

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

AMANDA BERTÃO SANTOS

TESTE MOLECULAR PARA USO NA REDE DE SAÚDE PÚBLICA:
DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLO SIMPLIFICADO DE EXTRAÇÃO DE DNA
E OTIMIZAÇÃO DA qPCR EM PLATAFORMA PORTÁTIL PARA AUXÍLIO NO
DIAGNÓSTICO DE HANSENÍASE

CURITIBA

2023

AMANDA BERTÃO SANTOS

TESTE MOLECULAR PARA USO NA REDE DE SAÚDE PÚBLICA:
DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLO SIMPLIFICADO DE EXTRAÇÃO DE DNA
E OTIMIZAÇÃO DA qPCR EM PLATAFORMA PORTÁTIL PARA AUXÍLIO NO
DIAGNÓSTICO DE HANSENÍASE

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Área de Contração em Saúde Humana e Animal, Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Dr. Alexandre Dias Tavares Costa

Coorientadora: Dr^a. Fernanda Saloum de Neves Manta

CURITIBA

2023

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Santos, Amanda Bertão

Teste molecular para uso na rede de saúde pública: desenvolvimento de protocolo simplificado de extração de DNA e otimização da qPCR em plataforma portátil para auxílio no diagnóstico de hanseníase / Amanda Bertão Santos. – Curitiba, 2023.

1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador: Alexandre Dias Tavares Costa

Coorientador: Fernanda Saloum de Neves Manta

1. Diagnóstico molecular. 2. Hanseníase. 3. Saúde pública – Avaliação. 4. DNA - Análise. I. Universidade Federal do Paraná. II. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. III. Costa, Alexandre Dias Tavares. IV. Manta, Fernanda Saloum de Neves. V. Título.

Bibliotecário: Elias Barbosa da Silva CRB-9/1894



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA DE
BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA - 40001016036P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **AMANDA BERTÃO SANTOS** intitulada: **Teste molecular para uso na rede de saúde pública: Desenvolvimento de protocolo simplificado de extração de DNA e otimização da qPCR em plataforma portátil para auxílio no diagnóstico da hanseníase**, sob orientação do Prof. Dr. ALEXANDRE DIAS TAVARES COSTA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 31 de Julho de 2023.

Assinatura Eletrônica

01/08/2023 14:34:49.0

ALEXANDRE DIAS TAVARES COSTA

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

01/08/2023 15:05:58.0

LUIS GUSTAVO MORELLO

Avaliador Externo (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, INSTITUTO CARLOS CHAGAS, CURITIBA-PR,)

Assinatura Eletrônica

08/08/2023 11:45:39.0

CAROLINNE DE SALES MARQUES

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS)

Universidade Federal do Paraná- Centro Politécnico - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-990 - Tel: (41) 3361-3695 - E-mail: secretaria.pb@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 302207

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://siga.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 302207

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha
ancestralidade, raízes que fazem
parte de tudo o que sou.

AGRADECIMENTOS

Nesta dissertação de mestrado registro parte da minha especialização profissional que foi cercada de muita dedicação, persistência e amor pela pesquisa. No entanto, tantos outros aprendizados e conquistas foram possíveis nesses dois anos... Encerro esse ciclo com qualificações muito maiores das que almejava quando decidi percorrer esse caminho. Muitas pessoas foram fundamentais para tudo isso.

Agradeço a toda a minha família, mas em especial, a minha mãe Marilene, minha irmã Mariana e aos meus tios Marlene e Antônio, por sempre me apoiarem e encorajarem todos os meus sonhos. Essa conquista é nossa!

Ao Dr. Alexandre Costa, pela oportunidade de trabalhar com o que gosto, e poder contribuir com a ciência e a saúde pública em um Instituto que é referência. Obrigada por acreditar no meu trabalho! A nossa parceria foi um sucesso no lado profissional, mas não posso deixar de agradecer, também, os conselhos, a disposição em ajudar e comemorar questões pessoais.

À Dr^a. Fernanda Manta, por ter aceitado me coorientar neste trabalho. Nossas reuniões cercadas de muitos questionamentos foram fundamentais para o enriquecimento do projeto e para o meu crescimento profissional. Agradeço o acolhimento durante minhas idas ao IOC.

A equipe BiPOC, por ter me acolhido e ajudado de forma direta e indireta em muitos passos do projeto. Desejo sucesso e vida longa! Vou sentir falta.

Aos amigos, família que escolhi, Steffanie, Tuany, Luciane, Bruna, Nayara, Laryssa, Tainá, Lanne, Vinícius, Dan, Thomas, Miguel, Sabrina, Marcela, Esteffany, Guilherme e Rafael, agradeço do fundo do meu coração por todos os momentos e experiências que passamos juntos. Vou levar para sempre comigo! Me orgulho por cada um de vocês e desejo que o mundo seja generoso nos caminhos que escolherem. As amizades que construí foram a melhor parte desses dois anos.

Aos amigos de longa data Gabrielly, Amanda Pallottini, Caio, Mariana Otta, Mariana Parra e Eloiza, que mesmo longe em espaço físico se fizeram perto e presentes.

À Dona Alice, por me permitir morar no cantinho mais especial e bem localizado de Curitiba.

Às minhas colegas de apartamento Daniele e Camila pela paciência e cuidado.

Agradeço ao Instituto Carlos Chagas, ao Laboratório de Ciências e Tecnologias Aplicadas em Saúde, a Universidade Federal do Paraná e a CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

A hanseníase tem como principal método diagnóstico a análise clínica. Esta por sua vez carece em sensibilidade assim como os exames complementares. A técnica molecular de qPCR por ter elevada sensibilidade e especificidade é capaz de superar algumas das limitações inerentes ao diagnóstico da patologia. No entanto, por exigir investimentos em insumos e infraestrutura laboratorial, se restringe aos grandes centros. Esse cenário corrobora o subdiagnóstico e a negligência da doença principalmente em populações de vulnerabilidade social. O objetivo deste estudo foi otimizar as reações de qPCR utilizando oligonucleotídeos do primeiro kit nacional de diagnóstico molecular para hanseníase, em uma plataforma portátil (Q3-Plus), além de avaliar métodos minimamente invasivos para coleta de amostras e desenvolver um protocolo simplificado para extração de DNA que atenda ao conceito *point-of-care*. Na otimização das reações no Q3-Plus, foram estabelecidos parâmetros ópticos, *threshold* e *cutoff* para os alvos *16S rRNA* e RLEP do *M. leprae*, utilizando amostras de DNA sintético, DNA purificado de *M. leprae* e amostras clínicas pré-caracterizadas. A avaliação de técnicas minimamente invasivas de coleta foi realizada através de *tape-strip* e microagulhamento em regiões próximas ao nervo ulnar de voluntários saudáveis, com análise por qPCR para amplificação do alvo *18S rRNA* de mamíferos. Os resultados mostraram baixa recuperação de DNA. Portanto, optou-se por avaliar apenas as amostras de biópsia de pele no Q3-Plus pois são consideradas as mais sensíveis para o diagnóstico da hanseníase. Para a extração simplificada de DNA a partir de amostras de pele, foram testadas diferentes soluções de lise, empregando agentes caotrópicos como ureia, guanidina e hidróxido de amônio. A etapa de purificação foi realizada depositando-se o material lisado em cartões FTA e com avaliação de diferentes métodos de eluição. A avaliação final dos protocolos de extração foi realizada por qPCR para amplificação do alvo *18S rRNA* de mamíferos, utilizando pele suína como modelo comparativo. Entre as soluções avaliadas, observou-se menor dissolução do fragmento de pele nos protocolos com guanidina, enquanto a solução com ureia apresentou a melhor dissolução do fragmento de pele e menor valor de Cts, indicando maiores concentrações de DNA. Após determinar o melhor protocolo, a metodologia completa (extração simplificada + qPCR na plataforma portátil) foi avaliada em amostras clínicas de biópsia de pele pré-caracterizadas e comparadas com o equipamento padrão (Quantstudio-5). As reações otimizadas no Q3-Plus apresentaram eficiência de 131.06% para o alvo *16S rRNA* e 104.65% para RLEP, utilizando amostra e DNA purificado de *M. leprae*. Quanto à sensibilidade analítica, as reações no equipamento alcançaram 113.23 genomas-equivalentes/ μ L para o gene *16S rRNA* e 19.72 genomas-equivalentes/ μ L para RLEP. Os valores de sensibilidade do teste para a detecção de *M. leprae* foram de 80% e especificidade de 90.90% para as amostras extraídas pelo método comercial e analisadas na plataforma portátil. No entanto, quando as amostras extraídas pelo protocolo simplificado contendo solução de ureia foram avaliadas, observou-se uma sensibilidade de 53.84% nas reações do Q3-Plus e 58.33% nas reações do QS-5. Esses resultados sugerem possíveis problemas de qualidade na etapa de purificação do material genético durante a extração de DNA. Os resultados preliminares destacam a necessidade de otimizar ainda mais o protocolo de extração simplificado, mas também demonstram a aplicabilidade da plataforma portátil na detecção de *M. leprae* e no auxílio ao diagnóstico da hanseníase, especialmente em locais de vulnerabilidade social, distantes dos centros urbanos.

Palavras-chave: Diagnóstico molecular; hanseníase; *point-of-care*.

ABSTRACT

Leprosy diagnosis primarily relies on clinical analysis due to the absence of a diagnostic test considered a “gold standard”, primarily because of the wide variety of clinical forms the disease presents. However, both clinical analysis and existing complementary tests, such as direct methods like bacilloscopic and histopathology, and indirect methods like serology, suffer from a lack of sensitivity, especially in the paucibacillary (PB) form of the disease. Molecular techniques, particularly quantitative polymerase chain reaction (qPCR), have shown high sensitivity and specificity, addressing some of the limitations of leprosy diagnosis. Nevertheless, due to the requirements for expensive reagents, laboratory infrastructure, and controlled environments, molecular testing is often confined to larger centers. This scenario contributes to underdiagnosis and neglect of disease, particularly in socially vulnerable populations and remote regions. The primary objective of this study was optimize qPCR reactions using oligonucleotides from the first national kit for leprosy molecular diagnosis on a portable platform (Q3-Plus). Additionally, we aimed to evaluate minimally invasive sampling methods and develop a simplified DNA extraction protocol aligning with the point-of-care concept. In the optimization of Q3-Plus reactions, optical parameters, thresholds, and cutoff values were established for the *16S rRNA* and RLEP targets of *M. leprae* using synthetic DNA, purified *M. leprae* DNA, and pre-characterized clinical samples. The assessment of minimally invasive sampling techniques involved tape-stripping and micro-needling on regions near the ulnar nerve of healthy volunteers, with qPCR analysis targeting the *18S rRNA* mammalian gene. Results indicated low DNA recovery, leading to the decision to evaluate only skin biopsy samples in the Q3-Plus, as they are considered the most sensitive for leprosy diagnosis. For the simplified DNA extraction from skin samples, different lysis solutions were tested, employing chaotropic agents such as urea, guanidine, and ammonium hydroxide. The purification step involved depositing the lysed material on FTA cards, with various elution methods assessed. The final evaluation of extraction protocols was conducted via qPCR amplification of the *18S rRNA* mammalian target, using porcine skin as a comparative model. Among the evaluated solutions, guanidine-based protocols showed lower skin fragment dissolution, while the urea-based solution exhibited better skin fragment dissolution and lower Ct values, indicating higher DNA concentrations. After determining the best protocol, the complete methodology (simplified extraction & qPCR on the portable platform) was assessed on pre-characterized clinical skin biopsy samples and compared with the standard equipment (QuantStudio-5). The optimized Q3-Plus reactions showed an efficiency of 131.06% for the *16S rRNA* target and 104.65% for RLEP, using both sample and purified *M. leprae* DNA. Concerning analytical sensitivity, the Q3-Plus reactions achieved 113.23 genome equivalents/ μ L for the *16S rRNA* gene and 19.72 genome equivalents/ μ L for RLEP. The test's sensitivity for *M. leprae* detection was 80%, with a specificity of 90.90% for samples extracted using the commercial method and analyzed on the portable platform. However, when samples extracted using the simplified protocol with a urea solution were evaluated, a sensitivity of 53.84% in the Q3-Plus reactions and 58.33% in QS-5 reactions was observed. These results suggest potential issues with the quality of the genetic material purification during DNA extraction. The preliminary results emphasize the need for further optimization of the simplified extraction protocol. Nevertheless, they also demonstrate the applicability of the portable platform in *M. leprae* detection and leprosy diagnosis support, especially in socially vulnerable areas far from urban centers.

Keywords: Molecular diagnosis; leprosy; point-of-care.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO LITERÁRIA.....	16
2.1	HANSENÍASE	16
2.2	DIAGNÓSTICO: HANSENÍASE	21
2.3	EQUIPAMENTO PORTÁTIL: Q3-PLUS	23
3	OBJETIVOS	25
3.1	OBJETIVO GERAL.....	25
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4	HIPÓTESE DO TRABALHO	25
5	ABORDAGEM EXPERIMENTAL	26
5.1	ASPECTOS ÉTICOS DO PROJETO.....	26
5.2	AMOSTRA SINTÉTICA UTILIZADA PARA A OTIMIZAÇÃO DAS REAÇÕES NO EQUIPAMENTO PORTÁTIL: Q3-PLUS.....	26
5.3	CÉLULAS DE <i>MYCOBACTERIUM LEPRAE</i> UTILIZADAS PARA A OTIMIZAÇÃO DAS REAÇÕES NO EQUIPAMENTO PORTÁTIL: Q3-PLUS.....	26
5.4	DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS ÓPTICOS, <i>THRESHOLD</i> E <i>CUTOFF</i> NA OTIMIZAÇÃO DO EQUIPAMENTO PORTÁTIL: Q3-PLUS.....	27
5.5	CURVA PADRÃO E SENSIBILIDADE ANALÍTICA NOS EQUIPAMENTOS Q3-PLUS E QUANTSTUDIO 5.....	28
5.6	REPRODUTIBILIDADE E REPETIBILIDADE DAS REAÇÕES DE QPCR A PARTIR DO DNA SINTÉTICO NO EQUIPAMENTO PORTÁTIL	28
5.7	TÉCNICAS MINIMAMENTE INVASIVAS PARA A COLETA DE DNA DE PACIENTES SUSPEITOS DE HANSENÍASE.....	28
5.8	AMOSTRAS CLÍNICAS OBTIDAS DE PACIENTES COM SUSPEITA DE HANSENIASE OU OUTRAS DERMATOSES PARA A OTIMIZAÇÃO DO EQUIPAMENTO PORTÁTIL E AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA	30
5.9	EXTRAÇÃO DE DNA DE AMOSTRAS CLÍNICAS DE BIÓPSIA DE PELE..	31
5.10	SOLUÇÕES DE LISE AVALIADAS PARA A EXTRAÇÃO DE DNA	31
5.11	PREPARAÇÃO DA AMOSTRA CLÍNICA DE BIÓPSIA E APLICAÇÃO NO CARTÃO FTA MICRO ELUTE (WHATMAN®).....	32
5.12	PROTOCOLOS DE ELUIÇÃO DE DNA A PARTIR DA AMOSTRA EM FTA	32

5.13	CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS PARA A QPCR PARA DETECÇÃO DOS ALVOS DE <i>MYCOBACTERIUM LEPRAE</i> E CONTROLE INTERNO HUMANO	33
5.14	ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
6	RESULTADOS	35
6.1	OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS ÓPTICOS, <i>THRESHOLD</i> E <i>CUTOFF</i> PARA DETECÇÃO DE <i>MYCOBACTERIUM LEPRAE</i> NO EQUIPAMENTO PORTÁTIL	35
6.2	SENSIBILIDADE ANALÍTICA	37
6.3	REPRODUTIBILIDADE E REPETIBILIDADE NO EQUIPAMENTO PORTÁTIL	38
6.4	TÉCNICAS MINIMAMENTE INVASIVAS PARA A COLETA DE MATERIAL GENÉTICO.....	40
6.5	AVALIAÇÃO DA QPCR PORTÁTIL EM AMOSTRAS CLÍNICAS DE BIÓPSIA DE PELE EXTRAÍDAS PELO KIT COMERCIAL (QIAGEN)	41
6.6	ANÁLISE DOS PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO	47
7	DISCUSSÃO	60
8	CONCLUSÃO	69
	REFERÊNCIAS	70

1 INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença crônica e progressiva de distribuição mundial causada pelo *Mycobacterium leprae* (SASAKI et al., 2001). Apresenta predileção por nervos do sistema nervoso periférico e pele, entretanto demais órgãos também podem ser afetados e deformidades e diferentes graus de incapacidade física (IF) desencadeados por sua progressão. O diagnóstico precoce é essencial para a instituição do tratamento, controle da progressão clínica e transmissibilidade (STEINMANN et al., 2017). No entanto, por ser estabelecido principalmente de acordo com a clínica do paciente e informações epidemiológicas, é frequentemente tardio ou subdiagnosticado (URGESA et al., 2022; HENRY et al., 2016).

Em 2021, a incidência da doença reportada globalmente foi de 140.594 casos. Desses, 9.052 correspondem a crianças, o que evidencia a transmissão ativa e recente. Quanto ao estadiamento da doença, 8.492 pacientes foram classificados em grau de incapacidade física 2 (IF 2) o que corrobora o diagnóstico tardio (OMS, 2022; JÚNIOR et al., 2023). Nesse sentido, com o objetivo de se eliminar a hanseníase, a Organização Mundial da Saúde (OMS) apresentou o plano estratégico “Rumo a Hanseníase zero – Estratégia Global para a Hanseníase 2021-2030” no qual destaca os principais pilares para a eliminação da doença. Entre esses, determina o diagnóstico por meio da busca ativa, acompanhamento dos contactantes e quimioterapia preventiva (WHO, 2022).

A hanseníase possui um amplo espectro de formas clínicas, e devido a isso é frequentemente confundida com doenças dermatológicas, osteoarticulares, do sistema nervoso e outras (NEVES *et al.*, 2023; DHARMAWAN et al., 2022). Além disso, por não apresentar crescimento *in vitro*, a técnica de diagnóstico direto, por meio de cultura e isolamento não é factível (MACIEIRA, 2000). A inexistência de um teste padrão-ouro faz com que o diagnóstico seja estabelecido majoritariamente de forma clínica (WHO, 2022). Os exames complementares, como a histopatologia e baciloscopia que podem auxiliar o clínico apresentam variações na sensibilidade e dependem da *expertise* do profissional (BRASIL, 2022; FINE et al., 1986).

Nesse sentido, testes moleculares, em especial por meio da PCR em tempo real (qPCR), são sensíveis e específicos, o que contribui para a identificação precoce de pacientes suspeitos em diferentes patologias (MADAMET et al., 2022; RAMPAZZO

et al., 2022; YU et al., 2021). A qPCR se trata de um método já estabelecido em laboratórios clínicos e muito utilizado na pesquisa, porém sua implementação a campo, como nos casos de busca ativa, encontra limitações. A necessidade por insumos termolábeis e equipamentos robustos dificultam o acesso ao diagnóstico em regiões remotas e de baixa infraestrutura. Além disso, o método requer a extração previa de material genético, o que exige investimentos em kits comerciais onerosos (MANTA et al., 2020; ALI et al., 2017; WANG et al., 2016).

Recentemente a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) concedeu o registro do primeiro kit comercial nacional de qPCR para auxílio no diagnóstico da hanseníase, o kit NAT Hans (IBMP), desenvolvido na Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz-RJ) (MANTA et al., 2022). O kit apresenta como alvos os marcadores genéticos *16S rRNA* e RLEP do *M.leprae* e tem sensibilidade e especificidade de 91 e 100%, respectivamente. Além disso, apresenta o alvo *18S rRNA* humano como controle interno, assegurando em mais uma etapa o sucesso na extração de DNA. A implementação do teste molecular na rotina dos profissionais de saúde para a busca ativa de casos, pode favorecer a superação de limitações inerentes aos testes microscópicos diretos, histopatológicos e sorológicos, e alcançar uma maior faixa de detecção na forma clínica classificada como paucibacilar (PB) (BARBIERI et al., 2019).

Ainda que se tenha acesso a testes para a detecção molecular, o diagnóstico da hanseníase mantém como principal ferramenta o diagnóstico clínico. Isso se deve as variações nas formas clínicas, principalmente no que diz respeito aos casos multibacilares e paucibacilares, já que a sensibilidade analítica dos testes variam de acordo com a carga bacilar da infecção (BRASIL, 2022).

Nesse contexto, ferramentas que auxiliem na triagem de populações são importantes para a busca ativa de casos e para o diagnóstico precoce da hanseníase. Os testes de triagem possuem uma maior sensibilidade, ou seja, são capazes de detectar com uma maior precisão os casos positivos para a patologia de interesse. No entanto, são frequentemente associados a uma maior detecção de casos falso-positivos, e por isso, não devem ser classificados como testes diagnósticos. A positividade de uma amostra em um teste de triagem deve direcionar o paciente a um acompanhamento que possibilite a investigação por meio de outras técnicas que sejam capazes de estabelecer com acurácia seu diagnóstico, assim como é realizado para a hanseníase (WHO, 2020).

O conceito de “*point-of-care testing*” idealiza a aplicabilidade de testes, para o auxílio na triagem ou diagnóstico de patologias, que possam ser realizados de forma rápida e simplificada, por diferentes profissionais da área da saúde, em equipamentos de fácil operação, independentes da infraestrutura laboratorial e mais próximos do paciente (JUNG et al., 2015). A plataforma Q3-Plus, atende ao conceito *point-of-care*, por se tratar de um equipamento portátil e de fácil manuseio, capaz de realizar as mesmas análises que os termocicladores de qPCR padrões (Quantstudio-5 e ABI7500) (CEREDA et al., 2018).

Reações para a detecção de *Trypanosoma cruzi*, *Plasmodium* spp. e *Mycobacterium tuberculosis* apresentaram excelentes valores de eficiência após suas otimizações no equipamento portátil demonstrando a possibilidade da utilização do Q3-Plus na análise de reações para a detecção de patógenos de interesse em saúde pública (ALI et al., 2020; RAMPAZZO et al., 2019; CEREDA et al., 2018).

