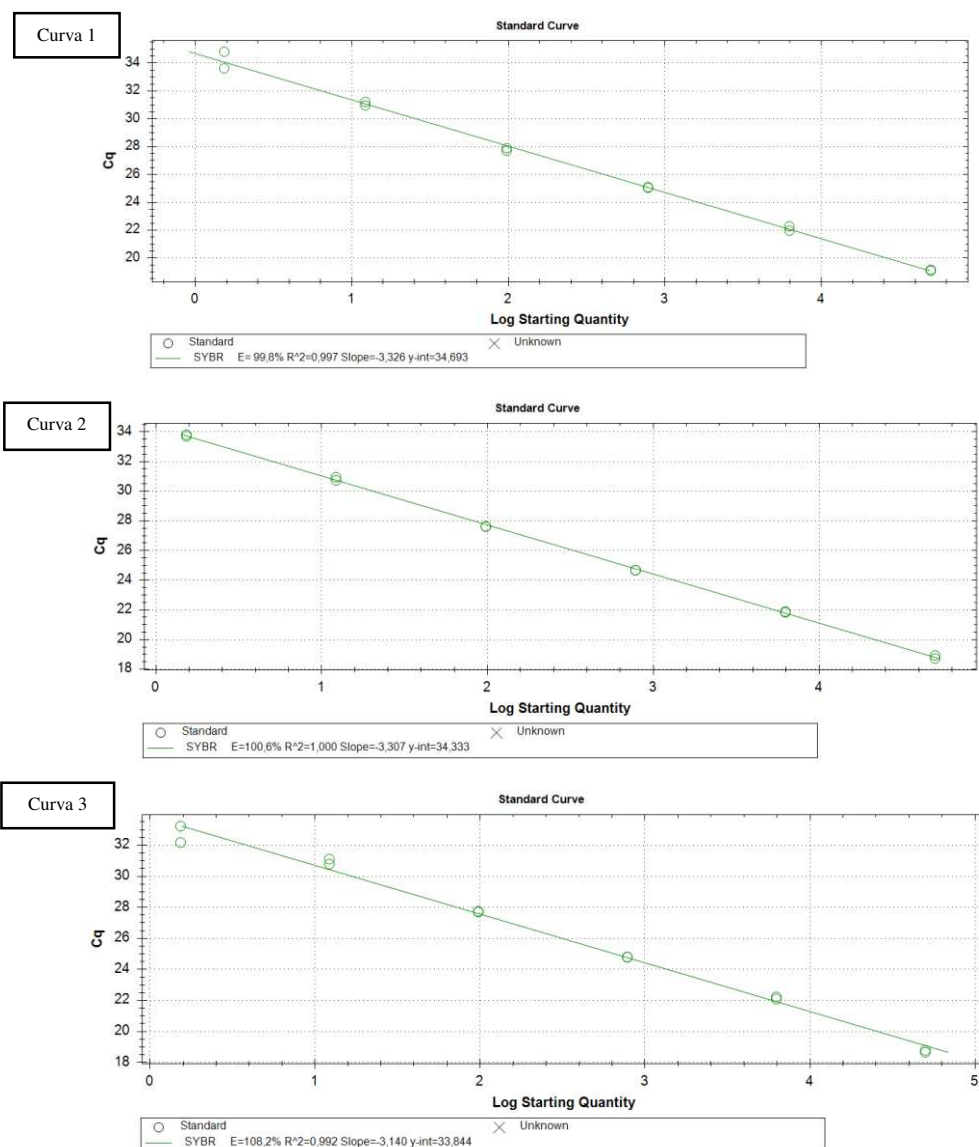
Figura 7 - Curvas padrões para o alvo RLEP 1, em triplicata.



Fonte: Elaborado pela autora.

Para o alvo RLEP 2 (Figura 8), as eficiências foram de 99,8% ($R^2=0,997$; Slope=-3,326), de 100,6% ($R^2=1,000$; Slope = -3,307) e de 108,2% ($R^2=0,992$; Slope= -3,140), respectivamente, com detecção de até 1,53fg de DNA. A eficiência média das três curvas foi de 102,8%. O R^2 das curvas foi acima de 0,99, sendo que para a segunda curva foi 1.

