

Otimização de métodos de extração de DNA em *Mycobacterium leprae*

Brisa Kétrine Lustosa De Souza¹
 Cristhian Kele Gomes¹
 Juliana Kele Rosa Timóteo¹
 Marcelo de Oliveira Souza¹
 Michel Peçanha¹
 Rafael Silva Gama²

Resumo

Embora seja uma doença milenar, a hanseníase ainda é considerada um problema de saúde pública, tendo sua eliminação como meta do Ministério da Saúde. O diagnóstico preconizado pelo Ministério da Saúde é essencialmente clínico. Os métodos auxiliares de diagnóstico atuais, baciloscopia e exame histopatológico, apresentam baixa sensibilidade. Entretanto, o avanço dos ensaios moleculares como PCR ou LAMP, permite a identificação da infecção em indivíduos assintomáticos. Porém, a implantação dessas técnicas para diagnóstico da hanseníase na rotina dos serviços de saúde ainda é um desafio devido ao alto custo. A fim de otimizar metodologias para extração de DNA de *M. leprae*, avaliando o custo, tempo, quantidade e qualidade do DNA extraído e seu uso na técnica LAMP, foram propostos neste estudo três protocolos, incorporando solução de SDS, proteinase K e Lisozima no protocolo da InstaGene Matrix®. O DNA extraído nas três versões foi satisfatório para realização da LAMP. Entretanto, foi observada diferença estatística nos resultados, sendo 12,48 ng/μL, 13,92 ng/μL e 17,99 ng/μL nos protocolos 1, 2 e 3 respectivamente. Dessa forma, o protocolo 3 foi o indicado por apresentar maior eficiência. Os dados apresentados contribuem para a implantação de técnicas moleculares no serviço de saúde de forma otimizada e eficaz.

Abstract

Although it is a millennial disease, Hansen's disease is still considered a public health problem, and its elimination as a goal of the Ministry of Health. The diagnosis advocated by the Ministry of Health is essentially clinical. Current diagnostic auxiliary methods, bacilloscopy and histopathological examination, present low sensitivity. However, the advancement of molecular assays such as PCR or LAMP allows the identification of infection in asymptomatic individuals. However, the implantation of these techniques to diagnose Hansen's disease in the health services routine is still a challenge due to the high cost. In order to optimize methodologies for extraction of DNA from *M. leprae*,

¹Acadêmicos do Curso de Farmácia da UNIVALE.

²Orientador e Coordenador do Curso de Farmácia da UNIVALE.

three protocols were proposed, incorporating SDS, Proteinase K and Lysozyme solution in the InstaGene Matrix® protocol, evaluating the cost, time, quantity and quality of DNA extracted in the LAMP technique. The DNA extracted in all three versions was satisfactory for LAMP. However, a statistical difference was observed in the results, being 12.48ng/ μ L, 13.92ng/ μ L and 17.99ng/ μ L in protocol 1,2 and 3 respectively. Thus, protocol 3 was indicated as having greater efficiency. The data presented contribute to the implementation of molecular techniques in the health service in an optimized and effective way.

Introdução

Embora seja uma doença milenar, e seu agente ter isolado em 1874 pelo médico Norueguês Gerhard Henrik Armauer Hansen, a hanseníase ainda é considerada um problema de saúde pública, pois mutila, incapacita e, ainda hoje, estigmatiza pessoas no Brasil e vários outros países (OLIVEIRA, FERNANDES & LIMA 2014; MOURA, 2010).

Trata-se de uma doença infectocontagiosa de evolução crônica que se manifesta, principalmente, por lesões cutâneas com diminuição da sensibilidade térmica, dolorosa e tátil. O agente causador dessa doença é o *Mycobacterium leprae*, uma bactéria que apresenta predileção pela pele e nervos periféricos, o que confere características peculiares a essa moléstia. O *M. leprae* parasita obrigatoriamente o meio intracelular dos macrófagos, onde se reproduz por divisão binária. Este bacilo tem como características morfológicas a presença de uma parede celular com cerca de 20nm de espessura, constituída de peptidoglicanos. A transmissão ocorre por vias aéreas superiores no contato prolongado entre uma pessoa suscetível com um portador de hanseníase contagiante não tratado (SEGURADO, CASSENOTE & LUNA, 2016; EIDT, 2004; ARAUJO, 2003; MACIEIRA, 2000;).