Segundo critérios estabelecidos pela WHO (2006) teste *point-of-care* deve ser acessível, sensível, específico, fácil de usar, rápido e robusto, sem equipamento e de fácil acesso ao usuário. Os esforços para o desenvolvimento desses dispositivos permanecem, no entanto, ainda não existem testes que atendam a todos esses princípios.

Com relação ao diagnóstico baseado nos testes de ácido nucleico (NAT) os maiores desafios correspondem a fase pré-analítica, de coleta e extração de material biológico. A necessidade por equipamentos e reagentes termolábeis e de alto custo que exigem de infraestrutura e controle da temperatura, bem como a correta destinação aos resíduos gerados nessas etapas, são as principais limitações para sua aplicabilidade em locais com escassez de recursos (ALI et al., 2017; DINEVA et al., 2007).

Neste estudo, buscou-se otimizar as reações de qPCR (kit NAT Hans – IBMP) no equipamento portátil Q3-Plus e desenvolver um protocolo simples de extração de DNA para *M.leprae* que possibilite a aplicação do teste de triagem para a hanseníase em locais remotos, permitindo a busca ativa de casos para o acompanhamento das autoridades de saúde responsáveis por populações carentes de assistência.

2 REVISÃO LITERÁRIA

2.1 HANSENÍASE

A hanseníase é uma doença infectocontagiosa, de caráter crônico e progressivo, causada pela bactéria intracelular obrigatória *Mycobacterium leprae* (HAN *et al.*, 2008). Apresenta tropismo por nervos periféricos e pele, entretanto demais órgãos podem ser acometidos. O período de incubação da doença geralmente é longo e variado, levando em média cinco anos para se manifestar. Sua transmissão ocorre por meio das vias respiratórias, e exige contato prolongado com o hanseniano que não esteja recebendo o tratamento. Fatores genéticos podem também determinar a susceptibilidade à infecção (MI *et al.*, 2020; SALES-MARQUES *et al.*, 2017; MIRA *et al.*, 2004). Quanto a distribuição da doença na população, estudos demonstram que está frequentemente associada a grupos desfavorecidos economicamente. Nesse sentido, acredita-se que o contato prolongado, favorecido pelo número de pessoas que reside junto ao hanseniano, bem como a falta de informação e educação básica no que diz respeito ao acesso a educação sanitária, contribuem para a transmissibilidade da doença (PESCARINI *et al.*, 2018; HENRY *et al.*, 2016).

O Brasil é o segundo país em números absolutos de casos de hanseníase no mundo, atrás somente da Índia. No ano de 2022 foram notificados 14.962 novos casos de hanseníase, destacando-se os 1.449 casos classificados como grau II, o que representa um atraso no diagnóstico. O estado do Maranhão foi o que apresentou a maior incidência (1.860 casos). Contudo, esses números podem não representar a realidade brasileira devido à subnotificação e negligência ao seu diagnóstico. Por representar um problema de saúde pública, a doença exige notificação compulsória ao Sistema de Informação de Agravos de Notificações (SINAN). O diagnóstico precoce é imprescindível para o tratamento, controle da progressão clínica e transmissibilidade (STEINMANN *et al.*, 2017). No entanto, é frequente a ocorrência de diagnósticos tardios ou subdiagnosticados, decorrentes da escassez de elementos específicos na avaliação clínica e informações epidemiológicas do paciente.

Alterações de sensibilidade, espessamento de nervos e presença de manchas na pele, são sinais frequentemente relacionados a clínica da doença. Deformidades e diferentes graus de incapacidade física (IF) podem ser desencadeados com sua progressão. Para a determinação dos graus de IF, critérios que avaliam olhos, mãos

e pés, quanto a força, sensibilidade, tempo de resposta à estímulo e alterações morfológicas são graduados de 0 a 2 (BRASIL, 2022). Estes auxiliam como um parâmetro para conhecimento de precocidade do diagnóstico e como estadiamento da doença e prognóstico.

A classificação utilizada na condução do tratamento a ser instituído e, como orientadora para as equipes de saúde quanto a atenção aos quadros inflamatórios (Reação tipo I e tipo II) e danos neurais, define os quadros como multibacilar (MB) ou paucibacilar (PB) de acordo com o número de lesões e baciloscopia (WHO, 1982 ;FINE et al.,1986). Nesse sentido, são classificados como MB aqueles casos que apresentam mais de cinco lesões e baciloscopia positiva, enquanto PB os que apresentam até cinco lesões e baciloscopia negativa. Além disso, o Ministério da Saúde adota a Classificação de Madri (1953) como guia para a determinação da forma clínica, sendo classificada em: Hanseníase tuberculoide, Hanseníase virchowiana, Hanseníase dimorfa, Hanseníase indeterminada e Hanseníase neural pura (neurítica primária) (FIGURA 1). A forma clínica se estabelece de acordo com a resposta imune do hospedeiro (RIDLEY; JOPLING, 1966).

FIGURA 1 - LESÕES CARACTERÍSTICAS DAS DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS DA HANSENÍASE



Lesões características das formas clínicas da hanseníase. (A) Hanseníase tuberculóide; (B) Hanseníase indeterminada; (C) Hanseníase virchowiana; (D) Hanseníase dimorfa; (E) Hanseníase neural. FONTE: Dermatology Atlas, 1999-2023.

Quanto as Reações do tipo I e tipo II relatadas com certa frequência em pacientes hansenianos em diferentes estágios, que vão desde antes do diagnóstico até após a conclusão do tratamento, também estão relacionadas com a resposta exacerbada do sistema imune do hospedeiro frente a infecção (FROES et al., 2022; SCOLLARD et al., 2006). A Reação tipo I, também denominada Reação Reversa, se estabelece devido a inflamação aguda causada pela ativação do sistema imunológico em resposta aos bacilos. Tanto pacientes PB quanto MB podem desenvolver. O quadro pode ter início mesmo antes do diagnóstico e do tratamento, durante a

poliquimioterapia (PQT-U) e até mesmo após a sua conclusão, sendo muitas vezes confundida como a recidiva da doença. No entanto, geralmente ocorre nos seis primeiros meses de tratamento. A clínica cursa com sinais característicos da inflamação: infiltração da lesão de pele, calor, eritema e edema, na maioria das vezes indolor. Em geral, regride em até seis meses, no entanto, sem acompanhamento, pode provocar lesões aos nervos e perda de função. Já a Reação do tipo II ocorre devido a elevada concentração de proteínas originárias da morte dos bacilos. Por estarem na circulação sanguínea, causam a reação imunológica a nível sistêmico. Como quadro clínico, o Eritema Nodoso Hansenico (ENH) está frequentemente associado (POLYCARPOU et al., 2017). O processo inflamatório intenso é responsável pela formação de nódulos subcutâneos vermelhos e dolorosos. Ocorre somente em pacientes classificados como MB. Por ser iniciado pela morte dos bacilos, acontece com maior frequência após o início da PQT-U, ou até mesmo, após a conclusão do tratamento.

Apesar da disponibilidade de exames para o auxílio no diagnóstico da hanseníase, o exame clínico ainda é a principal ferramenta utilizada na Atenção Primária à Saúde (APS). Sabendo disso, o Ministério da Saúde estabeleceu critérios definidos como “sinais cardinais da hanseníase” para assistência aos profissionais de saúde frente a casos suspeitos. Os sinais cardinais são: Lesão na pele com alteração de sensibilidade; Espessamento de nervo periférico e alteração sensitiva, motora ou autossômica; E positividade em baciloscopia realizada em amostra de esfregaço intradérmico ou biópsia de pele. A presença de um ou mais desses sinais define o diagnóstico (DHARMAWAN et al., 2022; BERNARDES-FILHO et al., 2021).

A hanseníase é uma doença tratável e curável. Seu tratamento, independente da classificação do caso (PB ou MB), se dá pela associação dos fármacos rifampicina, dapsona e clofazimina, sendo denominada poliquimioterapia única (PQT-U). A sua duração varia de acordo com a classificação, sendo de seis meses para os casos PB e de até 12 meses para MB. A duração não deve ultrapassar os 12 meses, e em caso de persistência dos sintomas associados a hanseníase, deve ser investigada a resistência medicamentosa (BRASIL, 2022). É instituído e disponibilizado no Sistema Único de Saúde (SUS), o qual presta assistência ao paciente e seus contactantes, desde o diagnóstico e tratamento até o acompanhamento psicossocial.

Quando o clínico encontra dificuldade no estabelecimento do diagnóstico por meio do exame físico, pode recorrer aos laboratoriais para auxílio, como: baciloscopia,

histopatologia, ultrassonografia de nervos periféricos e eletroneuromiograma. No entanto, é importante destacar que esses exames também apresentam limitações no que diz respeito a técnica, ao tipo de amostra, e a *expertise* do profissional. Para a baciloscopia e histopatologia, por exemplo, é necessária a coleta de biópsia de pele, procedimento invasivo, cirúrgico, que requer infraestrutura hospitalar e profissional qualificado. Além disso, durante a técnica é essencial que o profissional recupere as camadas da derme até a hipoderme, devido ao local de predileção do microrganismo (BRASIL, 2022). A microscopia direta é especialmente comprometida nos casos PB, devido a menor carga bacteriana, o que afeta a sensibilidade do teste. Já a ultrassonografia de nervos periféricos e o eletroneuromiograma são exames que auxiliam especialmente em quadros clínicos com comprometimento do sistema nervoso ou pele, pois possibilitam a visualização de alterações estruturais na epiderme e derme e espessamento de nervos, no caso da ultrassonografia, e resposta a estímulos nervosos ou neurocondução, por meio do eletromiograma (GARBINO et al., 2003).

Há disponibilidade de testes sorológicos desenvolvidos com base no antígeno glicolípido-fenólico 1 (PGL-1) da parede celular do *M. leprae* para a detecção de anticorpos IgM e IgG anti PGL-1. Esses testes podem utilizar como técnicas a hemaglutinação passiva, *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) e a aglutinação com partícula de gelatina (MLPA). Existem também os testes rápidos como o *ML flow* e *ML dipstick* (BÜHRER et al., 1998; BÜHRER-SÉKULA et al., 2003). No entanto, testes baseados na detecção de anticorpos apresentam limitações para aplicação em regiões endêmicas já que indivíduos saudáveis podem apresentar alguma titulação para anticorpos frente ao antígeno, e não apresentarem a infecção, enquanto indivíduos com baixa carga bacteriana (PB) podem resultar em testes falso-negativos. Sendo assim, o Ministério da Saúde recomenda que não sejam utilizados como único método diagnóstico (BRASIL, 2022).

A fim de se contornar alguma das limitações no diagnóstico da hanseníase, recentemente foi desenvolvido e aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) o primeiro kit comercial produzido no Brasil para a detecção molecular por meio da qPCR de *M. leprae* (MANTA et al., 2022). O kit NAT Hans foi padronizado e validado com amostras de biópsias de pele de pacientes com suspeita de hanseníase e que tiveram desfecho final de hanseníase ou outras dermatoses e, apresentou sensibilidade de 91% e especificidade de 100% sendo capaz de detectar

os marcadores *16S rRNA* e RLEP do patógeno além do marcador *18S rRNA* de mamífero estabelecido como controle interno. Ainda assim, devido a particularidades com relação a forma clínica e carga bacteriana das infecções por *M. leprae*, o diagnóstico molecular pode apresentar variações na sensibilidade analítica (MANTA et al., 2020; BARBIERI et al., 2019). Nesse sentido, embora seja amplamente empregado na detecção de diversos patógenos, por se tratar de uma técnica de elevada sensibilidade e especificidade, sua aplicabilidade ainda encontra muitas barreiras.

As limitações estão relacionadas tanto a fisiopatologia da doença quanto a infraestrutura necessária para a realização de exames complementares que contribuam para o seu diagnóstico. No que diz respeito a fase pré-analítica, a natureza do material biológico, a técnica utilizada na coleta, seu armazenamento e transporte são passos importantes que podem interferir na sensibilidade analítica do exame complementar (MANTA et al., 2020). A exigência por insumos termolábeis e equipamentos robustos também prejudicam a aplicabilidade dos métodos escolhidos na fase analítica. E por último, se tem a complexidade da fase pós-analítica em unir os achados clínicos aos dos exames complementares para a exatidão do diagnóstico.

Outras limitações como a falta de investimentos em estudos, inovações e discussões que favoreçam o acesso a informações e que fomentem o conhecimento e a quebra do estigma que a doença traz desde a antiguidade dificultam a investigação, identificação, e acompanhamento dos casos. Essas circunstâncias impossibilitam que ações ligadas a prevenção e interrupção da cadeia de transmissão, visando erradicar a doença, sejam estabelecidas.

2.2 DIAGNÓSTICO: HANSENÍASE

A variação nas formas clínicas encontradas na hanseníase é uma das limitações que envolve a inexistência e a dificuldade de se estabelecer um teste diagnóstico “padrão-ouro”. Ainda hoje, o diagnóstico clínico, ou seja, baseado em sinais e sintomas do paciente, é o método majoritariamente empregado (BRASIL, 2022). Esse fato faz com que em muitos dos casos a doença seja subdiagnosticada e negligenciada. Além disso, por apresentar um espectro de formas e sinais clínicos é comumente confundida com dermatopatias, neuropatias, osteopatias, entre outras (NEVES et al., 2023).

Testes microscópicos diretos como a baciloscopia e a histopatologia são frequentemente utilizados como exames complementares, no entanto, a sensibilidade analítica é variável, e geralmente baixa nos casos paucibacilares (DINIZ; MACIEL, 2018). Nesses exames, é exigida uma maior *expertise* do profissional responsável pela leitura e de uma excelente qualidade de amostra capaz de favorecer a visualização do bacilo. A biópsia de pele ou nervo, e o raspado intradérmico são frequentemente requeridos como amostra de eleição para esses exames (BRASIL, 2022; MARTINEZ et al., 2014).

Outra possibilidade de auxílio para o diagnóstico clínico são os métodos sorológicos indiretos baseados na detecção de anticorpos IgM e IgG. Geralmente utilizam como antígeno o glicolípido-fenólico 1 (PGL-1) da parede celular do *M. leprae*. Apresentam perda de sensibilidade especialmente na detecção de casos PB em que se tem a menor produção de células de memória e, perda da especificidade analítica nas regiões endêmicas para a doença. Sabe-se que a positividade em um teste sorológico não indica necessariamente a doença ativa ou em curso. O teste comercial *ML flow*, desenvolvido por BUHRER-SEKULA et al. (2003), apresentou 97.4% de sensibilidade de detecção dos casos MB e 40% para os casos PB, já a especificidade do teste foi de 90.2%, valores que interferem na acurácia do teste. No entanto, os autores alertam para que o seu uso não seja aplicado como diagnóstico ou como método de triagem em populações desconhecidas ou endêmicas para a hanseníase.

Estudos com técnicas de proteômica e transcriptômica, envolvendo a produção de citocinas e biomarcadores relacionados ao desenvolvimento da hanseníase, estão em ascensão, mas ainda são iniciais e complexos já que a fisiopatologia da doença envolve uma série de células e respostas imunes (VAN HOOIJ; GELUK, 2021).

Por apresentarem elevada sensibilidade e especificidade os testes moleculares são empregados para o auxílio do diagnóstico da hanseníase. Apesar de também demonstrarem variações nesses indicadores, devido as formas clínicas da doença, favorecem principalmente a detecção dos casos paucibacilares (BARBIERI et al., 2019). No entanto, a qPCR ainda é um teste de elevado custo que exige de infraestrutura laboratorial, com equipamentos onerosos e reagentes termolábeis, além de profissional capacitado. Trata-se de um teste sensível, que depende da qualidade nas diferentes fases do processo (MANTA et al., 2020).

Nesse sentido, embora esteja disponível o primeiro kit molecular nacional para detecção de *M.leprae* (kit NAT Hans – IBMP)(MANTA et al., 2022), limitações quanto a sua aplicabilidade em locais de vulnerabilidade social, carentes em infraestrutura, dificultam o acesso à tecnologia. A necessidade pela descentralização e a universalização desse teste é o que fomenta as metodologias *poin-of-care*.

2.3 EQUIPAMENTO PORTÁTIL: Q3-PLUS

O conceito *lab-on-a-clip* (LOC) possibilita progressivamente a aplicabilidade de testes diagnósticos para além da estrutura física laboratorial, isso porque envolve o desenvolvimento de equipamentos miniaturizados capazes de realizar análises que até então dependiam de equipamentos robustos, uma série de etapas de processamento e manipulação. A tecnologia possibilita que volumes reduzidos de amostras e reagentes sejam empregados nas técnicas, e que etapas de processamento sejam simplificadas, reduzindo tempo e custos inerentes a metodologia aplicada. A partir desse conceito, tem-se a idealização de *point-of-care testing* (PoCT) que baseia-se na aplicação de “testes no ponto de cuidado”, próximo ao paciente, e independente da infraestrutura laboratorial (JUNG et al., 2015). Ambos os conceitos e suas aplicações favorecem a democratização dos testes diagnósticos e acesso a saúde às populações em situação de vazio assistencial.

Nesse contexto, foi desenvolvido o Q3-Plus (STMicroeletronics, Itália), um termociclador portátil empregado no uso de técnicas de biologia molecular para amplificação de material genético (FIGURA 2). O nome “Q3” sintetiza três características do equipamento “*quick, quantitative e qualitative*”. É um equipamento que atende ao conceito LOC já que apresenta dimensões reduzidas, pesa aproximadamente 300 g, e torna possível que as reações moleculares aconteçam no interior de poços dispostos em um chip de menos de 4 g. De acordo com o chip e os protocolos empregados, as reações podem apresentar até 5 µL de volume final. Além disso, possibilita a realização de qPCR *multiplex* com canais de leitura para até quatro fluoróforos (CEREDA et al., 2018). Alguns protocolos já foram estabelecidos para seu uso na detecção de material genético de patógenos de interesse em saúde pública (ALI et al., 2019; RAMPAZZO et al., 2019; BIAVA et al., 2018; ZAHRA et al., 2016). A

plataforma Q3-Plus demonstrou aplicabilidade para realização de testes que até então dependiam de equipamentos robustos.

FIGURA 2 – TERMOCICLADOR PORTÁTIL PARA qPCR Q3-PLUS



Pequenas dimensões (7 x 14 x 8,5 cm) do termociclador portátil q3-Plus e do chip com seis poços para a realização de ensaios de qPCR aplicáveis no conceito *point-of-care*. FONTE: Imagem cedida por Tuany Rodrigues (2023).

O desenvolvimento de metodologia de coleta minimamente invasiva, que seja capaz de substituir a biópsia de pele, aliada à extração de material genético de forma simplificada, sugere a aplicabilidade da técnica de diagnóstico em áreas remotas por não requerer de uma completa infraestrutura hospitalar e laboratorial, o que possibilita a busca ativa e acesso a populações.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma nova metodologia para a triagem por meio molecular, englobando a extração simplificada de DNA e a reação qPCR em equipamento portátil, para auxílio no diagnóstico de hanseníase diretamente no ponto de atendimento ou em locais com pouca infraestrutura.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar a reação para detecção dos alvos *16S rRNA*, RLEP de *M. leprae* e *18S rRNA* como controle interno por meio do kit comercial NAT Hanseníase (IBMP), utilizando como amostras o controle positivo do kit (gBlock), DNA extraído de 10^6 células/ μ L de *M. leprae*, e amostras de conveniência, no equipamento de qPCR portátil Q3-Plus;
- Avaliar técnicas de coleta de material genético minimamente invasivas (*Tape-strip* e microagulhamento) para auxílio no diagnóstico de hanseníase;
- Avaliar diferentes soluções de lise e desenvolver método simplificado de extração de material genético a partir de biópsia de pele;
- Avaliar a solução tecnológica completa escolhida (extração de DNA + qPCR portátil) para detecção de *M. leprae* por meio de amostras clínicas pareadas;
- Avaliar a sensibilidade, especificidade e acurácia do teste NAT Hans por meio da plataforma portátil Q3-Plus.

4 HIPÓTESE DO TRABALHO

Possibilidade do desenvolvimento de uma tecnologia portátil de diagnóstico molecular para auxílio do diagnóstico da hanseníase em regiões remotas.

5 ABORDAGEM EXPERIMENTAL

5.1 ASPECTOS ÉTICOS DO PROJETO

O presente projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto Oswaldo Cruz CAAE: 52565521.2.0000.5248, número: 5.131.588 - 26/11/2021. Os pacientes suspeitos de hanseníase atendidos pelo Ambulatório Souza Araújo (ASA) do Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz – RJ informaram por escrito o consentimento em participar do projeto. Caso menor de idade, o consentimento formal por escrito foi obtido do responsável pelo paciente. A seleção das amostras se deu de acordo com a ocorrência de casos atendidos no ambulatório.

5.2 AMOSTRA SINTÉTICA UTILIZADA PARA A OTIMIZAÇÃO DAS REAÇÕES NO EQUIPAMENTO PORTÁTIL: Q3-PLUS

O DNA sintético de fita dupla (gBlock, IDT, EUA) contendo as sequências dos marcadores genômicos do *Mycobacterium leprae* (16S *rRNA* e RLEP) e o marcador genômico humano (18S *rRNA*) foi utilizado para a otimização das reações de qPCR no equipamento portátil (Q3-Plus). De forma pareada as avaliações também foram realizadas no equipamento padrão (Quantstudio 5 – QS-5). O DNA sintético liofilizado foi constituído a 10 fg/ μ L (correspondente a 10^4 cópias/ μ L). Para a obtenção da amostra a 10^5 cópias/ μ L, o gBlock foi amplificado por qPCR, e seu produto purificado por meio do kit QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Alemanha). A concentração foi definida pela interpolação dos valores de Ct na curva padrão. Quando necessário, as amostras foram diluídas em Tris-EDTA (TE) (pH 8.0) para as análises de curva padrão.

5.3 CÉLULAS DE *MYCOBACTERIUM LEPRAE* UTILIZADAS PARA A OTIMIZAÇÃO DAS REAÇÕES NO EQUIPAMENTO PORTÁTIL: Q3-PLUS

As células de *M. leprae* na concentração de 10^6 células/ μ L obtidas de coxins plantares de camundongos pelados foram gentilmente cedidas pelo Dr. Milton Moraes, do Laboratório de Hanseníase do Instituto Oswaldo Cruz (IOC, FIOCRUZ-RJ), sob

aprovação do Comitê de Bem-Estar Animal do IOC/Fiocruz RJ. As células foram diluídas sob o fator de diluição 1:10 em Tris-EDTA (TE) (pH 8.0) para a realização das análises de curva padrão.