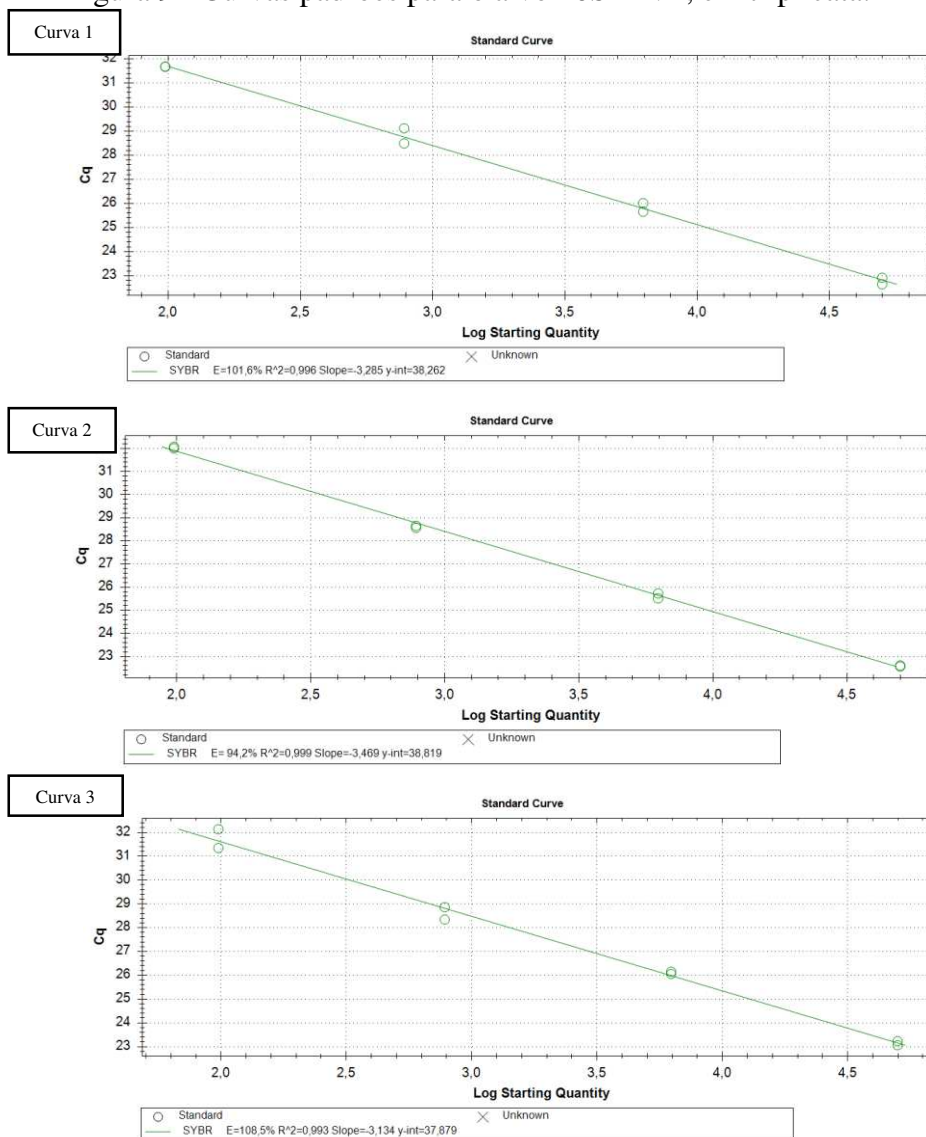
Figura 8 - Curvas padrões para o alvo RLEP 2, em triplicata.



Fonte: Elaborado pela autora.

Para o alvo 16SrRNA (Figura 9), as eficiências encontradas foram de 101,6% ($R^2=0,996$; Slope= -3,285), de 94,2% ($R^2=0,999$; Slope = -3,469) e de 108,5% ($R^2=0,993$; Slope= -3,134), respectivamente, com detecção de até 97,66fg de DNA, sendo o alvo menos sensível. A eficiência média foi de 101,4% e o R^2 para as três curvas foi superior a 0,99. Nesse alvo observou-se que não houve reprodutibilidade nos dois últimos pontos da curva, quando comparado com os outros dois alvos analisados, de forma que foram retirados.

Figura 9 - Curvas padrões para o alvo 16SrRNA, em triplicata.



Fonte: Elaborado pela autora.

Visto dados encontrados na literatura, tendo a faixa de eficiência de 90 a 110% considerada como aceitável para determinar a viabilidade de um método, pode-se verificar através dos testes realizados que o método de detecção utilizando qPCR - SYBR Green apresenta boa eficiência, pois todas as curvas resultaram em valores dentro dessa faixa. O alto valor de R^2 garantiu o controle de qualidade, variando de 0,992 até 1,000 (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2016). Quanto à sensibilidade analítica, os alvos RLEP demonstraram ótima sensibilidade, com detecção de até 1,53fg/ μ L de DNA, sendo mais sensível que o kit NAT Hans, método utilizado pelo SUS como padrão ouro para a análise de biópsia de pacientes, o qual possui sensibilidade de 55fg/ μ L, segundo o fabricante. O alvo 16SrRNA também obteve ótima sensibilidade analítica, sendo a detecção de 97,66fg/ μ L, a qual foi aproximada da

detecção encontrada por Martinez, *et al.* (2009) em estudo utilizando o método de PCR por TaqMan. Ademais, mostrou melhor desempenho quando comparado com o kit NAT Hans, que possui detecção de 3.800fg/ μ L para esse mesmo alvo (INSTITUTO DE BIOLOGIA MOLECULAR DO PARANÁ, 2022).

Por fim, para a análise das amostras de pacientes e contatos, o cut-off de cada alvo foi definido com base no Cq do ponto de menor diluição da curva, demonstrados no quadro 3, com o intuito de determinar uma região onde os valores de Cq caracterizariam as amostras como positivas ou negativas. Amostras amplificadas até o cut-off em pelo menos um alvo foram consideradas positivas, amostras amplificadas após o cut-off em pelo menos um alvo foram consideradas inconclusivas e aquelas em que não houve sinal de amplificação foram consideradas como negativas (ALBUQUERQUE, 2022) (dados não publicados).