No Brasil, em 2015, foram detectados 28.761 casos novos, ocupando o segundo lugar no mundo em número absoluto de casos de hanseníase, de acordo com dados do SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação) atualizados em 2016 (BRASIL, 2016; SINAN, 2015).

As atividades de eliminação da hanseníase, desempenhadas e financiadas em sua maioria com recursos do SUS (Sistema Único de Saúde), incluem, para os casos novos: diagnóstico, tratamento poliquimioterápico padrão (Rifampicina, Dapsona e Clofazimina, instituído

no Brasil na década de 1990), vigilância epidemiológica, por meio do exame dos contatos; educação do paciente, da família e da comunidade; prevenção de incapacidades/deficiências, reabilitação e encaminhamento das complicações segundo os níveis de complexidade da assistência, assim como o acompanhamento dos casos prevalentes até a cura (CRESPO & GONÇALVES, 2014; SANTOS, 2009; BRASIL, 2009, 2001).

O Ministério da Saúde definiu como meta, a eliminação da doença enquanto problema de saúde pública em nível nacional, baseando-se essencialmente no aumento da detecção precoce, na cura dos casos diagnosticados e acompanhamento de contatos de casos índices. No entanto, os métodos auxiliares de diagnóstico atuais, como: baciloscopia e exame histopatológico, são positivos apenas casos em que já existe a manifestação dos sinais e sintomas, característicos da Hanseníase. Dessa forma não é possível detectar casos assintomáticos ou prever progressão da doença entre indivíduos expostos (BRASIL, 2010; BRASIL, 2012; STEFANI, 2008).

Com o avanço de testes moleculares e o sequenciamento do genoma do *M. leprae*, é possível a utilização de ensaios baseados na amplificação de DNA e RNA como a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e LAMP (*Loop mediated isothermal amplification*), capaz de identificar portadores assintomáticos antes do aparecimento de lesões e possíveis danos motores e físicos ao paciente (GAMA, 2012).

O Método de PCR apresenta especificidade e boa sensibilidade para a detecção de bacilos em amostras biológicas. Além de identificar a presença da bactéria, pode identificar a viabilidade do bacilo no organismo. Entretanto, a implantação de técnicas moleculares para diagnóstico da hanseníase na rotina dos serviços de saúde ainda não foi possível devido ao alto custo de reagentes, necessidade de técnico especializado e equipamento sofisticado. Outra limitação que se destaca é dificuldade de acesso ao DNA de *M. leprae* em amostras clínicas, pois a presença de parede celular espessa dificulta a lise celular. Normalmente utilizam-se kits para extração de DNA de elevado custo ou metodologias de extração orgânica, extremamente laboriosas, o que dificulta sua implantação na rotina dos serviços de saúde (DIÓRIO, 2014; ROSA, 2008; STEFANI, 2008).

Diante da relevância de endemia hanseníase no Brasil e em busca de reduzir as limitações na incorporação de técnicas moleculares propõe-se otimizar metodologias para extração de DNA de *M. leprae*, avaliando o custo, o tempo para extração, a quantidade e qualidade do DNA extraído e seu uso na técnica LAMP.