5.4 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS ÓPTICOS, *THRESHOLD* E *CUTOFF* NA OTIMIZAÇÃO DO EQUIPAMENTO PORTÁTIL: Q3-PLUS

Para a determinação dos parâmetros ópticos correspondentes às leituras pelos canais FAM, VIC e ROX, no equipamento Q3-Plus, diferentes valores de tempo de exposição, ganho e intensidade de luz foram avaliados (TABELA 1). As alterações buscavam melhorar a sensibilidade das reações, e uma boa amplitude de fluorescência. Para isso, diferentes concentrações (10^4 – 10^0 cópias/ μ L) do DNA sintético foram avaliadas por meio da qPCR na plataforma portátil, e por meio da eficiência da reação e característica da curva de amplificação os parâmetros foram avaliados.

A linha de base (*baseline*) foi definida automaticamente pelo software do instrumento (Q3-Plus V2 Suite, versão 4.0, ST Microelectronics). Já o *threshold* para cada um dos alvos foi definido pelo operador manualmente por meio da observação de padrões de amplitude de fluorescência e imagens captadas pelo software durante os ciclos das reações com diferentes concentrações de DNA sintético, de DNA purificado de *M. leprae*, de amostras clínicas pré-caracterizadas, bem como dos controles negativos (FIGURA 3).

O estabelecimento do valor de Ct para o *cutoff* foi realizado na última etapa do estudo, após as análises de dois grupos de amostras clínicas pré-caracterizadas: o primeiro foi considerado “padrão” por se tratar de amostras de biópsias de pele extraídas por meio de kit comercial padronizado; e o segundo correspondeu a amostras extraídas pelo protocolo desenvolvido no presente estudo. Para definir o *cutoff*, foi realizada a análise de Bland-Altman e os valores fornecidos para os alvos pela variação média de Cts, obtidos pelas análises em diferente equipamentos, foram somados aos valores já estabelecidos em estudos prévios que desenvolveram o kit NAT Hans e seu emprego no diagnóstico molecular da hanseníase.

5.5 CURVA PADRÃO E SENSIBILIDADE ANALÍTICA NOS EQUIPAMENTOS Q3-PLUS E QUANTSTUDIO 5

A eficiência e a determinação do limite de detecção da reação de qPCR no instrumento portátil Q3-Plus foram obtidas por meio de uma curva padrão com diluições em escala logarítmica a partir do DNA sintético ou DNA purificado de *M. leprae* (referido como genomas equivalentes). O cálculo da eficiência para as reações se deu pela substituição do valor do coeficiente de inclinação da reta (*slope*) na fórmula da eficiência ($E = (10^{-1/\text{slope}} - 1) * 100$), segundo o MIQE Guidelines (BUSTIN et al., 2009).

O número de cópias de genomas equivalentes foi estimado pela interpolação dos valores de Ct obtidos com as análises da amostra DNA purificado de *M. leprae* na equação estabelecida após a regressão linear da curva realizada com o DNA sintético, considerando as concentrações conhecidas e o número de cópias (10 fg/ μL equivalente a 10^4 cópias/ μL do DNA sintético). Para a análise de sensibilidade analítica da reação, foram considerados sete pontos de diluição, com um número de réplicas maior (nove ou dez) para as menores concentrações (BURD, 2010).

5.6 REPRODUTIBILIDADE E REPETIBILIDADE DAS REAÇÕES DE QPCR A PARTIR DO DNA SINTÉTICO NO EQUIPAMENTO PORTÁTIL

A reprodutibilidade e repetibilidade das reações foram realizadas por três operadores independentes durante três dias consecutivos para as concentrações 10^4 – 10^0 cópias/ μL , e em seguida, durante três dias consecutivos os mesmos operadores realizaram três reações com as menores concentrações 10^1 - 10^0 cópias/ μL . Essa divisão ocorreu devido a limitação inerente ao número de reações que são capazes de ser analisadas por chip (seis poços). Para cada uma das réplicas uma nova diluição era realizada utilizando o DNA sintético como amostra e TE (pH 8.0) como diluente (BURD, 2010).

5.7 TÉCNICAS MINIMAMENTE INVASIVAS PARA A COLETA DE DNA DE PACIENTES SUSPEITOS DE HANSENÍASE

Com o intuito de se estabelecer técnica de coleta minimamente invasiva foram analisadas as coletas por *tape-strip* (TASLIMI et al., 2017) e por microagulhamento (SINGH; YADAV, 2016). Para isso, fitas adesivas de três marcas foram selecionadas, sendo elas: D-Squame (DS), Sebutape (ST) e NexCare (NC). Para as coletas, inicialmente as fitas foram expostas a radiação ultravioleta (UV) durante 15 minutos. Em seguida, após a assepsia da pele de voluntários saudáveis com álcool 70%, as fitas eram posicionadas em local de predileção do *M. leprae* (região próxima ao nervo ulnar), e uma pressão era realizada por equipamento comercial *D-Squame Pressure Instrument* (CuDerm, Dallas, TX) durante cinco segundos. Cada fita foi aplicada de cinco a dez vezes na mesma região. Posteriormente, foram fragmentadas com auxílio de pinça e tesoura estéreis e armazenadas em microtubo de 1.5 mL até que a extração fosse realizada.

A extração de material genético foi realizada a partir do kit comercial DNAeasy Blood and Tissue® (Qiagen, Alemanha), de acordo com as recomendações do fabricante, e também por protocolo modificado, com alteração do tampão de lise do kit para solução de guanidina (6M) descrita por ALI et al. (2020).

As análises prosseguiram por meio da qPCR para amplificação do gene *18S rRNA* ou *RPP30*. Por se tratar de um método quantitativo, por meio da qPCR é possível estimar a concentração do alvo na amostra analisada. Essa estimativa se dá pela visualização do valor de Ct na amostra avaliada, ou seja, espera-se que uma amostra que tenha uma alta concentração do alvo de interesse necessite de menos ciclos de amplificação para atingir o limiar de fluorescência (*threshold*). Sendo assim, uma amostra com alta concentração do alvo terá um valor de Ct “menor/anterior” ao valor de Ct de uma amostra com baixa concentração do mesmo alvo (ARYA et al., 2005).

Durante as análises foi utilizado como controle negativo a fita estéril da marca correspondente. Para a eliminação das amplificações inespecíficas de DNA residual nas fitas “estéreis” foi utilizada solução de brometo de etídio monoazida (EMA) e a técnica de fotoativação no tratamento da mistura de reação para qPCR e nas fitas adesivas, segundo PATEL et al. (2012).

Já as avaliações das coletas por meio do microagulhamento foram realizadas com o auxílio de instrumento de uso dermatológico *DermaRoller*, com microagulhas de 1.0 mm e 3.0 mm. Antes da aplicação, realizou-se a assepsia da pele de voluntários saudáveis com álcool 70%, e em seguida, o equipamento foi posicionado em local de

predileção do *M. leprae*, regiões próximas ao nervo ulnar, e por meio de movimentos de rolamento durante cinco vezes em diferentes direções realizava-se o microagulhamento da pele. O exsudato foi coletado com o auxílio de *swab* estéril, e armazenado em microtubo de 1.5 mL até que a extração fosse realizada. Para as avaliações foi realizada a técnica de qPCR para amplificação dos genes *18S rRNA* e *RPP30* de mamíferos (MANTA et al., 2020; RAMPAZZO et al., 2019).

Para o auxílio na coleta por meio das fitas adesivas, foi realizada a modelagem de um equipamento aplicador de pressão similar ao *D-500* no software Blender versão 2.93.4 (baixado de <https://www.blender.org/>). A preparação da peça foi realizada no software Ultimaker Cura versão 4.11.0 (baixado de <https://ultimaker.com/software/ultimaker-cura>) e então a impressão foi concluída na impressora 3D Ender-3 Pro Series 3D Printer (Ender®).

5.8 AMOSTRAS CLÍNICAS OBTIDAS DE PACIENTES COM SUSPEITA DE HANSENIASE OU OUTRAS DERMATOSES PARA A OTIMIZAÇÃO DO EQUIPAMENTO PORTÁTIL E AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA

Os pacientes com hanseníase e suspeitos de outras dermatoses (OD) foram atendidos no Ambulatório Souza Araújo da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz - Rio de Janeiro, Brasil). As coletas das biópsias de pele foram realizadas por *punch* cirúrgico de 3 mm e armazenadas em etanol 70% até o processamento da amostra. Após a avaliação clínica as amostras foram caracterizadas de acordo com os protocolos estabelecidos, os quais incluíram avaliação clínica, histopatológica, baciloscopia e qPCR *singleplex* (LAHAN). Os casos foram classificadas como multibacilares (MB), paucibacilares (PB) ou outras dermatoses (OD) de acordo com as diretrizes da OMS (WHO, 2018).

O presente estudo utilizou 66 amostras clínicas de biópsia de pele, consistindo em 27 amostras de pacientes com diagnóstico final de hanseníase multibacilar, 14 de hanseníase paucibacilar e 25 de pacientes com outras dermatoses. A partir destas, o DNA extraído de 32 biópsias de pele (10 MB, 10 PB, 12 OD), por meio de kit comercial DNAeasy Blood and Tissue® (Qiagen, Alemanha), foi utilizado para otimização da qPCR no equipamento Q3-Plus. As demais 34 amostras de biópsia de pele (17 MB, 4

PB e 13 OD) foram utilizadas para a avaliação das diferentes soluções de lise para o desenvolvimento de protocolo de extração de DNA simplificado.

5.9 EXTRAÇÃO DE DNA DE AMOSTRAS CLÍNICAS DE BIÓPSIA DE PELE

O DNA das amostras clínicas de biópsia de pele coletadas de pacientes suspeitos de hanseníase e armazenadas em álcool 70%, foi extraído por meio dos protocolos a serem avaliados por este estudo (TABELA 2), e também, de forma pareada por kit comercial DNAeasy Blood and Tissue® (Qiagen, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. Após extraídos, foram dosadas as concentrações de DNA por meio do equipamento NanoDrop® (Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), e armazenados a -20°C.

5.10 SOLUÇÕES DE LISE AVALIADAS PARA A EXTRAÇÃO DE DNA

Em um primeiro momento, foi decidido avaliar a solução de guanidina (6 M) na lise de amostras de biópsia de pele de pacientes hansenianos, pois se trata de uma solução amplamente empregada em tampões de kits comerciais de extração e que já havia sido avaliada em estudos anteriores do grupo para aplicação em outros materiais biológicos (ALI et al., 2020; HIMMELREICH; WERNER, 2009).

Em um segundo momento, seis diferentes soluções de lise foram avaliadas para a extração de DNA a partir de amostras de pele (TABELA 2) (ALI et al., 2020; SIDOROVA et al., 2012).

Devido às limitações quanto a disponibilidade e acesso às amostras clínicas, foi utilizada a pele suína, adquirida de forma comercial em casa de carnes, como modelo comparativo na avaliação. A pele suína apresenta semelhanças anatômicas com a humana, por isso é frequentemente utilizada como modelo comparativo (HWANG et al., 2021; SUMMERFIELD et al., 2015).

As avaliações se estabeleceram de duas formas: (i) por observação visual quanto a dissolução/redução do fragmento de pele e alteração na turbidez da solução e (ii) por meio da qPCR para amplificação do gene *18S rRNA* de mamífero (MANTA et al., 2020), como análise da eficiência de cada protocolo. Para o controle negativo

utilizou-se de fragmento de pele de suíno incubada com água livre de nucleases, o qual foi submetido ao mesmo protocolo de processamento que as demais amostras.

Fragmentos de pele suína de aproximadamente 3 mm foram submetidos a extração de DNA a partir dos protocolos avaliados (TABELA 2). Para isso, após a adição do fragmento de pele em microtubos contendo cada uma das soluções a serem avaliadas, com o auxílio de pistilo estéril para microtubo, a amostra foi gentilmente macerada e incubada em termobloco à 56 °C por 30 minutos, com adicional de maceração e agitação em vórtex a cada dez minutos. Posteriormente, 200 µL do sobrenadante foi depositado em FTA Elute Micro Card™ (Flinders Technology Associates - FTA, GE Whatman, Maidstone, Kent, United Kingdom) cards e armazenado a temperatura ambiente (21 – 23 °C) até que estivesse completamente seco para prosseguir a etapa de purificação e eluição.

TABELA 2 - PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE BIÓPSIA DE PELE AVALIADOS PARA O AUXÍLIO NA DETECÇÃO MOLECULAR DE *Mycobacterium leprae*

Tubo [estoque]	Pele	PBS		Guanidina		PK		Ureia		NH ₄ OH		Tx-100		SDS		Total		[Final] M	
		5.8 mM		6M		20 mg/mL		8 M		71 mM		10%		10%				Guanidina	Ureia NH ₄ OH
1	6 mm	200 µL		200 µL		8 µL		160 µL		-		32 µL		-		600 µL		2 M	2 M -
2	6 mm	366 µl		-		14,6 µL		146 µL		-		73 µL		-		600 µL		-	2 M -
3	6 mm	-		286 µL		29 µL		286 µL		-		-		-		600 µL		3 M	4 M -
4	6 mm	-		428 µL		34 µL		-		-		138 µL		-		600 µL		4 M	- -
5	6 mm	-		540 µL		60 µL		-		-		-		-		600 µL		5 M	- -
6	6 mm	-		-		-		-		540 µL		-		60 µL		600 µL		-	0,06 M

Protocolos com os reagentes e suas respectivas concentrações e volumes necessários para o preparo das soluções de lise avaliadas na extração de DNA a partir de biópsia de pele de 6 mm. A seleção das soluções foi baseada em trabalhos de ALI et al. (2020) e SIDOROVA et al. (2012)
FONTE: O autor (2023).

5.11 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA CLÍNICA DE BIÓPSIA E APLICAÇÃO NO CARTÃO FTA MICRO ELUTE (WHATMAN®)

A partir da definição do melhor protocolo para a extração de DNA de biópsia de pele, foi realizada mais uma etapa de avaliação com amostras clínicas. Para a otimização e avaliação do protocolo simplificado, o fragmento de biópsia foi adicionado em microtubo de 1.5 mL contendo 146 µL de solução desnaturante (solução de ureia (8 M)), 14.6 µL de proteinase K (20 mg/µL) (Roche, Alemanha), 366 µL de tampão fosfato-salino (PBS) (5.8 mM) e 73.4 µL de água livre de nucleases. Em seguida, com o auxílio de pistilo estéril para microtubo, a amostra foi gentilmente macerada e incubada em termobloco à 56 °C por 30 minutos, com adicional de maceração e agitação em vórtex a cada dez minutos. Posteriormente, 200 µL do sobrenadante foi depositado em FTA Elute Micro Card™ e armazenado a temperatura ambiente (21 – 23 °C) até que estivesse completamente seco.

5.12 PROTOCOLOS DE ELUIÇÃO DE DNA A PARTIR DA AMOSTRA EM FTA

Foram avaliados nove protocolos de eluição a partir de amostra clínica de biópsia de pele com solução de lise (solução de guanidina ou ureia) armazenada em cartão FTA (TABELA 3). O primeiro parâmetro avaliado foi o tamanho do fragmento de FTA a ser destacado: Foram avaliados fragmentos de 3 mm e 6 mm. Em seguida, foi avaliada a eluição direta pelo tampão com TE (pH 8.0) ou a realização de uma etapa de lavagem. O tampão comercial de lavagem de FTA (200 µL, Qiagen, Alemanha) ou água livre de nucleases (500 µL) foram testados para a lavagem. Por fim, foi avaliada a adição de 50 µL ou 100 µL de tampão de eluição (TE pH 8.0) seguido de cinco, dez ou quinze minutos de incubação a 95 °C. O eluido contendo o DNA extraído obtido por meio de cada um dos protocolos foi submetido a reação de qPCR para detecção dos alvos 16S *rRNA* e RLEP do *M. leprae*, e o controle interno 18S *rRNA* humano, presentes no kit comercial NAT Hans (IBMP, Brasil).

TABELA 3 - PROTOCOLOS DE ELUIÇÃO A PARTIR DO CARTÃO FTA AVALIADOS NA EXTRAÇÃO DE DNA DE *Mycobacterium leprae* EM AMOSTRAS DE BIÓPSIA DE PELE

Protocolos de Eluição a partir do FTA		
Tamanho FTA	Lavagem	Eluição
3 mm	200 µL Wash FTA	100 µL TE
	500 µL Água RNase free	
6 mm	200 µL Água RNase free	100 µL TE + incubação em temperatura ambiente por 15 minutos
	Sem lavagem	
	200 µL Água RNase free	100 µL TE + incubação a 95°C por 5 minutos
	Sem lavagem	
	Sem lavagem	100 µL TE + incubação a 95 °C por 10 minutos
		50 µL TE + incubação a 95 °C por 10 minutos
	Duas etapas – 500 µL Água RNase free + incubação em temperatura ambiente por 5 minutos entre as lavagens	100 µL TE + incubação a 95°C por 5 minutos

FONTE: O autor (2023).

5.13 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS PARA A qPCR PARA DETECÇÃO DOS ALVOS DE *Mycobacterium leprae* E CONTROLE INTERNO HUMANO

A detecção dos alvos 16S *rRNA* e RLEP de *M. leprae* e do controle interno humano 18S *rRNA* foi realizada como descrito por MANTA et al. (2022). As análises aconteceram de forma pareada no equipamento padrão de bancada (QuantStudio 5, Applied Biosystems, EUA) e no equipamento portátil Q3-Plus (CEREDA et al., 2018).

No instrumento de bancada, as reações foram realizadas por meio do kit NAT Hans (IBMP) e analisadas de acordo com as instruções do fabricante. As reações apresentavam o volume final de 25 µL, contendo 5 µL de DNA.

Já as reações realizadas no equipamento Q3-Plus eram compostas por GoTaq Probe qPCR Master Mix (2X) (Promega®, EUA) e os oligonucleotídeos descritos por MANTA et al. (2022), utilizados no kit NAT Hans (IBMP), para o alvo 16S *rRNA* nas concentrações de 0.75 µM pra os oligonucleotídeos *foward* e *reverse*, e

0.30 μM para a sonda; Para o alvo RLEP 0.40 μM dos oligonucleotídeos *forward* e *reverse*, e 0.20 da sonda; E para o alvo *18S rRNA* 0.20 de *forward* e *reverse*, e 0.10 μM da sonda. Apesar disso, devido a particularidades do instrumento portátil, foi necessária a substituição do fluoróforo Cy5 para ROX, sonda utilizada para a detecção do gene *18S rRNA*. Na plataforma portátil, as reações foram padronizadas para um volume final de 5 μL , contendo 2 μL de DNA.

Os parâmetros ópticos definidos para a leitura das reações no equipamento Q3-Plus no canal FAM foram de tempo de exposição de 1 segundo, ganho 14 e potência de luz 8; Para o canal VIC, tempo de exposição 1 segundo, ganho 14 e potência de luz 9; Por fim, para o canal ROX, os parâmetros otimizados foram: tempo de exposição 1 segundo, ganho 15 e potência de luz de 7. A linha de base foi definida automaticamente pelo software do instrumento (Q3-Plus V2 Suite, versão 4.0, ST Microelectronics), e o *threshold* estabelecido foi de 36 para o alvo *16S rRNA*, 150 para RLEP e 21 para *18S rRNA*. Os valores definidos para o *cutoff* foram de 39.5 para o gene *16S rRNA* e de 40.5 para o alvo RLEP.

As condições de ciclagem utilizadas no QuantStudio 5 (QS-5) foram de 95 °C por dez minutos, e 45 ciclos de 95 °C por 15 segundos, e 60 °C por um minuto. No equipamento Q3-Plus, as condições de ciclagem foram de 95 °C por 40 segundos, e 45 ciclos de 95 °C por 20 segundos e 64 °C por um minuto. O tempo total da reação no equipamento portátil foi de aproximadamente 1 hora e 40 minutos.

5.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Parâmetros diagnósticos de eficiência, sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade e repetibilidade da reação foram avaliados para o melhor protocolo experimental utilizando qPCR realizado em ambos os equipamentos (QuantStudio 5 e Q3-Plus). O limite de detecção com intervalo de confiança de 95% ($\text{LOD}_{95\%}$) foi calculado por meio do modelo Probit no software RStudio versão 4.1.0 (baixado de <http://www.Rproject.org/>). A avaliação da concordância entre os diferentes instrumentos foi realizada pelo método de Bland-Altman (ALTMAN; BLAND, 1983).

6 RESULTADOS

6.1 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS ÓPTICOS, *THRESHOLD* E *CUTOFF* PARA DETECÇÃO DE *Mycobacterium leprae* NO EQUIPAMENTO PORTÁTIL

Os parâmetros ópticos definidos para cada um dos alvos foram: Para FAM, tempo de exposição 1 segundo, ganho 14 e intensidade de luz 8; Para VIC, tempo de exposição 1 segundo, ganho 14 e intensidade de luz 9; e para ROX, tempo de exposição 1 segundo, ganho 15 e intensidade de luz 7.