Quadro 3: Valores de cut-off para cada alvo.

Alvos	RNAse P	16SrRNA	RLEP 1	RLEP 2
Cut-off	39,5	35	36	35,5

Fonte: Elaborado pela autora.

6.2 Perfil clínico demográfico dos contatos e casos índices

Ao todo, foram coletadas amostras de 56 casos índices e 305 contatos. A população de casos índices é de 21 mulheres e 35 homens, sendo a grande maioria com mais de 35 anos de idade (n=43). Dentre os casos índices, 42 (75%) apresentaram a forma multibacilar (MB) e 14 (25%) a forma paucibacilar (PB) da doença.

No que se refere aos contatos, sendo todos com idade de até 15 anos de idade, houve leve predominância de participantes do sexo feminino (n=163), representando 53% do todo. Quanto à forma que os contatos se relacionavam com os casos índices, 61 (20%) eram intradomiciliares e 244 (80%) peridomiciliares. Ainda no que diz respeito à forma clínica da hanseníase, 89 (29%) eram contatos de pacientes que apresentavam a forma paucibacilar, enquanto 216 (71%) eram contatos de indivíduos com a forma multibacilar. Dentre os contatos intradomiciliares, ou seja, aqueles com maior convivência e contato mais próximo, 29% (18/61) eram contatos de casos índices com a forma PB da doença, e 71% (44/61) de casos com a forma MB.

6.3 Detecção molecular de *M. leprae* utilizando método qPCR-SYBR Green em amostras de contatos e casos índices.

6.3.1 Resultados de qPCR em amostras de casos índices

Inicialmente, foi definido que os resultados inconclusivos no teste de qPCR seriam considerados juntamente com os resultados positivos, visto a baixa quantidade de DNA do bacilo que esperava-se encontrar nas amostras de sangue.

Sendo assim, para os casos índices, o resultado foi positivo ou inconclusivo para 20 pacientes e negativo para 36, indicando uma frequência de positividade de aproximadamente 36%. Essa baixa frequência de positividade entre os casos índices não significa necessariamente que o método possui baixa sensibilidade, pois os bacilos de *M. leprae*, depois de instalada a infecção, tem tropismo pelas regiões periféricas do corpo, visto a preferência do bacilo por regiões mais frias, como a pele e extremidades, além do tropismo pelas células de Schwann, sendo a corrente sanguínea a via para disseminação para essas regiões onde ele causa sua patogenia, sendo, portanto, esperado uma baixa quantidade de bacilos para pacientes com a doença estabelecida e apresentando sinais clínicos (HASTINGS, 1968). Além disso, também é preciso considerar que esses pacientes já se encontravam em tratamento e, portanto, com a carga bacilar reduzida. A frequência de positividade entre os casos multibacilares foi de 33% e entre os casos paucibacilares foi de 43%, sendo que, dentre os 20 pacientes com resultados positivos ou inconclusivos, 70% (14/20) referiam-se a pacientes com a forma multibacilar.

Tabela 1: Associação de resultados de qPCR e a forma clínica dos casos índices

Casos índices	Multibacilar (MB)	Paucibacilar (PB)
qPCR positiva ou inconclusiva	14 (33%)	6 (43%)
qPCR negativa	28 (67%)	8 (57%)
Total	42 (100%)	14 (100%)

Fonte: Elaborado pela autora.

Assim como demonstrado em estudo realizado por Azevedo *et al.* (2016), a qPCR SYBR Green mostrou-se eficaz uma vez que permite o diagnóstico independente da forma

clínica da doença, ao contrário da baciloscopia que só apresenta detecção em casos MB. Além disso, quando comparada com a baciloscopia, essa técnica permite uma análise de um maior número de amostras em menos tempo. Para esse trabalho, diferente da pesquisa anteriormente citada, houve maior frequência de positividade entre os casos paucibacilares (aproximadamente 50%), o que pode ser justificado pelo baixo número amostral de casos índices. No entanto, não se trata de um achado negativo, uma vez que uma alta taxa de detecção entre casos PB comprova a eficiência da qPCR frente à baciloscopia, trazendo a possibilidade da redução na frequência de falsos-negativos.

6.3.2 Resultados de qPCR em amostras de contatos

O teste resultou em positivo ou inconclusivo para 106 contatos, sendo uma frequência de positividade de 35%, destes 18 eram amostras de sangue de contatos intradomiciliares e 88 eram de contatos peridomiciliares (Tabela 2). Verificou-se que a frequência de positividade para casos intra e peridomiciliar foram aproximadas, sendo 29,5% e 36%, respectivamente.

Tabela 2: Resultados de qPCR segundo o tipo de contato.

Contatos	Intradomiciliar	Peridomiciliar
qPCR positiva ou inconclusiva	18 (29,5%)	88 (36%)
qPCR negativa	43 (70,5%)	156 (64%)
Total	61	244

Fonte: Elaborado pela autora.