Metodologia

Três protocolos de extração de DNA foram propostos para este estudo. Cada protocolo foi realizado em sextuplicata. A mesma quantidade de suspensão de *M. leprae* (30 μ L na concentração de 6,48 E8 bactérias por ml) foi utilizada em todos os ensaios. O primeiro protocolo segue as orientações do manual fornecido pela InstaGene Matrix® – BIORAD, um método rápido e simplificado. O segundo e terceiro protocolos foram baseados no primeiro, com aditivos que promovem danos à membrana e parede celular, conforme descrito a seguir:

PROTOCOLO 1 – InstaGene Matrix® - BIORAD

Foram pipetados 30 μ L da suspensão de *M. leprae* em tubo de 500 μ L e adicionado 200 μ L de resina InstaGene Matrix® - BIORAD. Em seguida, foi realizada agitação no Vórtex por 10 segundos e o tubo foi incubado a 56 $^{\circ}$ C por 30 minutos. Posteriormente, a amostra foi agitada novamente no Vórtex por mais 10 segundos, incubada a 100 $^{\circ}$ C por 8 min. Logo após, realizou-se centrifugação a 20.000G por 5 minutos. Ao final, 100 μ L do sobrenadante foram transferidos para tubo de 500 μ L e estocados a -20 $^{\circ}$ C até o momento da análise.

PROTOCOLO 2 - InstaGene Matrix® - BIORAD, PROTEÍNASE K (PK) E SOLUÇÃO DE LISE - SDS 1%

Foram pipetados 30 μ L da suspensão de *M. leprae* em tubo de 500 μ L. Em seguida, adicionou-se 70 μ L de solução de lise SDS 1% + 30 μ L PK (10 mg/ml). A amostra foi incubada a 56 $^{\circ}$ C por 60 minutos. Ao final desta etapa, a solução foi centrifugada a 20.000 G por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, sendo preservado aproximadamente 30 μ L no *pellet*. Logo após, foi adicionado a este tubo 200 μ L de resina InstaGene Matrix® -BIORAD, seguido de agitação em vórtex por 10 segundos. Novamente, a amostra foi incubada a 56 $^{\circ}$ C por 30 minutos. Logo após, o tubo foi agitado em vórtex por mais 10 segundos. Para finalizar o processo de extração, a amostra foi incubada a 100 $^{\circ}$ C por 8 minutos e em seguida centrifugada a 20.000G por 5 minutos. 100 μ L do sobrenadante foram transferidos para tubo de 500 μ L e estocados a -20 $^{\circ}$ C até o momento da análise.

PROTOCOLO 3 - InstaGene Matrix® - BIORAD, PROTEÍNASE K (PK), SOLUCAO DE LISE - SDS 1% e LISOZIMA

A amostra da suspensão de *M. leprae* foi transferida para tubo de 500 μ L, em seguida foram adicionados 50 μ L de lisozima (10 mg/ml) e incubados a 37 $^{\circ}$ C por 60 minutos. Logo depois, foi incorporado 70 μ L de solução de Lise SDS 1% + 30 μ L PK (10 mg/ml) e posterior incubação a 56 $^{\circ}$ C por 60 minutos. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 20.000G por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, reservando aproximadamente 30 μ L no *pellet*. Em sequência, foram adicionados 200 μ L de resina InstaGene Matrix® -BIORAD, seguida de agitação em vórtex por 10 segundos. A amostra foi incubada a 56 $^{\circ}$ C por 30 minutos e novamente agitada em vórtex por 10 segundos. Ao final, foi incubada a 100 $^{\circ}$ C por 8 minutos e centrifugada a 20.000G por 5 minutos. 100 μ L do sobrenadante foram transferidos para tubo de 500 μ L e estocados a -20 $^{\circ}$ C até o momento da análise.

ANÁLISE DA EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO

A análise da eficiência de extração de DNA pelos três protocolos foi realizada utilizando o equipamento BiospecNano – Shimadzu®. Foram obtidos dados referentes à concentração de DNA em ng/ μ L e o grau de pureza, gerado pela razão de absorbância em 260nm e 280nm. Além disso, o tempo de execução da extração e o custo foram verificados. O teste *t* de Student foi utilizado para comparar a quantidade de DNA obtida nos três protocolos. O intervalo de confiança foi de 95%.