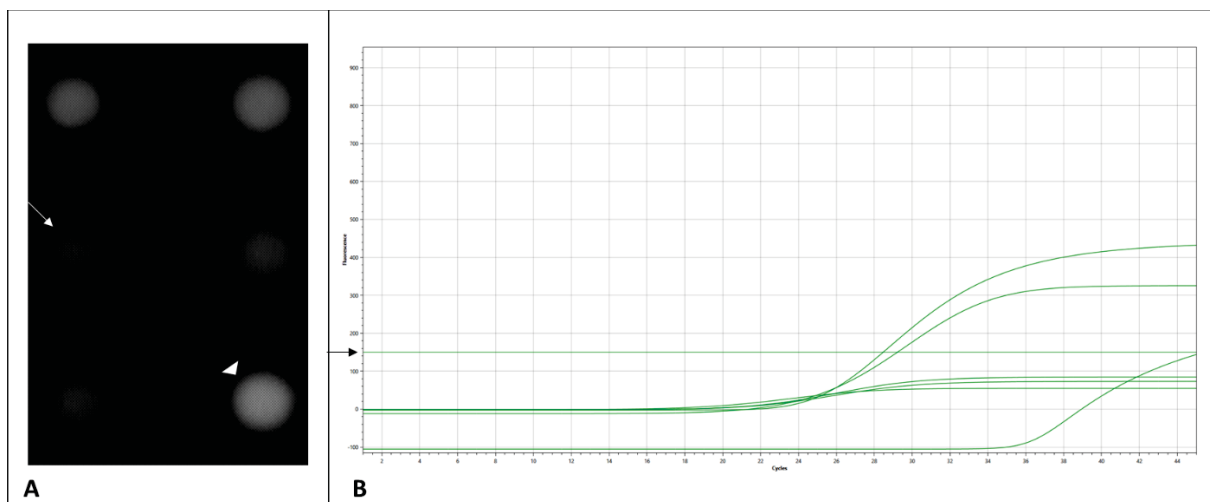
TABELA 1 - PARÂMETROS ÓPTICOS DE TEMPO DE EXPOSIÇÃO, GANHO E INTENSIDADE DE LUZ AVALIADOS PARA A OTIMIZAÇÃO DAS LEITURAS NO EQUIPAMENTO PORTÁTIL Q3-PLUS

FAM			VIC			ROX		
Tempo	Ganho	Intensidade	Tempo	Ganho	Intensidade	Tempo	Ganho	Intensidade
1	14	5	1/2	11	5	1	15	7
1	14	7	1/2	15	8	-	-	-
1	14	8	1/2	15	9	-	-	-
1	15	7	1/2	15	10	-	-	-
1	15	10	1	14	5	-	-	-
-	-	-	1	14	9	-	-	-
-	-	-	1	15	8	-	-	-
-	-	-	2	13	10	-	-	-
-	-	-	2	14	7	-	-	-
-	-	-	2	14	9	-	-	-
-	-	-	2	15	7	-	-	-
-	-	-	2	15	10	-	-	-
-	-	-	2	16	10	-	-	-

Parâmetros ópticos avaliados para leitura das reações de qPCR para detecção de *M. leprae* no equipamento Q3-Plus. Em negrito os parâmetros definidos para os diferentes canais: FAM – 16S *rRNA*; VIC – RLEP e ROX – 18S *rRNA*. FONTE: O autor (2023).

O limiar de fluorescência (*threshold*) para cada um dos alvos foi de 36 para o alvo 16S *rRNA* e 150 para o alvo RLEP de *M. leprae*, e 21 pra o alvo 18S *rRNA*, controle interno humano. Os valores foram estabelecidos manualmente pelo operador por meio da observação das amplitudes de fluorescência das diferentes concentrações a partir de um mesmo grupo de amostras pré-caracterizadas como negativas ou positivas (FIGURA 3).

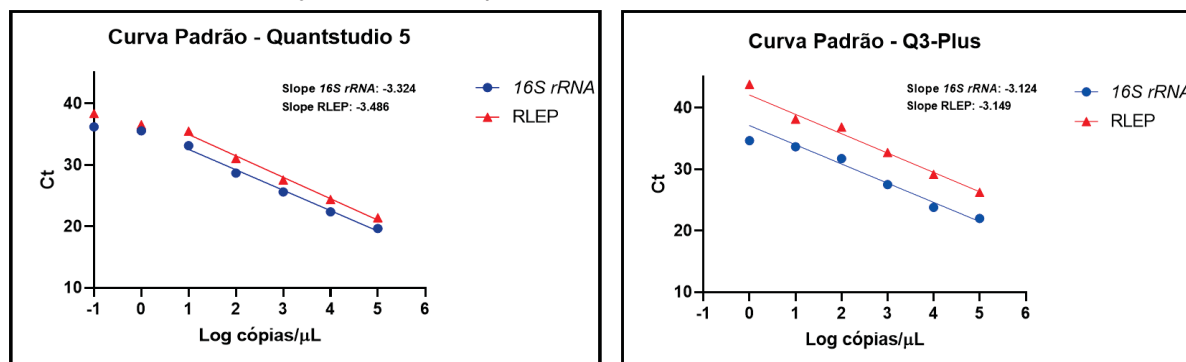
FIGURA 3 - IMAGENS REPRESENTATIVAS DOS PADRÕES DE FLUORESCÊNCIA DETECTADOS PELO EQUIPAMENTO PORTÁTIL E UTILIZADAS PARA A DETERMINAÇÃO DO *THRESHOLD*



(A) Imagem do chip com diferentes intensidades de fluorescência emitidos pelos poços na análise de amostras clínicas. A seta indica um poço com uma amostra negativa; já a ponta de seta indica uma amostra positiva; Em (B) Curvas representativas da mesma análise realizada em amostras clínicas. As amplificações abaixo da faixa indicada pela seta representam amplificações inespecíficas com amplitude de fluorescência abaixo de 150 unidades. Já as curvas com amplitude de fluorescência acima de 150 unidades são de amostras positivas. FONTE: O autor (2023).

A eficiência das reações no equipamento Q3-Plus foi de 109.00% para o gene *16S rRNA* e 107.72% para o RLEP na detecção de diferentes concentrações (10^5 – 10^0 cópias/uL) do DNA sintético (gBlock®). No equipamento padrão QS-5 os valores foram 101.70% para o gene *16S rRNA* e 93.54% para RLEP, nas análises do mesmo grupo de amostras (GRÁFICO 1).

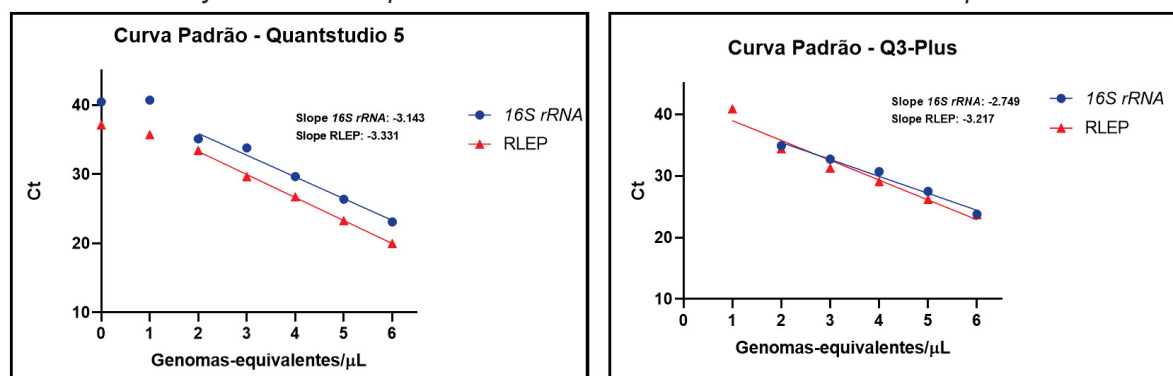
GRÁFICO 1 - CURVA PADRÃO DAS REAÇÕES DE QPCR ANALISADAS PELOS EQUIPAMENTOS QUANTSTUDIO E Q3-PLUS PARA A DETECÇÃO DOS ALVOS *16S rRNA* E RLEP DE *Mycobacterium leprae* A PARTIR DO DNA SINTÉTICO



Nas análises a partir do DNA sintético é possível observar a semelhança na linearidade das análises pelos diferentes equipamentos. A linearidade manteve-se até a 10^1 cópias/μL em ambos os termocicladores. FONTE: O autor (2023).

As mesmas análises foram realizadas com amostras de DNA purificado de genomas-equivalentes a 10^6 células/μL de *M. leprae*. Para essas, as eficiências foram de 131.06% para o gene *16S rRNA* e 104.65% para RLEP, no equipamento Q3-Plus. No equipamento QS-5 os valores foram de 101.11% para o *16S rRNA* e 100.46% para RLEP (GRÁFICO 2).

GRÁFICO 2 - CURVA PADRÃO DAS REAÇÕES DE QPCR ANALISADAS PELOS EQUIPAMENTOS QUANTSTUDIO E Q3-PLUS PARA A DETECÇÃO DOS ALVOS *16S rRNA* E RLEP DE *Mycobacterium leprae* A PARTIR DO DNA PURIFICADO DE *M. leprae*



Nas análises a partir do DNA purificado de *M. leprae* é possível observar a semelhança na linearidade das análises pelos diferentes equipamentos. A linearidade manteve-se até a 10^2 genomas-equivalentes/μL em ambos os termocicladores. FONTE: O autor (2023).

6.2 SENSIBILIDADE ANALÍTICA

O limite de detecção ($LOD_{95\%}$) no equipamento Q3-Plus a partir de DNA sintético foi de 13.86 cópias/μL para os alvos *16S rRNA* e RLEP. No QS-5, o valor

encontrado foi de 12.45 cópias/ μ L para o *16S rRNA* e 20.44 cópias/ μ L para o RLEP. Quando analisado o DNA purificado *M. leprae* no equipamento Q3, o LOD_{95%} foi de 113.23 genomas-equivalentes/ μ L para o gene *16S rRNA* e 19.72 genomas-equivalentes/ μ L para RLEP. Já no instrumento padrão (QS-5) os valores foram de 205.26 genomas-equivalentes/ μ L para *16S rRNA* e 15.35 genomas-equivalentes/ μ L para RLEP.

6.3 REPRODUTIBILIDADE E REPETIBILIDADE NO EQUIPAMENTO PORTÁTIL

Os resultados obtidos nas replicatas das diluições para as reações intra e inter operador são apresentadas na Tabela 4. Observa-se nas reações intra-operador que as análises apresentam boa repetibilidade. O coeficiente de variação variou acima de 5% mas abaixo de 10% em apenas duas concentrações ($10^1 - 10^0$). A maior variação nestas concentrações é esperada uma vez que são concentrações perto do limite da reação e da própria técnica (Tabela 4). Nas análises inter operador os valores dos coeficientes de variação entre as concentrações variaram de 0.05 a 3.09% para o alvo *16S rRNA*. Para o alvo RLEP foram observados valores entre 0.55 a 3.10%. A análise de variância (ANOVA) realizada para os resultados obtidos nas reações interoperador, assumindo um intervalo de confiança de 95%, não apresentou diferença significativa (P valor = 0.994 para *16S rRNA* e P valor = 0.992 para RLEP) sugerindo que não há diferença entre os resultados obtidos pelos diferentes operadores.

TABELA 4 - ANÁLISES DE REPETIBILIDADE E REPRODUTIBILIDADE REALIZADAS NAS REAÇÕES PARA DETECÇÃO DE *Mycobacterium leprae* A PARTIR DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE DNA SINTÉTICO

Alvo	DNA sintético	Repetibilidade									Reprodutibilidade		
		Operador 1			Operador 2			Operador 3			Interoperador		
	Cópias/μL	média	desv	desvpad	%rRSD	média	desv	desvpad	%rRSD	Média	desv	desvpad	%rRSD
16S rRNA	1,00E+04	22,83	0,25	0,32	1,41	22,78	0,26	0,35	1,55	22,66	0,10	0,15	0,68
	1,00E+03	26,61	0,11	0,15	0,55	26,60	0,12	0,16	0,61	26,62	0,07	0,09	0,35
	1,00E+02	30,05	0,30	0,39	1,31	29,75	0,14	0,19	0,65	30,16	0,30	0,43	1,43
	1,00E+01	33,71	0,91	1,18	3,49	34,07	1,34	1,97	5,80	34,40	0,60	0,60	1,73
	1,00E+00	34,65	0,51	0,74	2,13	36,47	1,14	1,44	3,96	36,67	2,39	3,39	9,23
RLEP	1,00E+04	28,77	0,23	0,32	1,13	29,19	0,96	1,27	4,34	28,56	0,51	0,68	2,38
	1,00E+03	31,84	0,21	0,28	0,87	32,36	0,61	0,80	2,46	32,03	0,18	0,24	0,76
	1,00E+02	35,20	0,26	0,34	0,97	34,90	0,25	0,35	1,00	35,30	0,51	0,67	1,91
	1,00E+01	38,75	0,92	1,07	2,75	38,72	1,24	1,61	4,17	39,10	0,17	0,26	0,66
	1,00E+00	40,44	1,46	2,06	5,10	38,11	*	*		38,70	0,94	1,33	3,44

Análises de repetibilidade e reprodutibilidade. Em destaque os valores correspondentes aos coeficientes de variação superiores a 5%. FONTE: O Autor (2023).

6.4 TÉCNICAS MINIMAMENTE INVASIVAS PARA A COLETA DE MATERIAL GENÉTICO

Na avaliação de métodos minimamente invasivos, no que diz respeito a coleta por fitas adesivas, a partir das análises para o gene *18S rRNA*, os resultados foram: D-Squame com Ct médio de 26.33 na fita com amostra e 29.56 na fita controle; Para Sebutape o Ct médio na fita com amostra biológica foi de 26.39 e controle negativo de 31.24; E para NexCare (NC) na fita com amostra o Ct foi de 24.98 enquanto e seu controle negativo foi de 29.25 (TABELA 5).

As mesmas análises foram realizadas para amplificação do gene *RPP30*, nestas, os valores de Cts correspondentes para cada uma das fitas foram: D-Squame 33.64 e seu respectivo controle negativo 32.87; Sebutape obteve Ct médio de 33.34 e seu controle negativo 34.33; E NexCare resultou em Ct médio de 32.29 e seu controle negativo 33.75.

Quando avaliado o método de coleta a partir de microagulhamento, o resultado foi 28.51 para as coletas por *tape-trip* pós microagulhamento e 24.88 para a coleta com swab estéril após o microagulhamento.

O tratamento da mistura de reação e das fitas adesivas com o brometo de etídio monoazida (EMA) não apresentou resultado satisfatório, sendo observado sinal de ampliações inespecíficas mesmo após o procedimento.

A hanseníase apresenta diferentes formas clínicas as quais estão relacionadas com a carga bacilar da infecção. Sendo assim, a baixa recuperação de material, como foi observada nas avaliações dos métodos minimamente invasivos, pode interferir na sensibilidade analítica do diagnóstico, prejudicando a detecção do agente. Além disso, o local de predileção do bacilo, em terminações do sistema nervoso periférico, localizadas nas camadas mais profundas da derme, não são acessadas pelos métodos minimamente invasivos avaliados. Devido a essas circunstâncias, os estudos com as técnicas minimamente invasivas foram substituídos por estudos com amostras de biópsia, ainda consideradas as mais sensíveis para o diagnóstico da hanseníase (MANTA et al., 2020).

TABELA 5 - CTS MÉDIOS OBTIDOS A PARTIR DAS ANÁLISES POR qPCR PARA OS GENES *18S rRNA* E *RPP30* DOS MÉTODOS DE COLETA MINIMAMENTE INVASIVOS (*TAPE-STRIP* E MICROAGULHAMENTO)

MÉTODOS MINIMAMENTE INVASIVOS						
		<i>Tape-strip</i>			Microagulhamento	
		D-Squame	Sebutape	NexCare	<i>Tape-strip</i>	Swab
Ct médio (<i>18S rRNA</i>)	Amostra	26.33	26.39	24.98	28.51	24.88
	Controle negativo	29.56	31.24	29.25		28.79
	Intervalo de Ct	(23.38 - 31.24)	(22.20 - 34.50)	(21.55 - 26.88)	(28.31 - 28.83)	(21.81 - 27.36)
Ct médio (<i>RPP30</i>)	Amostra	33.64	33.34	32.49	NA	NA
	Controle negativo	32.87	34.33	33.75	NA	NA
	Intervalo de Ct	(31.40 - 37.50)	(32.70 - 34.70)	(31.10 - 33.70)	NA	NA

* NA - Não se aplica.

Fonte: O autor (2023).

Com o objetivo inicial de se estabelecer um método de coleta minimamente invasivo, foi iniciada a modelagem de protótipo de equipamento comercial aplicador de pressão para auxílio na coleta por meio de *tape-strip*. Após pesquisa em sites comerciais de empresas especializadas na venda desse tipo de equipamento, foi encontrado o modelo *D500*. Utilizando como exemplar o equipamento comercial, buscou-se estabelecer um protótipo equivalente. No entanto, após as pesquisas com *tape-strips*, foi observado que a técnica não apresentava uma boa recuperação de DNA, devido às baixas concentrações. Em vista disso, a modelagem e as impressões foram interrompidas e as análises de outros métodos de coleta tiveram início.

6.5 AVALIAÇÃO DA qPCR PORTÁTIL EM AMOSTRAS CLÍNICAS DE BIÓPSIA DE PELE EXTRAÍDAS PELO KIT COMERCIAL (QIAGEN)

Para a avaliação da possível existência de viés nos resultados da qPCR por meio do uso do Q3-Plus em comparação ao equipamento padrão (Quantstudio 5) nas reações que detectaram os alvos *16S rRNA* e RLEP de *M. leprae*, foi empregado o teste Bland-Altman a partir de 15 amostras clínicas de biópsia de pele analisadas de forma pareada.

No intervalo de 95% de confiança, apenas uma das amostras ficou fora deste intervalo para ambos os alvos, no entanto, por se tratar de um caso PB, sabe-se que a baixa carga bacteriana pode prejudicar a sensibilidade analítica do teste. O Ct médio entre as amostras pareadas pelos equipamentos foi de 1.71 ciclos de *threshold* a mais

para o alvo *16S rRNA* e 4.08 ciclos de *threshold* a mais para o alvo RLEP na plataforma portátil (Q3-Plus) (FIGURA 4).

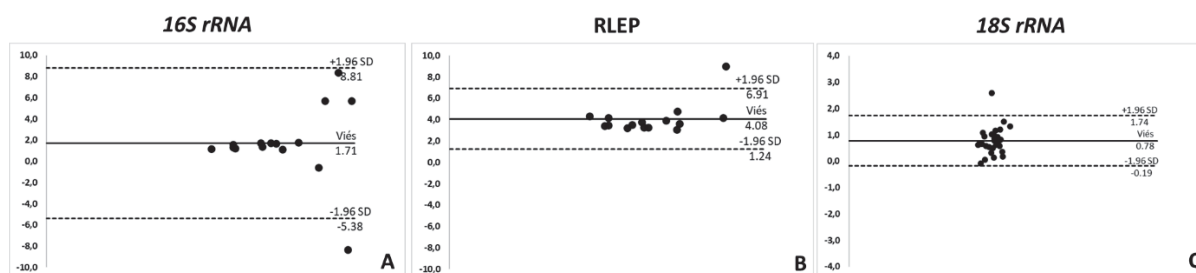
Valores de Cts acima dessa média de variação para os diferentes alvos são observados principalmente em amostras classificadas como PB, onde se tem uma menor concentração do DNA alvo (TABELA 6) (GRÁFICO 3).

TABELA 6 - DESFECHO CLÍNICO DAS AMOSTRAS DE BIÓPSIA DE PELE PRÉ-CARACTERIZADAS NO LAHAN E SEUS RESPECTIVOS VALORES DE CT NAS ANÁLISES DE qPCR DOS EQUIPAMENTOS QUANTSTUDIO-5 E Q3-PLUS

AMOSTRA	DESFECHO CLÍNICO	LAHAN	QUANTSTUDIO-5			Q3-PLUS		
		StepOne	16S	16S	18S	16S	18S	18S
			rRNA	rRNA	RLEP	rRNA	RLEP	rRNA
1	PB	37,30	indeter.	34,31	17,94	indeter.	40,97	18,47
2	PB	34,70	35,63	29,99	18,30	35,06	34,80	19,27
3	PB	39,30	43,26	34,74	16,63	34,94	43,75	17,30
4	PB	36,79	indeter.	33,04	18,27	41,87	37,07	18,58
5	PB	0,00	indeter.	32,37	17,62	indeter.	38,36	17,67
6	PB	0,00	indeter.	35,44	18,43	44,93	40,49	19,58
7	PB	36,90	36,00	33,16	18,77	indeter.	40,44	19,38
8	PB	0,00	36,76	36,78	18,85	42,48	40,96	19,63
9	PB	35,20	33,27	30,73	19,06	38,99	33,81	19,88
10	PB	35,00	31,81	28,82	17,50	33,60	32,75	18,07
11	MB	29,30	26,93	23,66	19,69	28,65	26,86	20,04
12	MB	31,00	30,07	26,58	20,21	31,21	29,84	21,53
13	MB	33,90	28,97	25,97	17,26	30,67	29,27	19,85
14	MB	36,20	33,70	30,84	19,86	42,09	34,47	20,03
15	MB	26,80	23,42	20,31	18,00	25,00	23,75	19,02
16	MB	31,30	28,26	25,44	16,44	29,99	29,22	17,06
17	MB	26,00	23,90	20,83	18,42	25,14	24,31	18,91
18	MB	22,50	20,81	17,72	18,49	21,97	22,03	19,27
19	MB	29,50	27,33	24,22	18,98	28,71	27,74	20,18
20	MB	25,84	23,53	20,47	18,52	24,86	24,67	19,44
21	OD	0,00	indeter.	35,45	17,14	41,07	43,29	17,05
22	OD	0,00	indeter.	35,72	16,91	indeter.	indeter.	17,56
23	OD	0,00	indeter.	indeter.	19,28	indeter.	indeter.	19,86
24	OD	0,00	42,91	indeter.	16,80	indeter.	indeter.	17,87
25	OD	0,00	43,11	indeter.	19,36	indeter.	indeter.	20,86
26	OD	0,00	indeter.	34,98	17,12	indeter.	42,86	18,06
27	OD	0,00	indeter.	indeter.	18,94	indeter.	indeter.	19,67
28	OD	0,00	indeter.	indeter.	18,43	indeter.	indeter.	19,29
29	OD	37,40	indeter.	32,49	18,76	indeter.	40,45	18,89
30	OD	0,00	indeter.	33,37	18,81	37,76	38,67	19,72
31	OD	0,00	indeter.	35,17	19,25	indeter.	43,21	20,07
32	OD	38,00	indeter.	34,59	18,93	indeter.	42,89	19,73

Amostras clínicas de biópsia de pele extraídas por método comercial (Qiagen) e pré-caracterizadas no LAHAN. Observa-se os Cts obtidos por cada um dos equipamentos utilizados na avaliação: StepOne utilizado nas análises padrão para detecção do alvo *16S rRNA* no LAHAN; Quantstudio-5 utilizado nas análises de forma pareada para detecção dos alvos *16S rRNA* e RLEP de *M. leprae* e controle interno humano *18S rRNA*, a partir do kit NAT Hans (IBMP); E Q3-Plus utilizado para a otimização das reações, objeto do presente estudo, para a detecção dos alvos *16S rRNA* e RLEP de *M. leprae* e controle interno humano *18S rRNA*, a partir dos mesmos oligonucleotídeos presentes no kit NAT Hans. FONTE: O autor (2023).