Quanto à forma clínica da doença nos pacientes os quais os contatos se relacionavam, 25 amostras de contatos de pacientes com a forma paucibacilar (n=89) e 81 amostras de contatos de casos com a forma multibacilar (n=216) apresentaram resultado positivo ou inconclusivo para o teste.

Tabela 3: Resultados de qPCR para os contatos, segundo a forma clínica dos casos índices.

Contatos	Paucibacilar	Multibacilar
qPCR positiva ou inconclusiva	25 (28%)	81 (37,5%)
qPCR negativa	64 (72%)	135 (62,5%)
Total	89	216

Fonte: Elaborado pela autora.

Observa-se que a maior frequência de positividade encontra-se entre os contatos de casos multibacilares (37,5%), corroborando com o estudo de Gama *et al.* (2018), o qual utilizou amostras de sangue e de esfregaço cutâneo do lóbulo da orelha de contatos próximos analisados por qPCR TaqMan, encontrando uma frequência de positividade de 27,87% para contatos de pacientes MB e de 19, 23% para contatos PB nos dois tipos de amostra. Portanto, este resultado está dentro do esperado visto que casos MB possuem uma maior carga bacilar, de forma que esses contatos estão mais expostos ao risco de desenvolver a doença quando comparado com os casos paucibacilares. Analisando os dados para os contatos, verifica-se a necessidade do acompanhamento desses indivíduos, onde 36% já apresenta DNA de *M. leprae* detectável em sua corrente sanguínea. Como proposto neste estudo, o objetivo baseia-se no diagnóstico precoce dessa doença, justificando a análise das amostras de sangue em contatos para a busca de bacilos antes que se instalem nas extremidades e gerem sinais clínicos que caracterizam estágios mais desenvolvidos da doença, como o aparecimento de lesões e o espessamento de nervos, a julgar pelo seu longo período de latência (SCOLLARD, 2017; BRASIL, 2022a).

7 CONCLUSÃO

Os resultados encontrados para a detecção molecular de *Mycobacterium leprae* utilizando SYBR Green apresentaram bons resultados quando aplicado com os alvos certos, principalmente para o alvo RLEP que apresentou 100% de especificidade, comprovando a aplicabilidade do método qPCR para a detecção de DNA de *M. leprae*.

Quando se trata da sensibilidade, verificou-se alta taxa de detecção para ambos os alvos estudados, apresentando resultados ainda melhores que o Kit comercial NAT Hans, já validado e inserido no SUS, mostrando que o uso do SYBR Green pode ser uma alternativa ao uso das sondas utilizadas no TaqMAN PCR, tornando a técnica mais acessível.

A análise de amostras de sangue mostrou-se promissora, pois além de ser uma amostra de mais fácil acesso, permite a investigação em indivíduos que não apresentam lesões suspeitas, o que viabiliza o diagnóstico precoce em contatos. Os resultados obtidos para a análise das amostras coletadas de contatos demonstraram o elevado risco destes para desenvolver a doença, não havendo distinção de maior risco para contatos PB ou MB. A baixa frequência de positividade entre os casos índices revela o esperado para pacientes em tratamento e com a doença bem estabelecida, visto que o maior número de bacilos encontram-se nos tecidos alvos.

Como limitação encontrada neste estudo, destaca-se que não foi possível estabelecer uma correlação de quantos contatos realmente chegaram a ser diagnosticados com Hanseníase dentre os participantes do estudo, visto que por conta da pandemia por COVID-19, vivenciada nos últimos dois anos, não foi possível acompanhá-los. Portanto, faz-se necessário estudos longitudinais e de continuidade utilizando o método qPCR-SYBR Green para melhor levantamento de dados sobre a frequência de positividade entre os contatos que foram diagnosticados para a doença e buscando confirmar a aplicabilidade no diagnóstico precoce.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, A. A. **Estabelecimento de métodos moleculares para detecção de *Mycobacterium leprae* como ferramenta de diagnóstico para hanseníase**. 2022. Tese (Doutorado) – Curso de Farmácia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2022.

AZEVEDO, M. C. S. *et al.* qPCR detection of *Mycobacterium leprae* in biopsies and slit skin smear of different leprosy clinical forms. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 21, p. 71-78, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9425481/>. Acesso: 15 jun. 2023.

BIOPUR, BRASIL. Biopur Kit Extração Mini Spin Plus. Instruções de uso. rev. 14. 2018. Disponível em: <https://www.biometrix.com.br/kit-de-extracao/biopur-dna/>. Acesso em 26 out. 2022.

BÖDDINGHAUS, B. *et al.* Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 8, p. 1751-1759, aug. 1990. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC268042/>. Acesso: 28 jun. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. Portaria nº 3.125, de 7 de outubro de 2010. Diretrizes para Vigilância, Atenção e Controle da Hanseníase. Brasília, 7 out. 2010. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2010/prt3125_07_10_2010.html. Acesso em: 24 out. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde. Portaria SCTIE/MS nº 67, de 7 de julho de 2022. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Hanseníase. Brasília, 7 jul. 2022a. Disponível em: https://www.gov.br/conitec/pt-br/midias/protocolos/20220818_pcdt_hanseniaze.pdf. Acesso em: 25 out. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico de Hanseníase, n. especial, jan. 2022b. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/especiais/2022/boletim-epidemiologico-de-hanseniaze--25-01-2022.pdf/view>. Acesso em: 24 out. 2022.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância e Doenças Transmissíveis. Guia prático sobre a Hanseníase, 2022c. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_pratico_hanseniaze.pdf. Acesso em: 26 out. 2022.