LAMP – Loop mediated isothermal amplification

Para esta metodologia de amplificação de DNA, foi estudado o gene 16SrRNA específico do *M. leprae*. A reação foi realizada com um volume final de 25 μ L contendo: 4 mM de MgCl₂ (Promega), 0,32 μ M de cada dNTP (Promega), 0,8M de betaína, 0,16 μ M de cada iniciador externo (F3 e B3) e 0,64 μ M de cada iniciador interno (FIP e BIP) (tabela 01), 02 U de Bst DNA 3.0 (New England BioLabs) e tampão 1 \times (ThermoPol Reaction Buffer: 20 mM Tris-HCl, 10mM (NH₄)₂SO₄, 10 mM KCl, 2mM MgSO₄, 0,1% Triton X-100, pH 8,8) New England BioLabs. A quantidade de DNA utilizada na reação foi de 30 ng. A reação foi realizada a 65 $^{\circ}$ C por 20 minutos em termociclador Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700. O resultado foi avaliado

por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5%.

Tabela 1. Iniciadores para ensaios de LAMP

Gene alvo	Primers	Sequência
16SrRNA	F3	GGCAGCTCGGCAGTCT
	B3	GGGACCGACCAACAACACT
	FIP	CCTCATCCCGGATCCGCTGTAATACCTCGGTCGATGGGGT
	BIP	CTGTGCTGGCTTTGCACGAGTCAGCGAGTTTGCTTGCGC

Fonte: New England BioLabs

Resultados

A quantidade e a pureza do DNA genômico obtido pelos protocolos de extração avaliados foram satisfatórios para a realização da LAMP. A concentração de DNA obtido do material extraído no protocolo 1 apresentou média de 12,48 ng/μL e o valor médio da razão entre as leituras das absorvâncias 260/280 foi de 1,54. O protocolo 2 apresentou rendimento médio de 13,92 ng/μL e a média da razão 260/280 foi 1,23. No entanto, maior concentração de DNA foi alcançada no terceiro protocolo, obtendo-se valor médio de 17,99 ng/μL e grau de pureza de 1,01. Observa-se diferença estatisticamente significativa para o protocolo 3, na quantidade de DNA extraído ($p = 0,001$ e $p = 0,017$) (Figura 01).

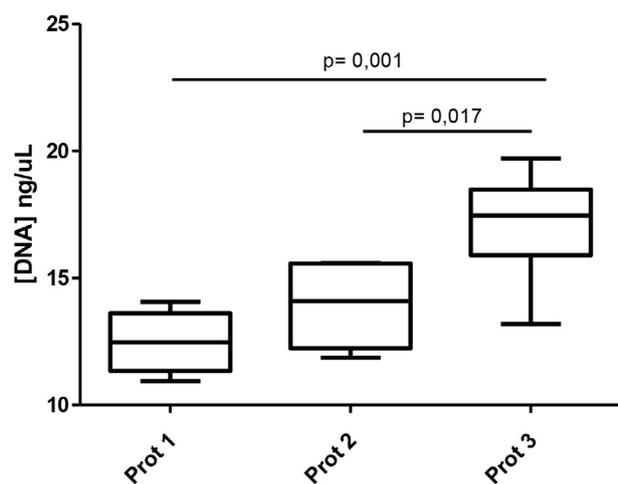


Figura 01. Concentração de DNA obtido nos protocolos de extração. (Prot 1= protocolo 01; Prot 2= protocolo 02; Prot 03 = Protocolo 03). Teste t student: $p=0,0010$ e $p= 0,017$.

Entretanto, o custo do procedimento e o tempo de execução da técnica foram maiores para o terceiro protocolo (Tabela 2).

Tabela 02 – análise da eficiência de extração de DNA

Protocolo	Custo/amostra*	Tempo de execução	[DNA] (média)	Qualidade (260/280nm)
Protocolo 01	R\$ 1,30	50 min	12,48 ng/μL	1,54
Protocolo 02	R\$ 3,00	120 min	13,92 ng/μL	1,23
Protocolo 03	R\$ 3,20	190 min	17,99 ng/μL	1,01

O DNA obtido em todos os protocolos foi submetido à LAMP para verificar se a qualidade do material poderia impedir ou dificultar a reação. Foi observado neste ensaio que a qualidade do DNA extraído não interferiu na reação, conforme apresentado na figura 2.