FIGURA 4 - ANÁLISES DE BLAND-ALTMAN REALIZADAS A PARTIR DOS ENSAIOS DE qPCR PARA OS ALVOS *16S rRNA* E RLEP DE *Mycobacterium leprae* E *18S rRNA* DE MAMÍFEROS, EM AMOSTRAS CLÍNICAS DE BIÓPSIA EXTRAÍDAS POR MÉTODO COMERCIAL (QIAGEN) E ANALISADAS DE FORMA PAREADA NOS EQUIPAMENTOS QUANTSTUDIO-5 E Q3-PLUS



Análises de Bland-Altman nas amostras a partir de biópsia de pele extraídas pelo método comercial (Qiagen) e avaliadas por qPCR nos equipamentos QS-5 e Q3-PLUS. (A) Análises realizadas para o alvo *16S rRNA*. A variação média dos Cts foi de 1.71 ciclos de *threshold* a mais para o Q3-Plus. (B) Análises realizadas para o alvo RLEP. Foi observada variação média de 4.08 ciclos de *threshold* a mais para o equipamento Q3-Plus. (C) Análises para o controle interno *18S rRNA*. A variação média foi de 0.78 ciclos de *threshold* a mais para as leituras realizadas no equipamento Q3-Plus. FONTE: O autor (2023).

Após o teste Bland-Altman foi possível a determinação dos valores de *cutoff*. O ponto de corte estabelecido para o alvo *16S rRNA* foi 39.5 e para o alvo RLEP foi 40.5. Assim, para as amostras que apresentaram amplificações para ambos os alvos, com valores abaixo de 39.5 e 40.5 para os alvos *16S rRNA* e RLEP, respectivamente, foram classificadas como positivas (13/32) no equipamento Q3-Plus. Para aquelas amostras que apresentaram valores de Ct acima do ponto de corte ou ausência de amplificação foi estabelecida a classificação como negativa (13/32). Ainda, amostras que apresentaram amplificação em apenas um dos alvos (*16S rRNA* ou RLEP) foram classificadas como indeterminadas (6/32) (TABELA 7). Para esses casos, recomenda-se o reteste da amostra e acompanhamento do paciente.

No equipamento padrão (Quantstudio-5) as mesmas amostras avaliadas por meio do kit NAT Hans foram classificadas em positivas, negativas ou indeterminadas de acordo com as recomendações do protocolo do kit comercial (TABELA 7). Neste, os valores de *cutoff* para os alvos são: Ct de até 35.5 para *16S rRNA*; e Ct de até 34.5 para RLEP. As amostras que apresentaram valores de Ct abaixo ou igual aos valores de corte (*cutoff*) para ambos os alvos foram classificadas como positivas (12/32). Para aquelas amostras que obtiveram valores de Ct superiores aos determinados para o ponto de corte ou ausência de amplificação, a classificação foi de amostra negativa (14/32). Já para as amostras que apresentaram valor de Ct para o alvo RLEP menor ou igual a 34.5 e ausência de amplificação para o alvo *16S rRNA*, foram classificadas

como indeterminadas (6/32). Para esses casos, recomenda-se o reteste e acompanhamento do paciente.

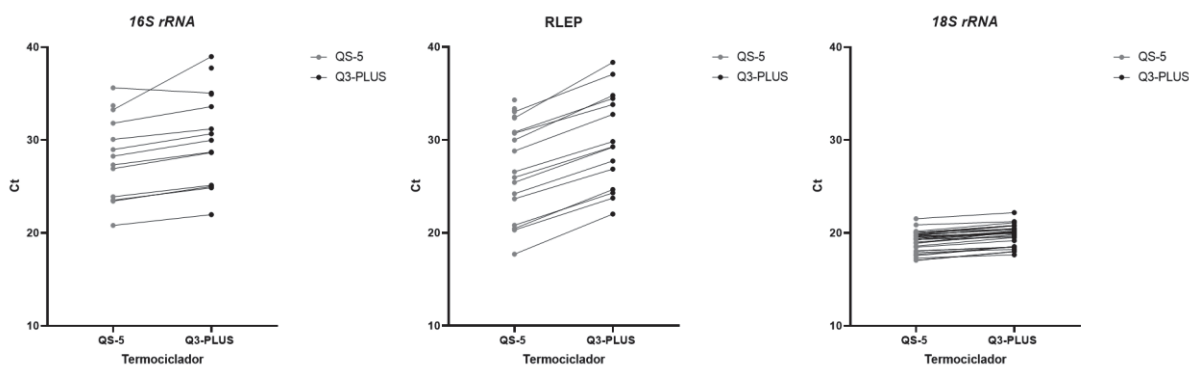
As análises realizadas no LAHAN para a amplificação do gene *16S rRNA* de *M. leprae* determinam que para Ct até 36.5 a amostra será positiva (14/32), os valores superiores ao Ct 38.5 devem classificar a amostra como negativa (14/32), enquanto para aqueles valores de Ct entre 36.5 e 38.5 deve-se considerar amostras indeterminadas (4/32) (TABELA 7). Caso a amostra seja indeterminada, avaliações por meio da baciloscopia e histopatologia devem auxiliar o desfecho clínico.

TABELA 7 - DESFECHO CLÍNICO DAS AMOSTRAS DE BIÓPSIA DE PELE PRÉ-CARACTERIZADAS E RESULTADOS OBTIDOS APÓS AS AVALIAÇÕES POR qPCR NO LAHAN E EQUIPAMENTOS QUANTSTUDIO-5 E Q3-PLUS

NÚMERO AMOSTRA	DESFECHO CLÍNICO	LAHAN StepOne	QUANTSTUDIO-5	Q3-PLUS
1	PB	Indeterminada	Indeterminada	Negativa
2	PB	Positiva	Indeterminada	Positiva
3	PB	Negativa	Negativa	Negativa
4	PB	Indeterminada	Indeterminada	Indeterminada
5	PB	Negativa	Indeterminada	Indeterminada
6	PB	Negativa	Negativa	Indeterminada
7	PB	Positiva	Negativa	Indeterminada
8	PB	Negativa	Negativa	Negativa
9	PB	Positiva	Positiva	Positiva
10	PB	Positiva	Positiva	Positiva
11	MB	Positiva	Positiva	Positiva
12	MB	Positiva	Positiva	Positiva
13	MB	Positiva	Positiva	Positiva
14	MB	Positiva	Positiva	Indeterminada
15	MB	Positiva	Positiva	Positiva
16	MB	Positiva	Positiva	Positiva
17	MB	Positiva	Positiva	Positiva
18	MB	Positiva	Positiva	Positiva
19	MB	Positiva	Positiva	Positiva
20	MB	Positiva	Positiva	Positiva
21	OD	Negativa	Negativa	Negativa
22	OD	Negativa	Negativa	Negativa
23	OD	Negativa	Negativa	Negativa
24	OD	Negativa	Negativa	Negativa
25	OD	Negativa	Negativa	Negativa
26	OD	Negativa	Negativa	Negativa
27	OD	Negativa	Negativa	Negativa
28	OD	Negativa	Negativa	Negativa
29	OD	Indeterminada	Indeterminada	Indeterminada
30	OD	Negativa	Indeterminada	Positiva
31	OD	Negativa	Negativa	Negativa
32	OD	Indeterminada	Negativa	Negativa

FONTE: O autor (2023).

GRÁFICO 3 - GRÁFICOS DE CORRELAÇÃO DE CICLOS DE *THRESHOLD* (CT) ENTRE OS ENSAIOS DE qPCR PARA OS ALVOS *16S rRNA* E RLEP DE *Mycobacterium leprae* E CONTROLE INTERNO HUMANO *18S rRNA* A PARTIR DE UM MESMO GRUPO DE AMOSTRAS CLÍNICAS EXTRAÍDAS POR MÉTODO COMERCIAL (QIAGEN) E ANALISADAS DE FORMA PAREADA NOS EQUIPAMENTOS QUANTSTUDIO-5 E Q3-PLUS



Gráficos de correlação de ciclos de *threshold* (Ct). Observa-se a diferença de Cts entre as análises realizadas por meio dos equipamentos Quantstudio-5 (QS-5) e Q3-Plus nas amostras extraídas por método de extração comercial (kit Qiagen). Cada um dos gráficos corresponde aos diferentes alvos detectados para *M. leprae* (*16S rRNA* e RLEP) e controle interno humano (*18S rRNA*) na detecção molecular pelo kit NAT Hans (IBMP). FONTE: O autor (2023).

O equipamento Q3-Plus demonstrou sensibilidade de 80% e especificidade de 90.90%, entretanto, das 32 amostras analisadas 18.75% (6/32) tiveram resultado indeterminado (TABELA 8). As mesmas reações realizadas no equipamento padrão (QS-5) apresentaram sensibilidade de 75%, especificidade de 100%, e 18.75% (6/32) das amostras com resultado indeterminado.

O valor preditivo positivo para o equipamento Q3-Plus foi de 92.3% e para o equipamento QS-5 foi de 100%. Já os valores preditivos negativos foram de 76.9% e 71.4% para os equipamentos Q3-Plus e QS-5, respectivamente. Quanto à acurácia dos testes, em ambos os equipamentos foi de 84.6%.

As mesmas amostras utilizadas nesse estudo também foram analisadas pelo Laboratório de Hanseníase (LAHAN) a partir da *sigleplex* qPCR para amplificação do gene *16S rRNA* de *M. leprae* (MARTINEZ et al., 2009) no equipamento StepOne e os resultados obtidos foram cedidos e comparados aos do presente estudo. Para esse mesmo grupo de amostras a sensibilidade do teste foi de 77.77% e a especificidade de 100%. Quanto aos valores preditivo positivo e negativo, o teste resultou em 100% e 71.42%, respectivamente. Já a acurácia foi de 85.71%.

TABELA 8 - PARÂMETROS DE SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE, ACURÁCIA, VPP E VPN DAS ANÁLISES PAREADAS

Parâmetros	Kit de Extração (Qiagen)		
	LAHAN StepOne	Quantstudio 5	Q3-Plus
Sensibilidade	77.77%	75%	80%
Especificidade	100%	100%	90.9%
Acurácia	85.71%	84.6%	84.6%
VPP*	100%	100%	92.3%
VPN*	71.42%	71.4%	76.9%

*VPP: Valor preditivo positivo; VPN: Valor preditivo negativo. Parâmetros de sensibilidade, especificidade, acurácia, VPP e VPN das análises de amostras clínicas extraídas por método padrão (Qiagen) e pareadas nos termocicladores Quantstudio-5 e Q3-Plus para a detecção de *M. leprae*. O teste padrão utilizado no LAHAN também foi aplicado nas comparações entre os parâmetros avaliados para os diferentes equipamentos. FONTE: O autor (2023).

6.6 ANÁLISE DOS PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO

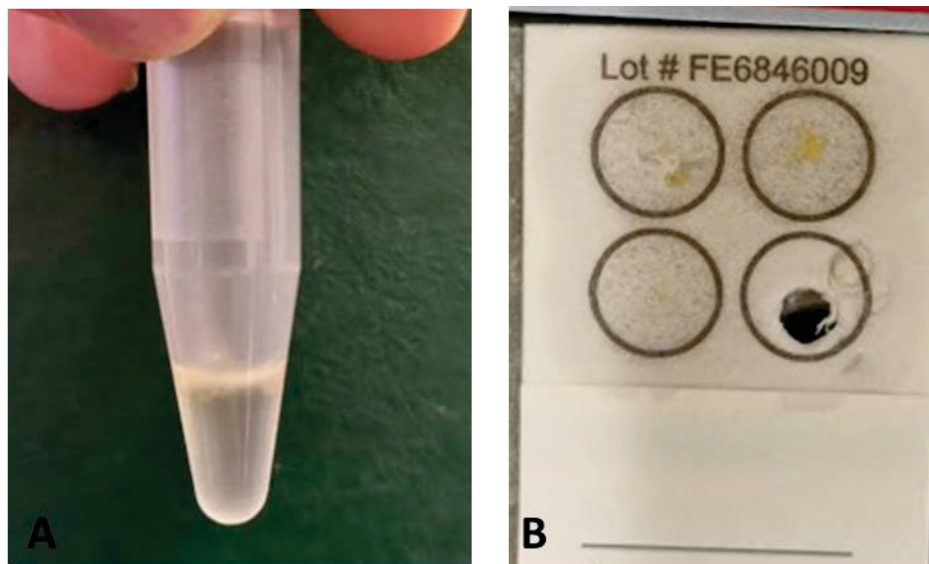
Inicialmente a solução avaliada para lise das amostras foi a de guanidina (6M) com base em trabalho anterior de ALI et al. (2020). Para as análises foram utilizadas amostras clínicas de biópsia de pele de pacientes MB (TABELA 9). Todas as amostras de biópsia de pele utilizadas nesse estudo também tiveram seu DNA extraído pelo kit comercial DNAeasy Blood and Tissue® (Qiagen, Germany) e foram avaliadas por meio do Kit NAT Hans. Os resultados foram comparados aos obtidos com a qPCR *singleplex* para o alvo *16S rRNA* realizada no Laboratório de Hanseníase da Fiocruz - RJ.

Os métodos foram avaliados por qPCR para amplificação dos alvos *16S rRNA* e RLEP de *M. leprae* e para o gene *18S rRNA* de mamíferos (MANTA et al., 2022). A segunda forma de avaliação se deu com a observação das amostras quanto a dissolução do fragmento e alteração de turbidez da solução.

Nas amostras extraídas por solução de guanidina foi observada moderada dissolução dos fragmentos de biópsia de pele (FIGURA 5), e quando analisadas por qPCR observou-se uma maior perda de sensibilidade na detecção dos alvos de *M. leprae*, ou seja, nas amostras pareadas, extraídas com a solução de guanidina, os

alvos apresentaram valores de Ct maiores do que as extraídas pelo kit comercial (TABELA 9).

FIGURA 5 – AMOSTRA CLÍNICA DE BIÓPSIA DE PELE EM SOLUÇÃO DE GUANIDINA (6 M) AVALIADA PARA A EXTRAÇÃO DE DNA DE *Mycobacterium leprae*



(A) Microtubo contendo a amostra clínica de biópsia de pele em solução de guanidina (6 M). No sobrenadante é possível observar fragmentos de pele que não foram solubilizados; (B) Cartão FTA utilizado na etapa de armazenamento e purificação. Os dois círculos superiores do FTA apresentam fragmentos que não foram solubilizados. FONTE: O autor (2023).

O Ct médio da amplificação do *18S rRNA* foi de 25.43 (variando de 19.20 a 32.00) nas amostras extraídas por meio do protocolo com a solução de guanidina. Naquelas extraídas pelo kit comercial (Qiagen) o Ct médio resultante para o mesmo alvo foi de 17.50 (variando de 15.00 a 19.40) (TABELA 9).

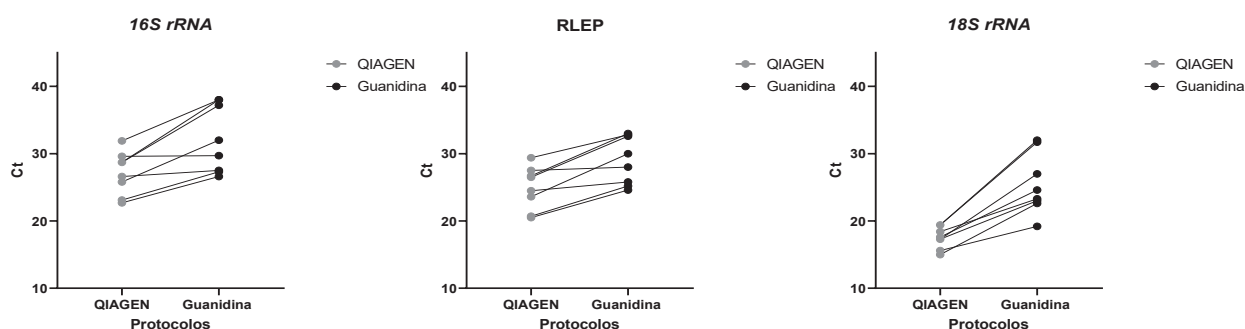
Embora efetiva, a lise por guanidina apresentou uma maior faixa variação de Cts para o alvo *18S rRNA* (GRÁFICO 4), o que indica a possibilidade de não ser reprodutível e poder interferir na sensibilidade analítica do teste. Além disso, o fragmento de pele não apresentou boa dissolução. Nesse sentido, foi decidido avaliar novos protocolos (TABELA 2). Para isso, devido às limitações inerentes ao acesso e disponibilidade de amostras clínicas, optou-se pelo uso da pele suína como modelo comparativo a pele humana.

TABELA 9 - VALORES DE CTS OBTIDOS APÓS AVALIAÇÕES POR qPCR PARA OS ALVOS DE *Mycobacterium leprae* (16S rRNA E RLEP) E CONTROLE INTERNO HUMANO (18S rRNA) A PARTIR DE AMOSTRAS CLÍNICAS DE BIÓPSIAS DE PELE EXTRAÍDAS PELO PROTOCOLO SIMPLIFICADO COM SOLUÇÃO DE GUANIDINA (6 M) E POR MÉTODO COMERCIAL (QIAGEN)

Amostra - biópsia	Desfecho clínico	QIAGEN StepOne (LAHAN)	QIAGEN QuantStudio			Guanidina (6 M) QuantStudio		
		16S rRNA	16S rRNA	RLEP	18S rRNA	16S rRNA	RLEP	18S rRNA
1	MB	26.16	25.80	23.60	19.40	32.00	30.00	32.00
2	MB	34.68	31.90	29.40	17.60	38.00	32.80	24.60
3	MB	23.50	22.70	20.50	15.00	26.60	24.60	22.60
4	MB	26.43	26.60	24.50	18.40	27.50	25.80	23.30
5	MB	31.55	28.70	26.50	19.40	37.20	32.60	31.70
6	MB	24.96	23.10	20.70	17.30	27.30	25.20	23.00
7	MB	37.00	28.70	26.70	17.30	38.00	33.00	27.00
8	MB	32.45	29.60	27.50	15.60	29.70	28.00	19.20

FONTE: O autor (2023).

GRÁFICO 4 - GRÁFICOS DE CORRELAÇÃO DE CTS ENTRE OS ENSAIOS DE QPCR PARA OS ALVOS 16S rRNA E RLEP DE *Mycobacterium leprae* E CONTROLE INTERNO HUMANO 18S rRNA, A PARTIR DE UM MESMO GRUPO DE AMOSTRAS CLÍNICAS EXTRAÍDAS PELO MÉTODO COMERCIAL (QIAGEN) E POR PROTOCOLO SIMPLIFICADO COM SOLUÇÃO DE GUANIDINA, ANALISADOS NO EQUIPAMENTO QUANTSTUDIO 5



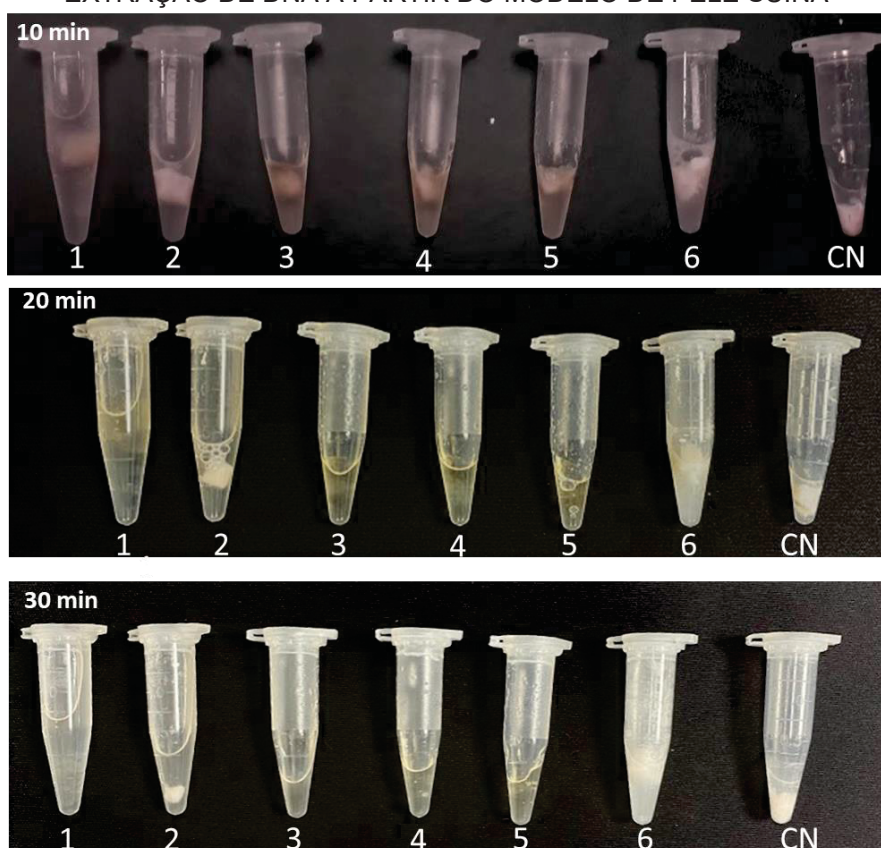
Gráficos de correlação de ciclos de *threshold* (Ct). Observa-se a diferença de Cts entre as amostras extraídas por método comercial (Qiagen) e protocolo com solução de guanidina. As análises foram realizadas no equipamento Quantstudio-5 (QS-5). Cada um dos gráficos corresponde aos diferentes alvos detectados para *M. leprae* (16S rRNA e RLEP) e controle interno humano (18S rRNA) na detecção molecular pelo kit NAT Hans (IBMP). FONTE: O autor (2023).