BRITTON, W. J.; LOCKWOOD, D. N. J. Leprosy. **The Lancet**, v. 363, n. 9416, p. 1209-1219, 10 abr. 2004. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(04\)15952-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(04)15952-7). Acesso em: 24 out. 2022.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Department of Health and Human Services. 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-time rRT-PCR Panel Primers and Probes. 2020. Disponível em: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/downloads/rt-pcr-panel-primer-probes.pdf>. Acesso em: 27 out. 2022

COLE, S. T. *et al.* Massive gene decay in the leprosy bacillus. **Nature**, v. 409, n. 6823, p. 1007–1011, 22 fev. 2001. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/35059006>. Acesso em: 25 out. 2022.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ). Fiocruz cria teste molecular para hanseníase inédito no Brasil. 2021. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/noticia/fiocruz-cria-teste-molecular-para-hanseniose-inedito-no-brasil>. Acesso em: 25 out. 2022.

GAMA, R. F. *et al.* High frequency of *M. leprae* DNA detection in asymptomatic household contacts. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, p. 153, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5879567/#CR18>. Acesso em: 15 jun. 2023.

HASTINGS, R. C. *et al.* Bacterial density in the skin in lepromatous leprosy as related to temperature. **Leprosy Review**, v. 39, n. 2, p. 71-74, 1968. Disponível em: <http://leprev.ilsil.br/pdfs/1968/v39n2/pdf/v39n2a04.pdf>. Acesso em: 23 jun. 2023.

INSTITUTO DE BIOLOGIA MOLECULAR DO PARANÁ (IBMP). Instrução Kit NAT Hanseníase. 2021. Disponível em: <https://www.ibmp.org.br/wp-content/uploads/2023/04/IU-IVD-006-04-NAT-Hans.pdf>. Acesso em: 13 jun. 2023.

KUBISTA, M. *et al.* The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p. 95-125, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.007>. Acesso em: 25 out. 2022.

MACIEIRA, S. Aspectos microbiológico do *Mycobacterium leprae*. 2000. Disponível em: http://hansen.bvs.ilsil.br/textoc/livros/OPROMOLLA_DILTOR_nocoas/PDF/aspecto_leprae.pdf. Acesso em: 24 out. 2022.

MARTINEZ, A. N. *et al.* Molecular Determination of *Mycobacterium leprae* Viability by Use of Real-Time PCR. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 7, p.2124-2130, 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19439537/>. Acesso em: 25 out. 2022.

MENDONÇA, V. A. *et al.* Imunologia da hanseníase. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 83, n. 4, ago. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0365-05962008000400010>. Acesso em: 17 jul. 2023.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Diretrizes para o diagnóstico, tratamento e prevenção da hanseníase. 2019. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/274127/9789290227076-por.pdf>. Acesso em: 25 out. 2022.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Global leprosy (Hansen disease) update, 2020: impact of COVID-19 on the global leprosy control. 2021a. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/who-wer9636-421-444>. Acesso em: 24 out. 2022.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Rumo à zero hanseníase: Estratégia Global de Hanseníase 2021-2030; p. 1–30, 2021b. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789290228509>. Acesso em: 24 out. 2022.

RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. Classification of Leprosy According to Immunity: A Five-group System. **International Journal of Leprosy**. v. 34, n. 3, p. 255-273, 1966. Disponível em: <http://ila.ilsil.br/pdfs/v34n3a03.pdf>. Acesso em: 24 out. 2022.

SALES, A. B. **Estudo das propriedades termodinâmicas do DNA via Coeficientes de Wavelets**. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Departamento de Física, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2017. Disponível em: https://www.repositorio.ufop.br/bitstream/123456789/10553/1/DISSERTA%C3%87%C3%83O_EstudoPropriedadesTermodin%C3%A2micas.pdf. Acesso em: 23 jun. 2023.

SCOLLARD, D. M. Pathogenesis and Pathology of Leprosy. **The International Textbook of Leprosy**, p. 1–26, 2017. Disponível em: <https://www.internationaltextbookofleprosy.org/chapter/pathology>. Acesso em: 24 out. 2022.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. Real - time PCR: understanding Ct. 2016. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Documents/PDFs/PG1503-PJ9169-CO019879-Re-brand-Real-Time-PCR-Understanding-Ct-Value-Americas-FHR.pdf>. Acesso em: 13 jun. 2023.

TRUMAN, R. W. *et al.* Enumeration of Mycobacterium leprae using real-time PCR. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 2, n. 11, 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18982056/>. Acesso em: 25 out. 2022.