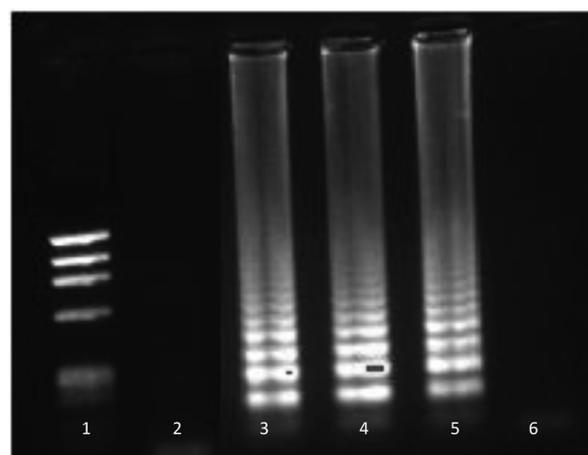


Figura 02: Ensaio LAMP com DNA obtido em todos os protocolos de extração. Canaleta 1 = Padrão de Peso molecular 100Kb Fermentas, 2 e 6 = Reação sem DNA, 3 = DNA obtido no protocolo 1, 4 = DNA do protocolo 2 e 5 = DNA extraído no protocolo 3.

Discussão

Está claro que para alcançar a eliminação da hanseníase é fundamental incorporar novas ferramentas buscando diagnóstico, com técnicas que possam detectar a infecção pelo *M. leprae*, bem como a fonte de infecção. Ensaio moleculares como PCR e PCR em tempo real tem se mostrado mais eficientes que as técnicas convencionais para identificação do *M. leprae*. Entretanto, diversos fatores dificultam o seu estabelecimento no serviço de saúde, como por exemplo, o alto custo para execução e a perícia para reprodutibilidade da técnica (DIÓRIO, 2014; MARTINEZ et al, 2014; GAMA, 2012).

A extração do DNA de *M. leprae* é uma técnica laboriosa, pois o *M. leprae* possui parede celular muito espessa o que dificulta a lise. Kits comerciais de ex-

tração de DNA são relativamente caros e por isso há limitação em sua inserção no processo diagnóstico estabelecido nos serviços de saúde. Neste trabalho, otimizamos o protocolo da InstaGene Matrix® Bio-RAD para extração de DNA, adaptando-o às características peculiares inerentes do *M. leprae*. As modificações propostas foram a incorporação de componentes como lisozima, solução de lise (SDS), proteinase K (Pk), com a finalidade de promover a lise do *M. leprae* e possibilitar a purificação do DNA extraído e posterior amplificação por meio do método LAMP.

A utilização do detergente SDS, combinado com a proteinase K, que realiza a digestão enzimática, apresenta como resultado eficiente extração de DNA. Proteinase K é frequentemente aplicada em ensaios moleculares para digerir proteínas da membrana citoplasmática e nucleases a partir de microrganismos, células cultivadas e plantas (SCORSATO & TELLES, 2011).

A lisozima causa degradação do peptídeo glicano de certas espécies de bactérias por hidrólise das ligações glicosídicas $\beta(1-4)$ do ácido N-acetilmurâmico e da Nacetilglucosamina. Esta hidrólise do peptídeo glicano resulta na lise e morte celular em ambientes hipotônicos (SCHULZ *et al.*, 2003).

A InstaGene Matrix® Bio-RAD é resina baseada em Chelex, uma agente quelante, que preferencialmente quela íons metálicos polivalentes, prevenindo a degradação do DNA. A resina pode ser empregada, com sucesso, em amostras com poucas células, vários tipos de materiais forenses e tecidos (SCORSATO & TELLES, 2011).