Diferentes protocolos de extração de DNA a partir de amostras de pele foram analisados utilizando a pele suína como modelo comparado (TABELA 2). Naquelas soluções dos protocolos 1, 3, 4 e 5 foi observada aparente dissolução completa do fragmento, no entanto, a solução passou a ter aspecto consistente, de gel. A solução 2, foi a que apresentou uma boa redução do fragmento de pele e alteração da turbidez da solução, sem alterar a consistência do meio. No protocolo 6, a partir de solução

contendo hidróxido de amônio (NH_4OH) foi observada a baixa solubilização da pele (FIGURA 6).

A tabela 10 apresenta o Ct médio, correspondente para a detecção do gene *18S rRNA* de mamífero, nos seis protocolos avaliados. Dentre estes, o protocolo 2 (TABELA 2) foi o que apresentou os melhores resultados, com valor de Cts médio de 21.70, o que sugere uma maior concentração e pureza do DNA alvo na extração (TABELA 10).

FIGURA 6 - PROTOCOLOS AVALIADOS COM DIFERENTES SOLUÇÕES DE LISE PARA A EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DO MODELO DE PELE SUÍNA



Microtubos com fragmento de pele suína incubada em cada uma das seis soluções de lise avaliadas (Protocolos 1 a 6) mais o controle negativo (CN) nos tempos 10 minutos, 20 minutos e 30 minutos. Pode-se observar a redução do fragmento de pele em algumas das soluções. FONTE: O autor (2023).

Tabela 10 - VALORES DE CTs OBTIDOS NAS REAÇÕES PARA AMPLIFICAÇÃO DO GENE *18S rRNA* DE MAMÍFEROS NAS AVALIAÇÕES DOS PROTOCOLOS COM DIFERENTES SOLUÇÕES DE LISE UTILIZADAS PARA A EXTRAÇÃO DE PELE A PARTIR DO MODELO SUÍNO

Protocolos avaliados							
Protocolos	1	2	3	4	5	6	CN
	30.75	21.87	23.69	24.77	28.11	23.93	29.50
Ct	26.57	21.16	23.11	23.03	28.81	31.68	29.78
	29.08	22.08	24.26	23.62	27.76	25.01	29.27
Ct médio	28.80	21.70	23.69	23.81	28.23	26.87	29.52

Protocolos avaliados: 1 – Solução de guanidina e ureia (2 M); 2 – Solução de ureia (2 M); 3 – Solução de guanidina (3 M) e ureia (4 M); 4 – Solução de guanidina (4 M); 5 – Solução de guanidina (5 M); 6 – solução de hidróxido de amônio (NH₄OH) (0.06 M). FONTE: O autor (2023).

Então, com o objetivo de se avaliar a possibilidade de melhorar as análises e sabendo que o cartão FTA, utilizado na etapa de purificação, apresenta na sua composição agentes que propiciam a lise (BURGOYNE et al., 2003), optou-se por realizar uma modificação no protocolo e retirar o Triton X-100 (TX-100).

Assim, a mistura do protocolo 2, composta por ureia (1.94 M), proteinase K (0.49 mg/mL) e PBS pH 7.4 (3.54 mM) (protocolo 2) apresentou os melhores resultados nas avaliações visuais, quanto a turbidez da solução e redução/dissolução do fragmento de pele suíno e, também, na detecção do gene *18S rRNA* por qPCR em termos de amplitude de fluorescência e Ct (TABELA 11). No tecido suíno utilizado como modelo, o Ct médio foi de 18.74 (variando de 17.45 a 19.40) para a detecção do gene *18S rRNA*.

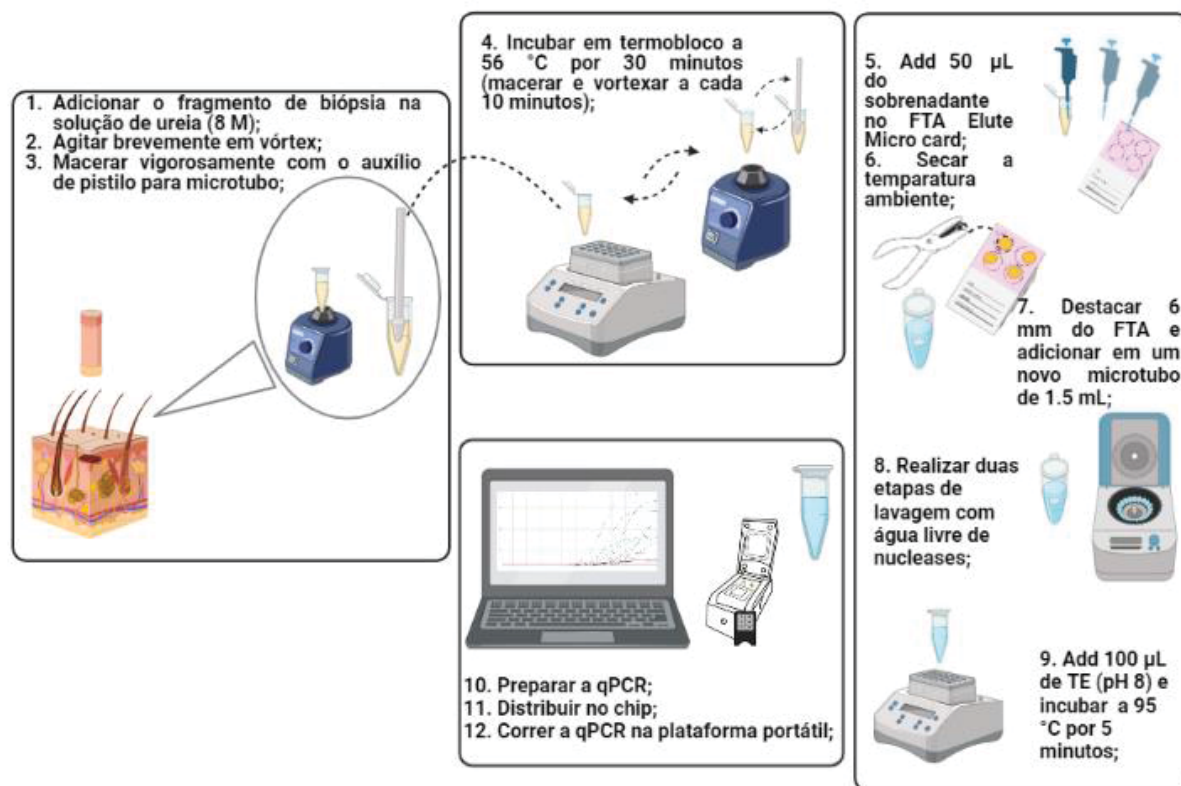
TABELA 11 - CTS OBTIDOS NAS REAÇÕES PARA A DETECÇÃO DO ALVO *18S rRNA* DE MAMÍFEROS EM MODELO DE PELE SUÍNA APÓS A EXTRAÇÃO PELO PROTOCOLO 2 COM E SEM A ADIÇÃO DE TRITON X-100

Protocolo 2 – Solução de ureia					
Réplicas/Dia	Com TX-100			Sem TX-100	
	1	2	3	1	2
1	21,87	24,88	21,69	17,45	19,40
	21,16	24,96	21,91	17,47	19,02
	22,08	24,70	21,70	17,45	19,30
2		23,71	20,95	18,50	18,47
		23,75	20,71	18,43	18,98
		23,73	21,43	18,36	19,03
3		25,22	21,87	19,21	19,18
		25,47	21,46	19,19	19,28
		25,86	21,88	19,26	19,27
Ct médio	21,70	24,70	21,51	18,37	19,10

FONTE: O autor (2023).

Entre os diferentes protocolos de eluição, os melhores resultados, também avaliados por meio da amplificação do gene *18S rRNA*, foram obtidos com o perfurador de 6 mm, e duas etapas de lavagem com 500 µL de água livre de nucleases, e incubação com 100 µL de TE (pH 8.0) a 95 °C por 5 minutos em termobloco. Uma representação esquemática do protocolo final completo é apresentada na FIGURA 7.

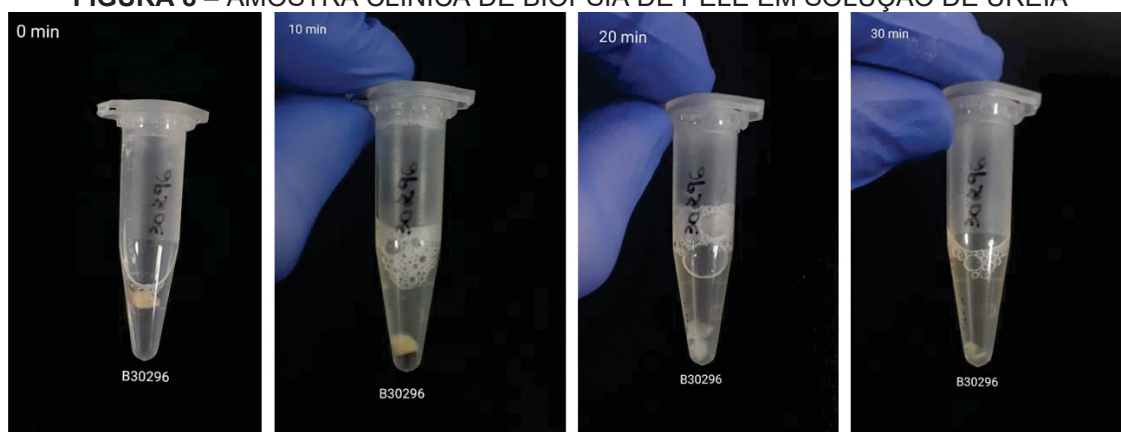
FIGURA 7 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DA METODOLOGIA *POINT-OF-CARE* DESENVOLVIDA PARA O AUXÍLIO NA TRIAGEM DE CASOS DE HANSENÍASE EM REGIÕES DE POUCA INFRAESTRUTURA



Esquema representativo do processo de extração de DNA a partir de biópsia de pele até a detecção molecular de *Mycobacterium leprae* por qPCR na plataforma portátil Q3-Plus. FONTE: O autor (2023).

Posteriormente, toda a metodologia desenvolvida, desde a extração de DNA a partir do protocolo simplificado de extração (protocolo 2) até a análise por qPCR para detecção dos alvos de *M. leprae* na plataforma portátil, foi avaliada por meio de amostras clínicas de biópsia de pele de pacientes com hanseníase (MB e PB) e pacientes com outras dermatoses (OD).

Na avaliação visual, durante a extração do material genético, observou-se redução do fragmento de biópsia de pele ou sua completa dissolução, alterando visivelmente a turbidez da solução (FIGURA 8). Obteve-se sucesso também na detecção do gene *18S rRNA*. Nas reações realizadas no equipamento padrão (QS-5), o Ct médio foi de 20.70 (variando de 17.24 a 24.17), enquanto no equipamento Q3-Plus, o Ct médio foi de 22.92 (intervalo de 19.36 a 30.54) (TABELA 12) (GRÁFICO 5).

FIGURA 8 – AMOSTRA CLÍNICA DE BIÓPSIA DE PELE EM SOLUÇÃO DE UREIA

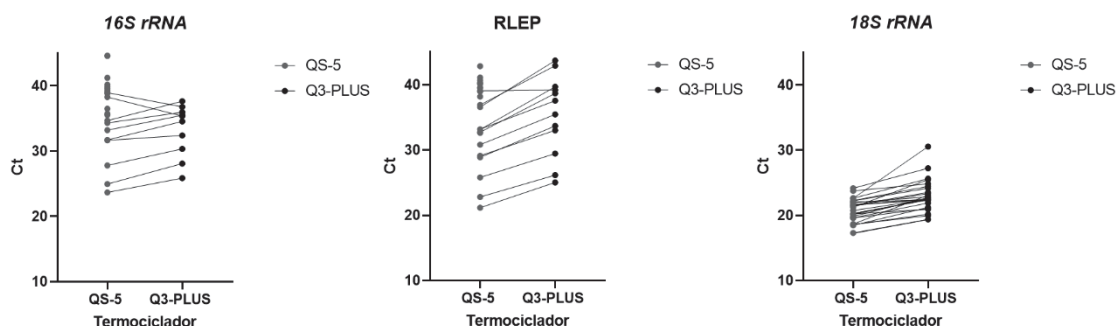
Observa-se redução do fragmento de biópsia de pele ao longo do tempo de incubação. Houve alteração, também, na turbidez da solução no decorrer dos 30 minutos de incubação. FONTE: O autor (2023).

TABELA 12 - DESFECHO CLÍNICO DAS AMOSTRAS DE BIÓPSIA DE PELE PRÉ-CARACTERIZADAS NO LAHAN E SEUS RESPECTIVOS VALORES DE CT NAS ANÁLISES DE qPCR PARA A DETECÇÃO DOS ALVOS *16S rRNA* E RLEP DE *Mycobacterium leprae* E CONTROLE INTERNO *18S rRNA* DE MAMÍFEROS NOS TESTES PARA AVALIAÇÃO DO PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO SIMPLIFICADO

Número	Desfecho clínico	Qiagen StepOne (LAHAN)	Sol. ureia Quantstudio 5			Sol. ureia Q3-Plus		
		<i>16S rRNA</i>	<i>16S rRNA</i>	RLEP	<i>18S rRNA</i>	<i>16S rRNA</i>	RLEP	<i>18S rRNA</i>
1	MB	22,80	31,65	28,88	18,66	32,40	33,68	23,12
2	MB	26,28	23,67	21,15	17,31	25,87	25,02	19,38
3	MB	26,06	24,95	22,81	18,47	28,09	26,14	21,22
4	MB	31,93	33,20	30,80	20,18	35,47	35,44	22,45
5	MB	34,93	31,70	29,11	17,24	34,54	33,00	19,36
6	MB	35,27	35,72	32,62	21,24	indeter.	indeter.	25,49
7	MB	25,36	27,81	25,80	20,75	30,33	29,46	22,46
8	MB	33,78	39,53	40,67	22,07	indeter.	indeter.	22,36
9	MB	35,44	34,67	33,18	19,60	37,62	37,55	21,05
10	PB	36,69	44,57	40,11	18,59	indeter.	indeter.	20,18
11	PB	37,50	40,16	38,18	22,24	indeter.	indeter.	24,16
12	PB	indeter.	36,47	39,56	23,75	indeter.	indeter.	24,84
13	PB	indeter.	35,52	36,57	20,23	indeter.	43,70	20,94
14	OD	indeter.	indeter.	39,48	22,61	indeter.	indeter.	30,54
15	OD	indeter.	indeter.	40,22	19,84	indeter.	indeter.	22,74
16	OD	indeter.	44,58	42,83	24,17	indeter.	indeter.	27,22
17	OD	36,87	41,20	38,96	22,64	indeter.	indeter.	25,62
18	OD	indeter.	indeter.	40,31	21,43	indeter.	indeter.	23,35
19	OD	indeter.	indeter.	38,25	20,30	indeter.	indeter.	22,43
20	OD	indeter.	indeter.	36,90	20,29	indeter.	42,90	22,36
21	OD	35,61	34,31	33,12	21,55	35,95	39,68	23,52
22	OD	indeter.	38,84	41,08	19,63	indeter.	indeter.	21,89
23	OD	indeter.	38,27	39,05	22,27	35,35	39,19	24,46
24	OD	indeter.	38,83	indeter.	21,94	indeter.	indeter.	22,84
25	OD	indeter.	39,83	indeter.	21,53	indeter.	indeter.	22,54
26	OD	indeter.	39,23	indeter.	21,69	indeter.	indeter.	22,29

Amostras clínicas de biópsia de pele extraídas por método comercial (Qiagen) e pré-caracterizadas no LAHAN e, também, extraídas pelo protocolo com solução de ureia (protocolo simplificado). Observa-se os Cts obtidos por cada um dos equipamentos utilizados na avaliação: StepOne utilizado nas análises padrão para detecção do alvo *16S rRNA* no LAHAN; Quantstudio-5 utilizado nas análises de forma pareada para detecção dos alvos *16S rRNA* e RLEP de *M. leprae* e controle interno humano *18S rRNA*, a partir do kit NAT Hans (IBMP); E Q3-Plus utilizado para a otimização das reações, objeto do presente estudo, para a detecção dos alvos *16S rRNA* e RLEP de *M. leprae* e controle interno humano *18S rRNA*, a partir dos mesmos oligonucleotídeos presentes no kit NAT Hans. FONTE: O autor (2023).

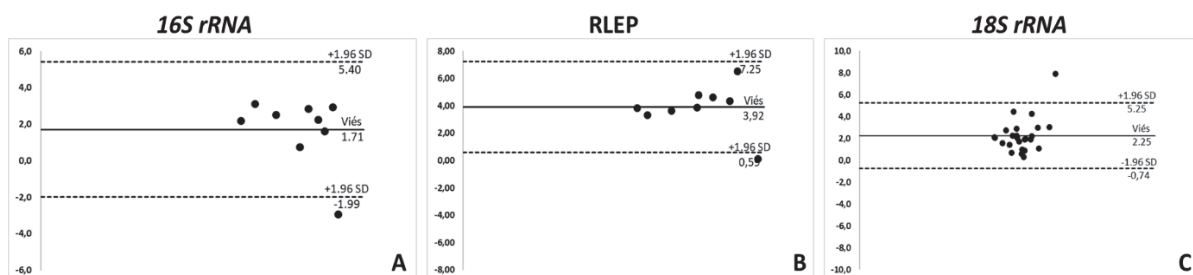
GRÁFICO 5 - GRÁFICOS DE CORRELAÇÃO DE CTS ENTRE OS ENSAIOS DE qPCR PARA OS ALVOS *16S rRNA* E RLEP DE *Mycobacterium leprae* E CONTROLE INTERNO HUMANO *18S rRNA*, REALIZADOS A PARTIR DE UM MESMO GRUPO DE AMOSTRAS CLÍNICAS EXTRAÍDAS PELO POR PROTOCOLO SIMPLIFICADO COM SOLUÇÃO DE UREIA, E ANALISADAS DE FORMA PAREADA NOS EQUIPAMENTOS QUANTSTUDIO 5 (QS-5) E Q3-PLUS



Gráficos de correlação de ciclos de *threshold* (Ct). Observa-se a diferença de Cts entre as amostras extraídas por protocolo simplificado com solução de ureia e analisadas de forma pareada nos equipamentos QS-5 e Q3-Plus. Cada um dos gráficos corresponde aos diferentes alvos detectados para *M. leprae* (*16S rRNA* e RLEP) e controle interno humano (*18S rRNA*) na detecção molecular. FONTE: O autor (2023).

Em teste de Bland-Altman conduzido com base no mesmo grupo de amostras, com intervalo de confiança de 95%, somente uma amostra não estava contida nesse intervalo para ambos os alvos. Para o alvo *16S rRNA*, a variação média de ciclos de *threshold* entre as amostras pareadas foi de 1.71 ciclos de *threshold* a mais para o equipamento Q3-PLUS (FIGURA 13). Por fim, para a detecção do alvo RLEP de *M. leprae*, foi observada a variação média de 3.92 ciclos de *threshold* a mais para o equipamento Q3-PLUS (FIGURA 13). A amostra que ficou fora do intervalo de confiança correspondia a um caso OD, ou seja, falso-positivo.

FIGURA 13 - ANÁLISES DE BLAND-ALTMAN REALIZADAS A PARTIR DOS ENSAIOS DE QPCR PARA OS ALVOS *16S rRNA* E RLEP DE *Mycobacterium leprae*, EM AMOSTRAS CLÍNICAS EXTRAÍDAS DE BIÓPSIA POR MEIO DO PROTOCOLO SIMPLIFICADO COM SOLUÇÃO DE UREIA, E ANALISADAS DE FORMA PAREADA NOS EQUIPAMENTOS QUANTSTUDIO-5 E Q3-PLUS



Análises de Bland-Altman nas amostras a partir de biópsia de pele extraídas pelo protocolo simplificado (protocolo 2) e reação de qPCR realizadas nos equipamentos QS-5 e Q3-PLUS. (A) Análises realizadas para o alvo *16S rRNA*. A variação média dos Cts foi de 1.71 ciclos a mais para o Q3-Plus. (B) Análises realizadas para o alvo RLEP. Foi observada variação média de 3.92 ciclos de *threshold* a mais para o equipamento Q3-Plus. (C) Análises realizadas para o controle interno *18S rRNA*. Foi observada variação média de 2.25 ciclos de *threshold* a mais para as leituras no equipamento Q3-Plus. FONTE: O autor (2023).

A classificação das amostras em positivas, negativas ou indeterminadas foi realizada com base nos valores de Ct determinados como *cutoff*, 39.5 para *16S rRNA* e 40.5 para RLEP. Nesse sentido, a reação de qPCR realizada no equipamento Q3-Plus obteve positividade para *M. leprae* em 34.6% (9/26) das amostras, enquanto 65.4% (17/26) das amostras foram negativas para o agente. Neste equipamento, não foram observadas amostras indeterminadas (TABELA 13).

Para aquelas análises realizadas no equipamento padrão (QS-5), 30.8% (8/26) foram positivas para o agente *M. leprae*, enquanto 65.4% (17/26) apresentaram resultado negativo. Neste equipamento 4% (1/26) das amostras apresentou resultado indeterminado (TABELA 13).

Os resultados cedidos pelo LAHAN obtiveram 42.3% (11/26) das amostras positivas para *M. leprae*, e 50% (13/26) das amostras com teste negativo. Nessas análises 7.7% (2/26) das amostras tiveram resultado indeterminado (TABELA 13).