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
CEARÁ/ PROPESQ

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

Título da Pesquisa: Detecção precoce de casos de hanseníase entre jovens abaixo de 15 anos de idade residentes em municípios de Alagoas e Itaitinga, CE.

Pesquisador: Aparecida Tiemi Nagao Dias

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 11709213.9.0000.5054

Instituição Proponente: Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 532.850

Data da Relatoria: 18/02/2014

Apresentação do Projeto:

o presente projeto visa realizar um estudo prospectivo a partir de contatos abaixo de 15 anos de idade, durante dois anos a partir do ingresso no projeto, com objetivo de se associar os parâmetros imunológicos e/ou moleculares com o risco de desenvolvimento da doença. A escolha dos municípios foi feita com base em apoio técnico e logístico oferecido pelos serviços de saúde locais.

Objetivo da Pesquisa:

Geral: Avaliar o risco de aquisição da doença entre contatos de portadores de hanseníase abaixo de 15 anos de idade através de parâmetros clínicos, imunológicos e moleculares diagnosticados nos últimos três anos em municípios de Alagoas e em Itaitinga, CE.

Específicos: Avaliar o perfil clínico e demográfico dos casos de hanseníase nos municípios diagnosticados nos últimos três anos nos municípios; Realizar exame dermato-neurológico nos contatos intradomiciliares abaixo de 15 anos de idade dos casos identificados; Avaliar a frequência de positividade de anticorpos séricos IgA, IgG e IgM anti-PGL1 entre os contatos e casos índices; Avaliar a frequência de positividade de anticorpos salivares IgA e IgM anti-PGL1 entre os contatos e casos índices; Avaliar a frequência de positividade de DNA de *Mycobacterium leprae* em amostras de swab nasal e de sangue dos contatos e casos índices; Avaliar a presença de

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1127

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-270

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

Fax: (85)3223-2903

E-mail: comepe@ufc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ/ PROPEAQ



Continuação do Parecer: 532.850

positividade para M. lepromatosis nas amostras positivas de PCR; Realizar seguimento clinico-laboratorial anual dos contatos durante dois anos; Associar os parâmetros laboratoriais com o desenvolvimento da doença.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Risco: desconforto das coletas de sangue da mucosa nasal.

Benefício: Os testes realizados poderão avaliar o risco de aquisição da doença entre os contatos de portadores de hanseníase.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um estudo prospectivo de coorte em um período de seguimento de dois anos após o ingresso no estudo com contatos de portadores de hanseníase com as formas clínicas paucibacilar ou multibacilar abaixo de 15 anos de idade notificados nos últimos três anos, cujos responsáveis consentam em que participem do estudo. Foram selecionados os municípios onde as equipes estarão devidamente capacitadas para realizar exames dermato-neurológico (com objetivo de se realizar busca ativa de hanseníase entre os contatos intradomiciliares abaixo de 15 anos de idade). Dentro desses critérios, foram eleitas quatro cidades em Alagoas, ou seja, Rio Largo, Santana de Ipanema, Arapiraca, onde o grau de endemidade é considerado alto ou hiperendêmico e uma cidade no Ceará, Itaitinga (hiperendêmico).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados adequadamente: carta de encaminhamento, folha de rosto, currículo do pesquisador, anuência dos pesquisadores, cronograma, orçamento, anuência dos municípios, refex O TCLE e termo de assentimento.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não se aplica.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1127

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-270

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

Fax: (85)3223-2903

E-mail: comepe@ufc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
CEARÁ/ PROPESQ



Continuação do Parecer: 532.850

FORTALEZA, 18 de Fevereiro de 2014

Assinador por:
FERNANDO ANTONIO FROTA BEZERRA
(Coordenador)

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1127

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-270

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

Fax: (85)3223-2903

E-mail: comepe@ufc.br

ANEXO B – TERMO DE CONSETIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM

DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Eu, _____, aceito que _____, menor sob minha responsabilidade, está sendo convidado para participar da pesquisa **Deteção precoce de casos de hanseníase entre jovens abaixo de 15 anos de idade através do auxílio de marcadores imunológicos e moleculares**, sobre análise de anticorpos no sangue e na saliva contra a bactéria causadora da hanseníase e verificar se ela está presente na saliva e no sangue. Esta análise será realizada uma vez por ano durante 3 anos. Este estudo é importante para quem mora com uma pessoa que tem hanseníase e vai ser importante para ver se ele (a) tem risco de desenvolver a doença. Aceito também responder a um questionário relacionado a ele (a), nossos familiares e ao paciente com quem moramos. Estou de acordo que no momento da coleta, ele (a) seja examinado (a) para se verificar se não tem nenhuma mancha suspeita. Serão coletados saliva (1 mL), sangue (2 tubos com 3 mL cada). Na coleta de sangue, ele (a) poderá sentir uma leve dor por causa da picada da agulha. Todos os procedimentos serão realizados por pessoas capacitadas.

Caso algum resultado esteja alterado, ele (a) será encaminhado (a) para o posto de saúde.