Neste estudo foi verificado o efeito de solução de lise com SDS somada a Proteinase K (protocolo 2) e Lisozima (protocolo 3) na concentração de DNA extraído. Interessantemente, não foi observada a diferença estatística entre o protocolo 1 e protocolo 2. Entretanto, obteve-se maior quantidade de DNA através do protocolo 3, que utiliza lisozima. Tal fato aponta que a solução de Lise com SDS 1% e proteinase K (10mg/ml) não são suficientes para aumentar extração de DNA de *M. leprae*, em relação ao uso exclusivo de InstaGene Matrix® Bio-RAD. No entanto, a utilização de lisozima aumenta significativamente a concentração de DNA. Provavelmente a espessa parede celular de peptídeo glicano no *M. leprae* dificulta a ação da proteinase K sobre a membrana citoplasmática.

Por outro lado, a maior qualidade de DNA foi alcançada pelo protocolo 1, que conta apenas com a InstaGene Matrix® Bio-RAD. A Razão 260/280 di-

minui progressivamente nos protocolos subsequentes. Este fato pode ser explicado pelo excesso de reagentes ou fragmentos celulares na solução, que dificultam a purificação com Chelex.

O custo e tempo para extração são maiores no protocolo 3, devido ao uso de reagentes e períodos de incubação. Entretanto, este protocolo tem custo muito menor que os kits comerciais, que chegam a custar R\$35,00 por amostra (orçamento realizado em 2017). Além disso, o tempo de execução do protocolo 3 é acentadamente menor que processos de extração baseados em Fenol-Clorofórmio com duração média de 48 horas (BAREA *et al.*, 2004).

A técnica LAMP foi utilizada para amplificação de DNA neste trabalho, por ser técnica recentemente criada e por apresenta proposta semelhante ao objetivo deste estudo: facilitar a aplicação de métodos moleculares para diagnóstico. Foi observado amplificação de DNA de *M. leprae* obtidas nos três protocolos de otimização propostos. Este fato confirma que os reagentes utilizados nos protocolos não impedem a LAMP, ainda que a razão 260/280 não seja a ideal. Isto também foi observado na proposta de diagnóstico por LAMP nas infecções por *M. tuberculosis* (NOTOMI *et al.*, 2015).

Conclusão

Apesar de apresentar baixo grau de pureza, o protocolo 3 utilizando resina InstaGene Matrix®, solução de lise SDS, proteinase K e lisozima, foi indicado pelo baixo custo em relação aos kits comerciais e por garantir maior quantidade de DNA de *M. leprae* extraído.

Os testes foram realizados em sextuplicata, o que assegura sua reprodutibilidade. Além disso, o DNA foi facilmente amplificado pela técnica LAMP. Desta forma, os dados apresentados contribuem para a implantação de técnicas moleculares no serviço de saúde, com finalidade de diagnóstico de hanseníase.

Referências Bibliográficas

- Araújo MG. Hanseníase no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. Belo Horizonte: 2003, p 373.
- Barea JA, Pardini MIMC & Gushiken T. Methods of DNA extraction from archived materials and rare sources for utilization in polymer chain reaction. *Rev. bras. hematol. hemoter.* 2004;26 (4):274-281.

Brasil. Guia prático para profissionais da equipe de saúde da família Série A. Normas e Manuais Técnicos, n. 111 Brasília: Março, 2001 Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/hanseníase_atencao.pdf - Acesso em 20/09/2016.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. portaria conjunta nº 125, de 26 de março de 2009-Ações de controle da hanseníase. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs/2009/poc0125_26_03_2009.html - Acesso em 02/10/2016.

Brasil. Fundação Oswaldo Cruz. Técnica traz nova alternativa de diagnóstico

precoce para a hanseníase. 2010. Disponível em <http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=773&sid=32>. Acesso em: 20/09/2016.