TABELA 13 - DESFECHO CLÍNICO DAS AMOSTRAS DE BIÓPSIA DE PELE PRÉ-CARACTERIZADAS NO LAHAN POR MEIO DOS PROTOCOLOS PADRÃO E REAVALIADAS PELO PROTOCOLO SIMPLIFICADO COM SOLUÇÃO DE UREIA E qPCR PARA A DETECÇÃO DE *Mycobacterium leprae* NOS EQUIPAMENTOS QUANTSTUDIO-5 E Q3-PLUS

Número	Desfecho clínico	LAHAN StepOne	QUANTSTUDIO-5	Q3-PLUS
1	MB	Positiva	Positiva	Positiva
2	MB	Positiva	Positiva	Positiva
3	MB	Positiva	Positiva	Positiva
4	MB	Positiva	Positiva	Positiva
5	MB	Positiva	Positiva	Positiva
6	MB	Positiva	Indeterminada	Negativa
7	MB	Positiva	Positiva	Positiva
8	MB	Positiva	Negativa	Negativa
9	MB	Positiva	Positiva	Positiva
10	PB	Positiva	Negativa	Negativa
11	PB	Indeterminada	Negativa	Negativa
12	PB	Negativa	Negativa	Negativa
13	PB	Negativa	Negativa	Negativa
14	OD	Negativa	Negativa	Negativa
15	OD	Negativa	Negativa	Negativa
16	OD	Negativa	Negativa	Negativa
17	OD	Indeterminada	Negativa	Negativa
18	OD	Negativa	Negativa	Negativa
19	OD	Negativa	Negativa	Negativa
20	OD	Negativa	Negativa	Negativa
21	OD	Positiva	Positiva	Positiva
22	OD	Negativa	Negativa	Negativa
23	OD	Negativa	Negativa	Positiva
24	OD	Negativa	Negativa	Negativa
25	OD	Negativa	Negativa	Negativa
26	OD	Negativa	Negativa	Negativa

FONTE: O autor (2023).

Quanto aos parâmetros de sensibilidade e especificidade dos testes, a plataforma portátil (Q3-Plus) apresentou 53.84% e 84.61%, respectivamente (TABELA 14). Já as reações que foram analisadas pelo equipamento padrão (QS-5) apresentaram 58.33% de sensibilidade e 92.30% de especificidade. No que diz respeito à acurácia dos testes, no equipamento Q3-Plus foi de 69.23%, e para o equipamento QS-5 de 76.00%.

O valor preditivo positivo (VPP) para aquelas análises realizadas no equipamento Q3-Plus foi de 77.77% enquanto no QS-5 foi de 87.50%. O valor preditivo negativo (VPN) foi de 64.70% e 70.58% no equipamento Q3-Plus e QS-5, respectivamente.

Os resultados obtidos pelo Laboratório de Hanseníase (LAHAN) a partir da *sigleplex* qPCR para amplificação do gene *16S rRNA* de *M.leprae* foram cedidos ao

estudo. Para esse mesmo grupo de amostras a sensibilidade do teste foi de 83.33% e a especificidade de 91.66%. Quanto aos valores preditivo positivo e negativo, o teste resultou em 90.90% e 84.61%, respectivamente. Já a acurácia foi de 87.50%, nas análises realizadas no LAHAN.

TABELA 14 - PARÂMETROS DE SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE, ACURÁCIA, VPP E VPN DAS REAÇÕES DE qPCR REALIZADAS DE FORMA PAREADA

Parâmetros	Qiagen	Solução de Ureia	
	LAHAN StepOne	Quantstudio 5	Q3-Plus
Sensibilidade	83.3%	58.3%	53.8%
Especificidade	91.7%	92.3%	84.6%
Acurácia	87.5%	76.0%	69.2%
VPP*	90.9%	87.5%	77.8%
VPN*	84.6%	70.6%	64.7%

*VPP: Valor preditivo positivo; VPN: Valor preditivo negativo. Parâmetros de sensibilidade, especificidade, acurácia, VPP e VPN das análises de amostras clínicas extraídas por método padrão (Qiagen) e analisadas em termociclador padrão (StepOne) para a detecção do alvo *16S rRNA* de *M. leprae* no LAHAN. E parâmetros obtidos após análise do mesmo grupo de amostras clínicas extraídas pelo protocolo simplificado com solução de ureia (protocolo 2) e pareadas nos termocicladores Quantstudio-5 e Q3-Plus para a detecção dos alvos *16S rRNA* e RLEP de *M. leprae*. FONTE: O autor (2023).

7 DISCUSSÃO

A aplicabilidade de testes de triagem em locais com infraestrutura limitada e seu auxílio na busca ativa de pacientes mostra-se de extrema importância para que sejam alcançadas menores taxas de incidência da hanseníase (BRASIL, 2022; STEINMANN et al., 2017). Por saber da inexistência de um teste padrão-ouro, das limitações inerentes aos testes complementares e da clínica da doença, o desenvolvimento de reações de alta sensibilidade e especificidade em equipamentos portáteis, aliado à redução dos custos associados às técnicas e a sua simplificação, facilitam a implementação de medidas preventivas e de controle na cadeia de transmissão da doença.

Inúmeros são os trabalhos envolvendo a detecção molecular de diferentes alvos de *M. leprae* presentes na literatura (GURUNG et al., 2019; TORRES et al., 2021; MARTINEZ et al., 2014). As técnicas de PCR convencional, nested-PCR e qPCR demonstram relevância no auxílio ao diagnóstico clínico da hanseníase, triagem e acompanhamento de casos. A média superior de sensibilidade de 78.5% e especificidade de 89.3% quando comparada as médias de testes sorológicos como ELISA (63.8% de sensibilidade e 91.0% de especificidade) corroboram o emprego da qPCR em associação a avaliação clínica (GURUNG et al., 2019). Esses parâmetros variam de acordo com a categoria da amostra, forma clínica e alvo de interesse, entretanto, testes moleculares são especialmente promissores nas avaliações a partir de casos paucibacilares, em que se tem uma menor carga bacilar envolvida (RUDEEANEKSIN et al., 2008; MANTA et al., 2020).

No presente trabalho, foi estabelecida a otimização das reações de qPCR em um plataforma portátil de análise (Q3-Plus), a partir dos oligonucleotídeos contidos no primeiro kit de diagnóstico nacional para a hanseníase, aprovado pela ANVISA (Kit Nat Hans – IBMP). Por ser um equipamento que atende ao conceito *point-of-care*, devido suas pequenas dimensões, os volumes das reações foram otimizados para 5 µL, e com isso foi necessária a alteração das concentrações de oligonucleotídeos e do *mastermix* empregado nas reações. Apesar disso, o Q3-Plus apresentou excelentes valores de eficiências, muito próximos aos do equipamento padrão (Quantstudio - QS-5) o que demonstra a aplicabilidade da plataforma nas análises.

A eficiência de uma reação está ligada a duplicação de forma exponencial do material alvo ao longo da análise. Sabe-se que fatores como a pureza e a

concentração do alvo na amostra e dos reagentes empregados, assim como o volume final da reação de qPCR são alguns determinantes da eficiência da técnica (SVEC et al., 2015). Embora o volume final da reação no equipamento Q3-Plus seja cinco vezes menor que o volume empregado nas reações analisadas no equipamento padrão, os valores de eficiência se mantiveram próximos a 100%, o que é desejável para esse tipo de análise (SVEC et al., 2015).

Acredita-se que a proporção do volume de material genético adicionado a reação final possa ter relação com os maiores valores de eficiência encontrados no Q3-Plus. No equipamento portátil essa proporção corresponde a 40% do volume final, enquanto no QS-5 as reações contam com 20% do volume final correspondente ao material genético. Ainda assim, não foi observada interferência na linearidade das reações, ou seja, para um mesmo grupo de amostra (DNA sintético) as reações nos diferentes equipamentos mantiveram a duplicação do DNA de forma exponencial até o mesmo ponto de menor concentração de DNA alvo (10^1 cópias/ μ L).

Trabalhos anteriores com a otimização de reações para detecção molecular de *Plasmodium* spp., *Trypanosoma cruzi* e *Mycobacterium tuberculosis* já haviam observado eficiências maiores no equipamento portátil quando comparado com o padrão (ABI7500) (ALI et al., 2020; RAMPAZZO et al., 2019) assim como o encontrado no presente estudo, o que corrobora a possibilidade desse parâmetro ser esperado para o equipamento Q3-Plus.

A determinação do limiar de fluorescência (*threshold*) é uma importante ferramenta que assegura que amplificações inespecíficas ou outros interferentes possam gerar resultados não verdadeiros nos testes moleculares de qPCR. Esse parâmetro pode ser determinado por meio de análises numéricas ou de forma visual pelo operador (CARAGUEL et al., 2011). Apesar de subjetivo, no presente trabalho esse parâmetro foi definido manualmente pelo operador, por meio da observação da amplitude de fluorescência das reações em amostras conhecidas (FIGURA 3). Embora o equipamento permita o “*threshold* automático” foi observado que no canal de leitura VIC para o alvo RLEP as amostras pré-caracterizadas como negativas apresentavam amplitude de fluorescência basal (abaixo de 150 unidades de fluorescência), o que gerava ao final da corrida Cts inespecíficos na faixa de 20 a 22.

Acredita-se que as alterações nas concentrações dos oligonucleotídeos iniciadores e sondas, além do aumento na proporção de material genético que compõem as reações possam ter favorecido a ocorrência das amplificações

inespecíficas. No entanto, por terem sido observadas principalmente na detecção do alvo RLEP, é provável que tenham relação também com a sua característica multicópia, a qual determina uma maior sensibilidade e menor especificidade para o alvo quando comparado ao *16S rRNA* (MARTINEZ et al., 2011). Uma vez estabelecido o limiar em 150 unidades de fluorescência para RLEP, os resultados passaram a ficar de acordo com as amostras pré-analisadas.

As reações a partir do DNA sintético (gBlock®) em ambos os equipamentos apresentaram linearidade até 10^1 cópias/ μ L, e após esse intervalo as amplificações passaram a acontecer de forma estocástica (Gráfico 1). Nas análises de genomas equivalentes de *M. leprae* a linearidade nos equipamentos se deu até 10^2 genomas equivalentes/ μ L, no entanto, após esse intervalo o equipamento Q3-Plus perdeu a sensibilidade analítica para o alvo *16S rRNA*, enquanto o QS-5 passou a ter amplificações de forma estocástica (Gráfico 2). Para o alvo RLEP as amplificações se mantiveram após o intervalo linear nos dois equipamentos. Por se tratar de um alvo multicópia é esperada uma maior sensibilidade analítica (COLE et al., 2001). A perda da linearidade das reações implica na ocorrência de amplificações de forma estocástica, ou seja, aleatória, podendo interferir especialmente nos casos classificados como paucibacilares, devido a baixa carga bacilar (MARTINEZ et al., 2014).

A partir da análise do limite de detecção (LOD95%) foi possível confirmar a maior sensibilidade para o alvo RLEP. As reações com DNA purificado de *M. leprae* obtiveram valores de LOD de 113.23 genomas-equivalentes/ μ L para o gene *16S rRNA* e 19.72 genoma-equivalentes/ μ L para o RLEP no Q3-Plus. Em trabalho anterior de MANTA et al. (2022), os autores relataram LOD de 126 genomas-equivalentes/reação para o gene *16S rRNA* e 1.3 genomas-equivalentes/reação para o alvo RLEP, a partir das reações por meio do kit Nat Hans em termociclador padrão (ABI7500). Essa proximidade de valores assegura a boa sensibilidade analítica do instrumento portátil. É importante ressaltar que a diferença entre o LOD95% para os alvos é esperada já que o RLEP se trata de um elemento repetitivo no genoma apresentando cerca de 36 cópias (MANTA et al., 2022; COLE et al., 2001).

Por meio das avaliações intra e interoperadores foi demonstrada a boa repetibilidade e reprodutibilidade das reações, análises fundamentais que possibilitam a observação das variabilidades inerentes ao sistema de medição (repetibilidade) e a variação esperada quando a reação é conduzida por diferentes operadores

(reprodutibilidade). Os resultados encontrados demonstraram coeficientes de variação abaixo de 5%. Os três pontos das avaliações intra-operadores que ficaram acima dessa variação podem ser explicados já que correspondem as menores concentrações de DNA alvo, estando fora ou no limite do intervalo linear das reações de qPCR, onde a probabilidade de amplificação diminui e passa a ser ao acaso.

Utilizando as análises de Bland-Altman nas amostras clínicas pré-caracterizadas, foi observada uma variação média para o alvo *16S rRNA* foi de 1.71 Cts a mais no equipamento Q3-Plus quando comparado com o QS-5. Já para o alvo RLEP a variação encontrada foi de aproximadamente 4.00 Cts a mais nas amostras avaliadas no Q3-Plus. Esses valores estão muito próximos dos relatados por RAMPAZZO et al. (2019) a partir da otimização do equipamento Q3 para o uso na detecção molecular de *Trypanosoma cruzi* e *Plasmodium* spp. Os autores observaram a diferença de 2 a 4 Cts a mais nas reações para a detecção de *T. cruzi* no equipamento Q3-Plus em comparação com o ABI7500, e de 2 a 3 Cts a mais no equipamento Q3-Plus nas reações para detecção de *Plasmodium* spp.. As variações médias de Cts observadas entre os diferentes trabalhos corroboram a determinação de um padrão de amplificação do equipamento portátil.

A diferença de Cts observada entre os alvos *16S rRNA* e RLEP no equipamento QS-5, na faixa de três a quatro Cts a menos para o alvo RLEP, é devida a sua característica multicópia (MANTA et al., 2022; COLE et al., 2001). Esse mesmo padrão não foi observado no Q3-Plus devido aos ajustes de *threshold* necessários. No entanto, o objetivo do método molecular, no que diz respeito a detecção dos alvos de interesse, se manteve apesar das diferenças observadas, e os resultados finais alcançados pela plataforma portátil continuaram correspondentes aos das amostras pré-caracterizadas.

Sabe-se que para o desenvolvimento de testes de triagem é desejável uma alta sensibilidade, ainda que isso resulte em falsos-positivos, pois a positividade nesses testes permitem o encaminhamento e a maior investigação da suspeita a fim de se obter com maior precisão e precocidade o diagnóstico da patologia (OMS, 2020). Inicialmente, com a otimização, definiu-se considerar as amplificações características, ou seja, não estipular um ponto de corte (*cutoff*). No entanto, por saber dos estigmas que permeiam a doença e dos prejuízos psicossociais que causam aos hansenianos, além dos efeitos colaterais do tratamento (DEPS; CRUZ, 2020; VAN BRAKEL et al., 2019; WHITE, 2008), foi determinado um *cutoff* para a maior

especificidade do teste, ainda que isso cause a perda de prováveis positivos, principalmente nos casos paucibacilares.

Os resultados obtidos a partir da otimização das reações na plataforma portátil, no que diz respeito aos parâmetros ópticos, eficiência de reação e sensibilidade analítica foram confirmados em amostras clínicas pré-caracterizadas extraídas pelo kit comercial (Qiagen). Análises de sensibilidade, especificidade e acurácia próximos aos dos testes de qPCR já estabelecidos no equipamento padrão corroboram a aplicabilidade do *point-of-care testing*. Ainda assim, é observada a ocorrência de falsos-negativos, principalmente no que diz respeito aos casos paucibacilares (Martinez et al., 2011; BOROWSKY DA ROSA et al., 2013). A baixa carga bacteriana dificulta a detecção desses casos. No entanto a qPCR ainda é considerada a melhor técnica para ser utilizada como teste de triagem ou diagnóstico complementar, devido a sua alta sensibilidade e especificidade, principalmente na detecção dos casos PB (MARTINEZ et al., 2011; WICHITWECHKARN et al., 1995).

Quanto aos métodos minimamente invasivos (*tape strip* e microagulhamento) analisados para a coleta de material biológico para o diagnóstico de hanseníase, o baixo rendimento de DNA após a extração já havia sido relatado em outros trabalhos (KEURENTJES et al., 2021; TASLIMI et al., 2017). Essa limitação da técnica de coleta pode ser crucial especialmente para o diagnóstico da hanseníase já que a clínica da doença é variada e particularidades inerentes aos locais de predileção do bacilo dificultam seu acesso (EBENEZER et al., 2022). Ainda que a biópsia de pele ou nervo seja uma técnica invasiva que necessita de infraestrutura ambulatorial e profissional capacitado, mostra-se a mais aplicável e sensível para o diagnóstico da patologia (MARTINEZ et al., 2014). Outros estudos que avaliaram a aplicação de materiais obtidos por técnicas menos invasivas como sangue total, swab oral e swab de lesão demonstram a baixa sensibilidade na detecção molecular do bacilo, especialmente nos casos clínicos classificados como PB (MANTA et al., 2020; BOROWSKY DA ROSA et al., 2013).

Sabe-se que a fase pré-analítica é cercada de limitações que podem interferir no diagnóstico molecular. Isso porque necessita de coleta adequada, que facilite o acesso ao microrganismo de interesse, e de método de extração eficiente que possibilite um analito de qualidade, ou seja, em altas concentrações e pureza. Nesse sentido, a extração de DNA é etapa crucial e, ainda, a mais onerosa no diagnóstico molecular. Devido a essa importância, kits comerciais são otimizados para diferentes

categorias de amostras (YANG et al., 2020; KUMAR; MUGUNTHAN, 2018; MCKENZIE et al., 1997).

Os kits comerciais para extração de DNA a partir de tecido apresentam em média o valor de 215 dólares para a extração de 50 amostras (DNeasy Blood & Tissue Kit), enquanto o valor para 100 cartões FTA é de aproximadamente 526 dólares (Qiagen FTA Elute Micro Card). No entanto, deve-se considerar que os cartões não só facilitam o armazenamento e transporte do material, como também apresentam propriedades que facilitam a lise e denaturação proteica, para a exposição do DNA (SMITH; BURGOYNE, 2004). Além disso, por serem constituídos de fibra de celulose, material cujo o DNA apresenta afinidade, podem garantir a estabilização e viabilidade das moléculas em temperatura ambiente, diferentemente dos kits comerciais de extração, que são desenvolvidos apenas para a extração, sendo necessário o controle de temperatura e condições de armazenamento da amostra antes e após essa etapa (AYE et al., 2011; SMITH; BURGOYNE, 2004).

O protocolo de extração simplificado é uma importante ferramenta que poderá auxiliar a detecção de *M. leprae* em ambulatorios de regiões remotas, carentes de recursos, e em centros de pesquisas, pois garante a independência de kits comerciais (ALI et al., 2017). A simplificação nas etapas de extração proporciona a aplicabilidade das análises no conceito *point-of-care*, dependendo apenas de uma mini centrífuga e termobloco, além de um menor tempo até a conclusão. Apesar da melhora na sensibilidade das reações ainda depender das coletas via biópsia de pele, procedimento cirúrgico, este teste poderá ser realizado em ambulatorios do sistema primário de atenção à saúde, mais próximos a população.

Entre os protocolos de extração avaliados, alguns agentes caotrópicos como a ureia, guanidina e hidróxido de amônio (NH₄OH), foram considerados (TABELA 2). Além disso, após a etapa de lise, com cada uma das soluções avaliadas, o lisado foi depositado em cartões FTA e armazenados a temperatura ambiente até que estivessem completamente secos. Neste estudo, os cartões auxiliaram nas etapas de isolamento e purificação do material genético. Por possuir afinidade as fibras de celulose do cartão, foi possível a recuperação do DNA após as etapas de lavagem.

Os cartões FTA (Whatman®) são constituídos de fibras de celulose ou outras com afinidade ao material genético (DNA). Além disso na sua composição podem apresentar reagentes capazes de auxiliar na etapa de lise celular e denaturação proteica, como o dodecilsulfato de sódio (SDS) e o lauril sarcosinato de sódio (SLS),

facilitando a exposição do DNA. Foram desenvolvidos com o objetivo de facilitar o transporte e armazenamento das amostras a temperatura ambiente, além de garantir a viabilidade do DNA para análises moleculares de interesse (BURGOYNE *et al.*, 2003; AYE *et al.*, 2011). Requerem de mínimo espaço físico para seu acondicionamento, e possuem baixo risco de contaminação cruzada entre as amostras (Da CUNHA SANTOS, 2018).

Nas avaliações do protocolo de extração para biópsias de pele por meio da solução de guanidina (6 M), foi observada uma menor dissolução do fragmento de tecido. Essa menor capacidade de dissolver não é desejada pois pode interferir na recuperação do material genético da bactéria. Embora a solução de guanidina seja amplamente empregada em tampões de kits comerciais e em protocolos de extração relatados na literatura, pode não ter sido tão eficaz nas amostras do estudo devido ao protocolo simplificado não estabelecer um tempo de incubação em termobloco prolongado. Esse tempo, superior a uma hora, é frequentemente definido nos kits comerciais e em protocolos de artigos científicos que realizam a extração a partir de tecidos (BANERJEE *et al.*, 2010; QIAGEN, 2006).

Além disso, por ser independente de membrana de sílica e de precipitação com a utilização de solventes orgânicos e centrifugação, a etapa de purificação do presente trabalho pode ter comprometido a pureza do material extraído. A qPCR é uma técnica que emprega o uso de enzimas e cofatores que dependem de pH, temperatura e concentração adequadas para sua eficiência, e devido a isso pode sofrer inibição por uma série de fatores, entre eles resíduos de reagentes utilizados nas etapas de extração (ALI *et al.*, 2017; SIDSTEDT *et al.*, 2020). Sendo assim, possivelmente o resíduo da solução de guanidina ou das proteínas estruturais do tecido podem ter interferido na reação. Essas inferências são possíveis por meio da análise dos Cts obtidos principalmente nas reações para o alvo *18S rRNA* que resultaram em valores com faixa de variação maior entre as amostras, e mais altos quando comparados ao protocolo padrão (kit Qiagen)(TABELA 9).

Quanto a aplicação de solução de ureia (8 M) para a extração de DNA a partir de amostras de tecido, os resultados, no que se diz respeito a melhor dissolução do fragmento de pele, podem ter relação com a melhora na atividade da proteinase K proporcionada pelas altas concentrações de ureia, além do composto poder ter auxiliado na preservação do material genético obtido, como relatado em trabalhos anteriores (AHMED, 1993; HILZ *et al.*, 1975).

A melhor qualidade na dissolução foi observada também por meio da qPCR para o alvo *18S rRNA* humano, já que os Cts foram anteriores aos encontrados nas extrações pelos demais protocolos e mais homogêneos entre as suas réplicas.

No que diz respeito às análises para os alvos de *M. leprae* (*16S rRNA* e RLEP), houve perda na sensibilidade das reações a partir dos extraídos pelo protocolo simplificado, notada pelo aumento de Ct, no alvo *16S rRNA*, quando comparado ao teste realizado no LAHAN (*16S rRNA*), considerado padrão. Sendo assim, sugere-se que uma maior interferência possa estar relacionada com a qualidade da extração do material genético do bacilo ou por resíduos da extração que não foram removidos adequadamente nas etapas de purificação/lavagem.