I. Quais os benefícios e riscos que terei se eu aceitar que ele (a) participe do estudo?

Como benefício, ele (a) terá oportunidade de ser acompanhado (a) durante 3 anos clínica e laboratorialmente para avaliar se ele (a) adquiriu ou não a doença. Com isto, ele (a) porá ajudar outras pessoas que se encontram nas mesmas condições do que ele (a). Durante o estudo, iremos provar se os testes laboratoriais ajudam ou não a detectar precocemente a doença. Se conseguirmos provar que há uma estreita associação entre a positividade dos parâmetros imunológicos e/ou moleculares e associação com o risco de desenvolvimento da hanseníase, será um grande benefício para o menor e para outros jovens e crianças.

Riscos da realização dos testes: Todos os procedimentos serão realizados por profissionais habilitados, com registros em seus respectivos conselhos e obedecerão as normas técnicas vigentes de coleta de amostras biológicas. Contudo alguns desconfortos poderão ser sentidos durante a coleta de sangue, dor leve no momento do procedimento de (garrote) e punção venosa poderá ser sentida. Garantimos que em nenhum momento haverá risco para do participante contaminar-se com qualquer doença.

II. Quando ele (a) não pode participar do estudo?

Não há contra-indicações para ele (a) participar do estudo

Nós, pesquisadores, garantimos que:

- ❖ Os resultados obtidos durante este estudo serão divulgados sob a forma de relatórios, resumos, publicações científicas e o grupo de pesquisa não divulgará a identidade dos participantes.
- ❖ Os dados dos participantes serão mantidos sob sigilo. No final da pesquisa ou mesmo durante a pesquisa, caso seja necessário, os participantes poderão ter acesso aos resultados individuais.
- ❖ É garantida a liberdade da retirada do consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento à Instituição.

- ❖ É garantido o direito de se manter atualizado sobre resultados parciais da pesquisa, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam de conhecimento dos pesquisadores.
- ❖ Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames laboratoriais. Não há compensação financeira relacionada à sua participação.
- ❖ A qualquer momento você poderá recusar a participação do menor sob sua responsabilidade.
- ❖ Você receberá uma via do TCLE, caso seja desejado.
- ❖ A entrevista será de aproximadamente 15 minutos e conterá 10 perguntas simples.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim sobre o estudo acima. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente que o menor sob minha responsabilidade participe deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

COM QUEM DEVO FALAR SE EU TIVER DÚVIDAS?

Caso tenha perguntas ou dúvidas gerais sobre esta pesquisa ou quaisquer queixas relacionadas à pesquisa, você poderá falar com a coordenadora do projeto (Profª Aparecida Tiemi Nagao-Dias, telefone 85-3366.8270 ou 85-999618435, Universidade Federal do Ceará – Rua Capitão Francisco Pedro, 1210).

Cidade		Data da assinatura do termo	
Nome do responsável			

		Impressão digital do responsável

Assinatura da pessoa que aplicou o termo	Assinatura de aceitação do responsável

ATENÇÃO: Se você tiver alguma consideração ou dúvida, sobre a sua participação na pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFC/PROPESQ, Rua Coronel Nunes de Melo, 1000 – Rodolfo Teófilo, fone: 3366-8344/46. (Horário: 08:00-12:00 horas de segunda a sexta-feira). O CEP/UFC/PROPESQ é a instância da Universidade Federal do Ceará responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos. Att., CEP/UFC/PROPESQ (85) 33668344/8346

ANEXO C – TERMO DE ASSENTIMENTO



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM

DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS

Termo de Assentimento para Sujeitos de 08 a 15 anos de idade completos

Título do estudo: Detecção precoce de casos de hanseníase entre jovens abaixo de 15 anos de idade através do auxílio de marcadores imunológicos e moleculares.

Eu, _____, aceito participar da pesquisa sobre análise de anticorpos no sangue e na saliva contra a bactéria causadora da hanseníase e verificar se ela está presente na saliva e no sangue. Esta análise será realizada anualmente por 3 anos. Este estudo é importante para quem mora com uma pessoa que tem hanseníase e vai ser importante para ver se tenho risco de desenvolver a doença. Meus responsáveis já estão informados sobre o conteúdo da pesquisa. Aceito também responder a um questionário relacionado a mim, meus familiares e ao paciente com quem moro. Estou de acordo que no momento da coleta, eu seja examinado para se verificar se não tenho nenhuma mancha suspeita e dormência. Serão coletados saliva (1 mL) e sangue (2 tubos com 3 mL cada). Na coleta de sangue, poderei sentir uma leve dor por causa da picada da agulha. Todos os procedimentos serão realizados por pessoas capacitadas.

Caso algum resultado esteja alterado, você será encaminhado para o posto de saúde.

I. Quais os benefícios e riscos que terei se eu aceitar participar do estudo?

Como benefício, você terá a oportunidade de ser acompanhado durante 3 anos clínica e laboratorialmente para avaliar se você adquiriu ou não a doença. Com isto, você poderá ajudar outras pessoas que se encontram nas mesmas condições do que você. Durante o estudo, iremos provar se os testes laboratoriais ajudam ou não a detectar precocemente a doença. Se conseguirmos provar que há uma estreita associação entre a positividade dos parâmetros imunológicos e/ou moleculares e associação com o risco de desenvolvimento da hanseníase, será um grande benefício para o menor e para outros jovens e crianças.