Brasil, Ministério da Saúde. Plano Integrado de Ações Estratégicas. Brasília 2012. Disponível em http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/plano_integrado_acoes_estrategicas_2011_2_015.pdf. Acesso: 03/10/2016

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica - Centro de Informações Estratégicas em Vigilância em Saúde Gt-Sinan - Sistema De Informação De Agravos De Notificação - Dicionário De Dados –Versão 5.0. 2016. Disponível em <http://portalsinan.saude.gov.br/hanseníase> - Acesso em 21/10/2016.

Crespo MJ, Gonçalves A. Avaliação das possibilidades de controle da hanseníase a partir da poliquimioterapia. *Rev. Por. Saúde Pública*. 2014; 32(1): 80-88.

Diório SM. Aspectos microbiológicos e moleculares do *Mycobacterium leprae* - **Manual Hanseníase Avanços e Desafios**– Brasília: NESPROM, 2014, pg67

Eidt LM. Breve história da hanseníase: sua expansão do mundo para as Américas, o Brasil e o Rio Grande do Sul e sua trajetória na saúde pública brasileira - *Saúde soc*. vol.13 no. 2 São Paulo May/ Aug. 2004.

Gama RS. Detecção de DNA de *Mycobacterium leprae* em pacientes com hanseníase e seus contatos domiciliares assintomáticos. **Programa de pós-graduação strictu sensu mestrado em ciências biológicas- imunopatologia das doenças infecciosas e parasitárias**, Univale Governador Valadares: Abril 2012.

Macieira S. Aspectos microbiológicos do *Mycobacterium leprae*. In: Opromolla DVA, editor. **Noções de Hansenologia**. Bauru: 2000. p. 13.

Martinez A N, Talhari C, Moraes MO & Talhari S. PCR-Based Techniques for Leprosy Diagnosis: From the Laboratory to the Clinic. *Rev. PLOS Neglected Tropical Diseases* April 2014, Volume 8, Issue 4 e 2655.

Moura SHL. *Avaliação de incapacidades físicas e transtornos psicossociais em pacientes com hanseníase em Centro de Referência de Minas Gerais- Dissertação (Mestrado)* Escola de Medicina da UFMG, Belo Horizonte - 2010.

Notomi T, Mori Y, Tomita N & Kanda H. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *Journal of Microbiology* (2015) Vol. 53, No. 1, pp. 1–5.

Oliveira AR, Fernandes CA & Lima CRC. Atualização sobre critério de tempo para diagnóstico tardio da hanseníase. *Cadernos ESP*, Ceará 8(2): 77-91, jul./dez. 2014.

Rosa DD. Método rápido de extração de DNA de bactérias. *Summa Phytopathol*, v.34, n.3, p.259-261, 2008

Santos AAC. *Análise de genes de Mycobacterium leprae associados com resistência a rifampicina, dapsona e ofloxacin, em amostras clínicas de pacientes com hanseníase (recidiva) no município do Rio de Janeiro- Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Parasitária*. Rio de Janeiro: Junho 2009

Schulz D, Pereira MA, Bonelli R.R, Nunes MM & Batista CRV. Bacteriocinas: Mecanismo de ação e uso na conservação de alimentos. *rev. Alim. Nutr.*, v. 14, n.2, p. 229-235,2003.

Scorsato AP & Telles JEQ. Fatores que interferem na qualidade do DNA extraído de amostras biológicas armazenadas em blocos de parafina. *J Bras Patol Med Lab* • v. 47 • n. 5 • p. 541-548 • outubro 2011.

Segurado AC, Cassenote AJ & Luna EA. Saúde nas metrópoles - Doenças infecciosas - *Estud. Avançados*. vol.30 no.86 São Paulo Jan./Apr. 2016.

SINAN. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Base de Dados de 2015. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/julho/07/Taxa-de-detec---o-geral-de-casos-novos-de-hansen--ase-estados--Brasil--2015..pdf> Acesso em: 20/09/2016.

Stefani MMA. Desafios na era pós genômica para o desenvolvimento de testes laboratoriais para o diagnóstico da hanseníase. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*, v. 41, n. supl. 2, p. 89-94, 2008.