Embora avaliadas em duas condições distintas, no equipamento QS-5 por meio do kit NAT Hans e no Q3-Plus com as otimizações do presente estudo, as amostras extraídas pelo protocolo simplificado com solução de ureia apresentaram parâmetros de sensibilidade, especificidade e acurácia muito próximos. Reforçando a aplicabilidade do Q3-Plus nas análises independentes do equipamento padrão, e apontando para a possibilidade da perda de qualidade na etapa de extração do material, o que compromete a fase analítica.

Essa diminuição na sensibilidade afeta principalmente os casos paucibacilares, como foi observada nas amostras do estudo (TABELA 13) em que não foi possível detectar nenhum dos casos classificados como PB. Esse achado aponta para a necessidade de uma maior otimização do protocolo de extração e de um maior número de amostras classificadas como PB para a determinação de parâmetros que possam favorecer a sua detecção molecular.

A inexistência de um teste considerado “padrão-ouro” e as diferentes formas clínicas que compreendem a hanseníase exigem a associação entre as técnicas semiológicas empregadas pelo clínico e os exames complementares para o auxílio na precisão do diagnóstico da patologia (BRASIL, 2022). A hanseníase é uma patologia que tem seu diagnóstico majoritariamente baseado na clínica do paciente, sendo assim, é importante o incentivo ao desenvolvimento de testes que possam auxiliar o clínico, diminuindo a subjetividade e aumentando a chance de um diagnóstico precoce que possa ser aplicado a diferentes populações (BRASIL, 2022; STEINMANN et al., 2017).

Por se tratar de uma avaliação inicial, acredita-se que o presente trabalho seja capaz de ajudar na superação de limitações inerentes ao acesso diagnóstico dos

casos de hanseníase e promissor para o auxílio nas buscas ativas da doença. Como perspectivas futuras para o estudo, o aumento do número de amostras, e a avaliação de coletas minimamente invasivas serão alvo para a uma maior otimização de todo o protocolo envolvido nas reações para a detecção de *M.leprae*, de forma a propiciar resultados mais consistentes.

Ainda assim, ressaltamos a importância do emprego do teste de triagem, apresentado neste estudo, para a democratização do acesso ao diagnóstico de hanseníase por toda a população, principalmente em territórios afastados dos grandes centros, onde se têm carência de recursos, assistência, saúde e educação. O presente trabalho, reforça, também, a necessidade do fomento de discussões sobre a amplitude de questões que permeiam o diagnóstico da hanseníase, e a importância da educação em saúde para que informações verdadeiras sobre a doença atinjam a população em sua totalidade. O entendimento e o atendimento de todas essas questões são fundamentais para que sejam solucionadas as limitações e os altos índices de incidência da doença. A disponibilização da ferramenta para auxílio dos profissionais de saúde pode favorecer o diagnóstico com maior acurácia e precocidade. No entanto, é importante que os profissionais conheçam a doença e as ferramentas disponíveis, para que os estigmas sociais e a negligência sejam superados.

8 CONCLUSÃO

A otimização das reações de qPCR na plataforma portátil Q3-Plus para auxílio no diagnóstico da hanseníase apresentou potencial promissor para a aplicação da tecnologia completa como ferramenta auxiliar aos profissionais de saúde na suspeição de casos. Quanto as técnicas de coleta minimamente invasivas (*tape-stripping* e microagulhamento), observou-se uma baixa recuperação de material biológico e DNA para emprego na detecção molecular de *M. leprae*. A baixa concentração de DNA obtida após a extração do material interfere diretamente na qualidade da fase analítica e pós-analítica. Sendo assim, a biópsia de pele, amostra padrão frequentemente utilizada para o diagnóstico da patologia, continua sendo a que melhor contribui para a sensibilidade analítica dos testes.

Entre as soluções de lise avaliadas, a solução com ureia (8 M) foi a que apresentou os melhores resultados tanto na avaliação visual, no que diz respeito a dissolução do fragmento e alteração da turbidez do meio, quanto na avaliação por qPCR para a detecção do gene *18S rRNA* humano. As demais soluções demonstraram alteração de viscosidade do meio, e possível inibição na reação molecular, o que interferiu na sensibilidade analítica do método.

A solução tecnológica completa (extração de DNA por protocolo simplificado e análise na plataforma portátil) apresentou resultados promissores. Apesar disso, no que diz respeito a sensibilidade do teste foi observada a necessidade de uma maior otimização capaz de possibilitar o aumento na detecção dos casos paucibacilares.

REFERÊNCIAS

AHMED, F. E. Urea facilitates quantitative estimation of DNA damage in Situ by preventing its degradation. **Analytical Biochemistry**, v. 210, n. 2, p. 253-257, 1993.

ALI, N.; BELLO, G. L.; ROSSETTI, M. L. R.; KRIEGER, M. A.; COSTA, A. D. T. Demonstration of a fast and easy sample-to-answer protocol for tuberculosis screening in point-of-care settings: A proof of concept study. **PLoS ONE**, v. 15, n. 12, 2020.

ALI, N.; RAMPAZZO, R. D. C. P.; COSTA, A. D. T.; KRIEGER, M. A. Current Nucleic Acid Extraction Methods and Their Implications to Point-of-Care Diagnostics. **BioMed Research International**, 2017.

ALTMAN, D. G.; BLAND, J. M. Measurement in Medicine: The Analysis of Method Comparison Studies. **The Statistician**, v. 32, n. 3, p. 307-317, 1983.

ARYA, M.; SHERGILL, I. S.; WILLIAMSON, M.; et al. Basic principles of real-time quantitative PCR. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 5, n. 2, p. 209-219, 2005.

AYE, K. S.; MATSUOKA, M.; KAI, M.; et al. FTA card utility for PCR detection of *Mycobacterium leprae*. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 64, n. 3, p. 246-248, 2011.

BANERJEE, S.; SARKAR, K.; GUPTA, SOMA; et al. Multiplex PCR technique could be an alternative approach for early detection of leprosy among close contacts - a pilot study from India. **BMC Infectious Diseases**, v. 10, n. 252, 2010.

BARBIERI, R. R.; MANTA, F. S. N.; MOREIRA, S. J. M.; et al. Quantitative polymerase chain reaction in paucibacillary leprosy diagnosis: A follow-up study. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 3, 2019.

BERNARDES-FILHO, F.; LIMA, F. R.; VOLTAN, G.; DE PAULA, N. A.; FRADE, M. A. C. Leprosy case series in the emergency room: A warning sign for a challenging diagnosis. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 25, n. 5, 2021.

BOROWSKY DA ROSA, F.; COSTA DE SOUZA, V.; PIRES DE ALMEIDA, T. A.; et al. Detection of *Mycobacterium leprae* in saliva and the evaluation of oral sensitivity in patients with leprosy. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 5, p. 572-577, 2013.

BRASIL. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Hanseníase**. Brasil, 2022. Publicado em: 20 jul. 2022. Atualizado em: 03 nov. 2022.

BÜHRER, S. S.; SMITS, H. L.; GUSSENHOVEN, G. C.; VAN INGEN, C. W.; KLATSER, P. R. A simple dipstick assay for the detection of antibodies to phenolic glycolipid-I of *Mycobacterium leprae*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 58, n. 2, p. 133-136, 1998.

BÜHRER-SÉKULA, S.; SMITS, H. L.; GUSSENHOVEN, G. C.; et al. Simple and fast lateral flow test for classification of leprosy patients and identification of contacts with high risk of developing leprosy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 5, p. 1991-1995, **2003**.

BURD, E. M. Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 3, p. 550-576, **2010**.

BURGOYNE, L. A.; SMITH, M.; BUTT, N. **Dry solid medium for storage and analysis of genetic material**. US 6627226B2. Depósito: 13 mar. 2001. Concessão: 30 set. 2003.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; et al. The MIQE Guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611-622, **2009**.

CARAGUEL, C. G. B.; STRYHN, H.; GAGNÉ, N.; DOHOO, I. R.; HAMMELL, K. L. Selection of a cutoff value for real-time polymerase chain reaction results to fit a diagnostic purpose: Analytical and epidemiologic approaches. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, n. 1, p. 2-15, **2011**.

CEREDA, M.; COCCI, A.; CUCCHI, D.; et al. Q3: A compact device for quick, high precision qPCR. **Sensors (Switzerland)**, v. 18, n. 8, **2018**.

COLE, S. T.; SUPPLY, P.; HONOUR, N.; COLSTON, O. J. Repetitive sequences in *Mycobacterium leprae* and their impact on genome plasticity. **Leprosy Review**, v. 72, n. 4, p. 449-461, **2001**.

DA CUNHA SANTOS, G. FTA cards for preservation of nucleic acids for molecular assays a review on the use of cytologic/tissue samples. Archives of Pathology and Laboratory Medicine. **Arch Pathol Lab Med**, v. 142, n. 3, p. 308-312, **2018**.

DEPS, P.; CRUZ, A. Why we should stop using the word leprosy. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 20, n. 4, p. 75-78, **2020**.

DERMATOLOGY ATLAS. 1999-2023. Disponível em:
<https://www.atlasdermatologico.com.br/>. **Acesso em: 23 jul. 2023.**

DHARMAWAN, Y.; FUADY, A.; KORFAGE, I. J.; RICHARDUS, J. H. Delayed detection of leprosy cases: A systematic review of healthcare-related factors. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 16, n. 9, **2022**.

DINEVA, M. A.; MAHILUM-TAPAY, L.; LEE, H. Sample preparation: a challenge in the development of point-of-care nucleic acid-based assays for resource-limited settings. **The Analyst**, v. 132, 1193-1199, **2007**.

DINIZ, L. M.; MACIEL, L. B. Leprosy: clinical and epidemiological study in patients above 60 years in Espírito Santo State-Brazil. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 93, n. 6, p. 824-828, **2018**.

EBENEZER, G. J.; PENA, M. T.; DANIEL, A. S.; et al. *Mycobacterium leprae* induces Schwann cell proliferation and migration in a denervated milieu following

intracutaneous excision axotomy in nine-banded armadillos. **Experimental Neurology**, v. 352, n. 114053, **2022**.

FINE, P. E. M.; JOB, C. K.; MCDUGALL, A. C.; MEYERS, W. M.; PONNIGHAUS, J. M. Comparability among histopathologists in the diagnosis and classification of lesions suspected of leprosy in Malawi. **International Journal of Leprosy**, v. 82, n. 6, p. 810-817, **1986**.

FROES, L. A. R.; TRINDADE, M. A. B.; SOTTO, M. N. Immunology of leprosy. **International Reviews of Immunology**, v. 62, n. 4, p. 547-557, **2022**.

GARBINO, J.; NERY, J.; VIRMOND, M.; et al. Hanseníase : Diagnóstico e Tratamento da Neuropatia. Projeto Diretrizes – Secretaria Estadual de Saúde - SP, **2003**.

GURUNG, P.; GOMES, C. M.; VERNAL, S.; LEEFLANG, M. M. G. Diagnostic accuracy of tests for leprosy: a systematic review and meta-analysis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 11, p. 1315-1327, **2019**.

HENRY, M.; GALAN, N.; TEASDALE, K.; et al. Factors Contributing to the Delay in Diagnosis and Continued Transmission of Leprosy in Brazil – An Explorative, Quantitative, Questionnaire Based Study. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, **2016**.

HILZ, H.; WIEGERS, U.; ADAMIETZ, P. Stimulation of Proteinase K Action by Denaturing Agents: Application to the Isolation of Nucleic Acids and the Degradation of 'Masked' Proteins. **European Journal of Biochemistry**, v. 56, n. 1, p. 103-108, **1975**.

HIMMELREICH, R.; WERNER, S. **Method F Method for isolating and purifying nucleic acids**. US 2012/0130061A1. Depósito: 02 set. 2009. Concessão: 29 mar. 2011.

HWANG, J. H.; JEONG, H.; LEE, NAHYUN; et al. Ex vivo live full-thickness porcine skin model as a versatile in vitro testing method for skin barrier research. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 2, p. 1-16, **2021**.

JUNG, W.; HAN, J.; CHOI, J. W.; AHN, C. H. Point-of-care testing (POCT) diagnostic systems using microfluidic lab-on-a-chip technologies. **Microelectronic Engineering**, v. 132, p. 46-57, **2015**.

JÚNIOR, J. F. M.; RAMOS, A. C. V.; BERRA, T. Z.; et al. Clusters of risk for the occurrence of leprosy and disabilities in children under 15 years of age in Cuiabá: a geospatial study. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 26, **2023**.

KEURENTJES, A. J.; JAKASA, I.; KEZIC, S. Research Techniques Made Simple: Stratum Corneum Tape Stripping. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 141, n. 5, p. 1129-1133, **2021**.

KUMAR, M.; MUGUNTHAN, M. Evaluation of three DNA extraction methods from fungal cultures. **Medical Journal Armed Forces India**, v. 74, n. 4, p. 333-336, **2018**.

MADAMET, M.; AMALVICT, R.; BENOIT, N.; PRADINES, B. Assessment of a Commercial Real-Time PCR Assay (Vitassay qPCR Malaria 5 Test) to Detect Human Malaria Infection in Travelers Returning to France. **Diagnostics**, v. 12, n. 11, p. 2747, **2022**.

MACIEIRA, S. Aspectos microbiológicos do *Mycobacterium leprae*. **Noções de hansenologia**. Bauru: Centro de estudos Dr Reynaldo Quagliato. Instituto Lauro de Souza Lima, **2000**.

MANTA, F. S. DE N.; JACOMASSO, T.; RAMPAZZO, R. DE C. P.; et al. Development and validation of a multiplex real-time qPCR assay using GMP-grade reagents for leprosy diagnosis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 16, n. 2, p. 1–19, **2022**.

MANTA, F. S. DE N.; LEAL-CALVO, T.; MOREIRA, S. J. M.; et al. Ultra-sensitive detection of *Mycobacterium leprae*: DNA extraction and PCR assays. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 5, **2020**.

MARTINEZ, A. N.; LAHIRI, R.; PITTMAN, T. L.; et al. Molecular determination of *Mycobacterium leprae* viability by use of real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, p. 346, **2009**.

MARTINEZ, A. N.; RIBEIRO-ALVES, M.; SARNO, E. N.; MORAES, M. O. Evaluation of qPCR-Based assays for leprosy diagnosis directly in clinical specimens. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 10, **2011**.

MARTINEZ, A. N.; TALHARI, C.; MORAES, M. O.; TALHARI, S. PCR-Based Techniques for Leprosy Diagnosis: From the Laboratory to the Clinic. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 4, **2014**.

MCKENZIE, D.; MCLEAN, M.; MUKERJI, S.; GREEN, M. User-Developed Protocol : Isolation of total RNA from plant tissues using the RNeasy® Plant Mini Kit ; alternative procedure. **Plant Dis.**, v. 81, n. 2, p. 222-226, **1997**.

MI, Z.; LIU, H.; ZHANG, F. Advances in the Immunology and Genetics of Leprosy. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. 567, **2020**.

MIRA, M. T.; ALCAÏS, A.; VAN THUC, H.; et al. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. **Nature**, v. 427, p. 636-640, **2004**.

NEVES, K. V. R. N.; MACHADO, L. M. G.; LISBOA, M. N.; et al. Self-reported clinical history of misdiagnosed leprosy cases in the State of Mato Grosso, Brazil, 2016-2019. **Cadernos de Saúde Pública**, 39, e00279421, **2023**.

OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE). Global leprosy (Hansen disease) update, 2021: moving towards interruption of transmission. **Weekly Epidemiological Record**, n. 36, p. 429-450, **2022**.

PATEL, P.; GARSON, J. A.; TETTMAR, K. I.; et al. Development of an ethidium monoazide-enhanced internally controlled universal 16S rDNA real-time polymerase chain reaction assay for detection of bacterial contamination in platelet concentrates. **Transfusion**, v. 52, n. 7, p. 1423-1432, **2012**.

PESCARINI, J. M.; STRINA, A.; NERY, J. S.; et al. Socioeconomic risk markers of leprosy in high-burden countries: A systematic review and meta-analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 7, **2018**.

POLYCARPOU, A.; WALKER, S. L.; LOCKWOOD, D. N. J. A systematic review of immunological studies of erythema nodosum leprosum. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. 233, **2017**.

QIAGEN. DNeasy® Blood & Tissue Handbook For purification of total DNA from animal blood animal tissue. **DNeasy® Blood & Tissue Handbook For purification of total DNA from animal blood animal tissue**, **2006**.

RAMPAZZO, R. C. P.; GRAZIANI, A. C.; LEITE, K. K.; et al. Proof of Concept for a Portable Platform for Molecular Diagnosis of Tropical Diseases: On-Chip Ready-to-Use Real-Time Quantitative PCR for Detection of *Trypanosoma cruzi* or *Plasmodium* spp. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 246, p. 100-107, **2019**.

RAMPAZZO, R. DE C. P.; ZAMBENEDETTI, M. R.; ALEXANDRINO, F.; et al. Development, verification, and validation of an RT-qPCR-based protocol for Yellow Fever diagnosis. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 119, p. 34-37, **2022**.

RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v. 34, n. 3, p. 255-273, **1966**.

RUDEEANEKSIN, J.; SRISUNGNGAM, S.; SAWANPANYALERT, P.; et al. LightCycler™ real-time PCR for rapid detection and quantitation of *Mycobacterium leprae* in skin specimens. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 263-270, **2008**.

SALES-MARQUES, C.; CARDOSO, C. C.; ALVARADO-ARNEZ, L. E.; et al. Genetic polymorphisms of the IL6 and NOD2 genes are risk factors for inflammatory reactions in leprosy. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 7, **2017**.

SASAKI, S.; TAKESHITA, F.; OKUDA, K.; ISHII, N. Mycobacterium leprae and leprosy: A compendium. **Microbiology and Immunology**, v. 45, n. 11, p. 729-736, **2001**.

SCOLLARD, D. M.; ADAMS, L. B.; GILLIS, T. P.; et al. The continuing challenges of leprosy. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 2, p. 338-381, **2006**.

SIDOROVA, J. V.; BIDERMAN, B. V.; NIKULINA, E. E.; SUDARIKOV, A. B. A simple and efficient method for DNA extraction from skin and paraffin-embedded tissues applicable to T-cell clonality assays. **Experimental Dermatology**, v. 21, n. 1, p. 57-60, **2012**.

SIDSTEDT, M.; RÅDSTRÖM, P.; HEDMAN, J. PCR inhibition in qPCR, dPCR and MPS—mechanisms and solutions. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 412, n. 9, p. 2009-2023, **2020**.

SINGH, A.; YADAV, S. Microneedling: Advances and widening horizons. **Indian Dermatology Online Journal**, v. 7, n. 4, p. 244-254, **2016**.

SMITH, L. M.; BURGOYNE, L. A. Collecting, archiving and processing DNA from wildlife samples using FTA® databasing paper. **BMC Ecology**, v. 4, n. 4, **2004**.

STEINMANN, P.; REED, S. G.; MIRZA, F.; HOLLINGSWORTH, T. D.; RICHARDUS, J. H. Innovative tools and approaches to end the transmission of *Mycobacterium leprae*. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, p. 298-305, **2017**.

SUMMERFIELD, A.; MEURENS, F.; RICKLIN, M. E. The immunology of the porcine skin and its value as a model for human skin. **Molecular Immunology**, v. 66, n. 1, p. 14-21, **2015**.

SVEC, D.; TICHOPAD, A.; NOVOSADOVA, V.; PFAFFL, M. W.; KUBISTA, M. How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. **Biomolecular Detection and Quantification**, v. 3, n. 9, **2015**.

TASLIMI, Y.; SADEGHIPOUR, P.; HABIBZADEH, S.; et al. A novel non-invasive diagnostic sampling technique for cutaneous leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 7, **2017**.

TORRES, R. T.; FACHI, M. M.; BÖGER, B.; et al. Sensitivity and specificity of multibacillary and paucibacillary leprosy laboratory tests: A systematic review and meta-analysis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 1002, **2021**.

URGESA, K.; DE BRUIJNE, N. D.; BOBOSHA, K.; et al. Prolonged delays in leprosy case detection in a leprosy hot spot setting in Eastern Ethiopia. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 16, n. 9, p. 1–14, **2022**.

VAN BRAKEL, W. H., DA SILVA PEREIRA, Z. B., BARBOSA, J. C.; et al. Global Partnership for Zero Leprosy Research Agenda Working Group Subgroup on Stigma, **2019**.

VAN HOOIJ, A., GELUK, A. In search of biomarkers for leprosy by unraveling the host immune response to *Mycobacterium leprae*. **Immunological Reviews**, v. 301, n. 1, p. 175-192, **2021**.

WANG, S.; LIFSON, M. A.; INCI, F.; et al. Advances in addressing technical challenges of point-of-care diagnostics in resource-limited settings. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 16, n. 4, p. 449-459, **2016**.

WHITE, C. Iatrogenic stigma in outpatient treatment for Hansen's disease (leprosy) in Brazil. **Health Education Research**, v. 23, n. 1, p. 25-39, **2008**.

WHO. World Health Organization Leprosy. **World Health Organization**, **2022**.

WHO. World Health Organization. Point-Of-Care Diagnostic Tests (POCTs) for Sexually Transmitted Infections (STIs). **OMS**, **2006**

WHO. World Health Organization. Guidelines for the diagnosis, treatment and prevention of leprosy. **OMS**, **2018**.

WHO. Study Group on Chemotherapy of Leprosy for Control Programmes & World Health Organization. **Chemotherapy of leprosy for control programmes : report of a WHO study group** [meeting held in Geneva from 12 to 16 October 1981], **1982**.

WHO. World Health Organization. Screening programmes: a short guide. Increase effectiveness, maximize benefits and minimize harm. **Copenhagen: WHO Regional Office for Europe, 2020**.

WICHITWECHKARN, J.; KARNJAN, S.; SHUNTAWUTTISEETEE, S.; et al. Detection of Mycobacterium leprae infection by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 45-49, **1995**.

YANG, F.; SUN, J.; LUO, H.; et al. Assessment of fecal DNA extraction protocols for metagenomic studies. **GigaScience**, v. 9, n. 7, **2020**.

YU, C. Y.; CHAN, K. G.; YEAN, C. Y.; ANG, G. Y. Nucleic acid-based diagnostic tests for the detection SARS-CoV-2: An update. **Diagnostics**, v. 11, n. 1, p. 53, **2021**.