Riscos da realização dos testes: Todos os procedimentos serão realizados por profissionais habilitados, com registro em seus respectivos conselhos e obedecerão as normas técnicas vigentes de coleta de amostras biológicas. Contudo alguns desconfortos poderão ser sentidos durante a coleta de sangue, dor leve no momento do procedimento de (garrote) e punção venosa poderá ser sentida. Garantimos que em nenhum momento haverá risco para do participante contaminar-se com qualquer doença.

II. Quando não posso participar do estudo?

Não há contra-indicações para você participar do estudo

Nós, pesquisadores, garantimos que:

- ❖ Os resultados obtidos durante este estudo serão divulgados sob a forma de relatórios, resumos, publicações científicas e o grupo de pesquisa não divulgará a identidade dos participantes.
- ❖ Os dados dos participantes serão mantidos sob sigilo. No final da pesquisa ou mesmo durante a pesquisa, caso seja necessário, os participantes poderão ter acesso aos resultados individuais.
- ❖ É garantida a liberdade da retirada do consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento à Instituição.
- ❖ É garantido o direito de se manter atualizado sobre resultados parciais da pesquisa, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam de conhecimento dos pesquisadores.
- ❖ Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames laboratoriais. Não há compensação financeira relacionada à sua participação.
- ❖ Você é livre para decidir se participará ou não. Se você não quiser participar não vai ter nenhum problema e você continuará seu acompanhamento na sua Unidade de Saúde do mesmo modo. Se você

aceitar participar, você poderá voltar atrás e desistir de realizar as coletas das amostras sequenciais a qualquer momento.

- ❖ A qualquer momento você poderá recusar sua participação.
- ❖ Você receberá uma via do termo de assentimento, caso seja desejado.
- ❖ A entrevista será de aproximadamente 15 minutos e conterá 10 perguntas simples.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim sobre o estudo acima. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

COM QUEM DEVO FALAR SE EU TIVER DÚVIDAS?

Caso tenha perguntas ou dúvidas gerais sobre esta pesquisa ou quaisquer queixas relacionadas à pesquisa, você poderá falar com a coordenadora do projeto (Profª Aparecida Tiemi Nagao-Dias, telefone 85-3366.8270 ou 85-999618435, Universidade Federal do Ceará – Rua Capitão Francisco Pedro, 1210).

Cidade		Data do preenchimento	
Nome do participante			

	Impressão digital do participante

Assinatura de aceitação do participante		Impressão digital do responsável

		Impressão digital do responsável
Assinatura da pessoa que aplicou o termo	Assinatura de aceitação do responsável	

ATENÇÃO: Se você tiver alguma consideração ou dúvida, sobre a sua participação na pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFC/PROPESQ, Rua Coronel Nunes de Melo, 1000 – Rodolfo Teófilo, fone: 3366-8344/46. (Horário: 08:00-12:00 horas de segunda a sexta-feira). O CEP/UFC/PROPESQ é a instância da Universidade Federal do Ceará responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos. Att., CEP/UFC/PROPESQ (85) 33668344/8346

ANEXO D – PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA DO KIT EXTRAÇÃO MINI SPIN PLUS (BIOPUR, BRASIL)

- 1) Adicionar 25 μ L de Proteinase K e 200 μ L de amostra biológica (sangue, fluídos corporais ou *buffy coat* proveniente de 1mL de sangue) em um microtubo de centrifugação de 1,5 mL (não fornecido no kit).
- 2) Adicionar 200 μ L de Tampão de Lise S e homogeneizar vigorosamente em vórtex (10 a 20 segundos).
- 3) Incubar os microtubos a 56°C por 15 minutos.
- 4) Adicionar 210 μ L de Etanol (96-100%) e homogeneizar em vórtex.
- 5) Transferir toda a mistura para o Tubo Spin S. Centrifugar por 1 minuto a 11.000 x g. Se as amostras não passarem completamente pelo tubo-filtro, repetir o passo de centrifugação com uma velocidade maior (até 15.000 x g). Descartar o Tubo de Coleta com o filtrado.
- 6) Colocar o tubo-filtro sob um novo Tubo de Coleta e adicionar 500 μ L de Tampão de Lavagem SI. Centrifugar por 1 minuto a 11.000 x g. Descartar o Tubo de Coleta com o filtrado.
- 7) Colocar o tubo-filtro sob um novo Tubo de Coleta e adicionar 600 μ L de Tampão de Lavagem SII. Centrifugar por um minuto a 11.000 x g. Descartar somente o filtrado e reutilizar o Tubo de Coleta.
- 8) Colocar o tubo-filtro novamente sob o Tubo de Coleta e centrifugar por um minuto a 11.000 x g (o etanol residual é removido durante este passo).
- 9) Colocar o tubo-filtro em um Tubo de Eluição S e adicionar 200 μ L de Tampão de Eluição S previamente aquecido (56°C). Dispensar o tampão diretamente sobre a membrana de sílica. Incubar por 1 minuto à temperatura ambiente. Centrifugar por 1 minuto a 11.000 x g.