



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UNB
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

CYNTHIA BETTINI LINS DE CASTRO MONTEIRO

**AVALIAÇÃO DA ACURÁCIA DA REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE EM
TEMPO REAL (QPCR) PARA O DIAGNÓSTICO DA HANSENÍASE NO SORO DE
SANGUE PERIFÉRICO**

BRASÍLIA – DF
2022

CYNTHIA BETTINI LINS DE CASTRO MONTEIRO

**AVALIAÇÃO DA ACURÁCIA DA REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE EM
TEMPO REAL (QPCR) PARA O DIAGNÓSTICO DA HANSENÍASE NO SORO DE
SANGUE PERIFÉRICO**

Dissertação de Mestrado Acadêmico do Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (UnB), como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Orientador: Prof. MD. PhD. **Ciro Martins Gomes.**

BRASÍLIA – DF

2022

BM775a Bettini Lins de Castro Monteiro, Cynthia
AVALIAÇÃO DA ACURÁCIA DA REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE
EM TEMPO REAL (QPCR) PARA O DIAGNÓSTICO DA HANSENÍASE NO
SORO DE SANGUE PERIFÉRICO / Cynthia Bettini Lins de Castro
Monteiro; orientador Ciro Martins Gomes . -- Brasília, 2022.
57 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Ciências Médicas) --
Universidade de Brasília, 2022.

1. Hanseníase. 2. Reação em cadeia de Polimerase. 3.
Mycobacterium leprae. I. , Ciro Martins Gomes, orient. II.
Título.

CYNTHIA BETTINI LINS DE CASTRO MONTEIRO

**AVALIAÇÃO DA ACURÁCIA DA REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE EM
TEMPO REAL (QPCR) PARA O DIAGNÓSTICO DA HANSENÍASE NO SORO DE
SANGUE PERIFÉRICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (UnB), como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Aprovado em: 30/09/2022.

Banca Examinadora

Professor Dr. Ciro Martins Gomes
Orientador

Dr. Daniel Holanda Barroso
Membro Titular
Universidade de Brasília

Dr. Tazio Vanni
Membro Titular
Hospital de Base do Distrito Federal - IGESDF

Dra. Larissa Grandi Vaitsman Bastos
Universidade de Brasília

BRASÍLIA – DF

2022

Dedico esta pesquisa e trabalho aos verdadeiros mestres do saber e defensores da ciência, da educação e da saúde de qualidade.

Àqueles que trabalham para a melhoria dos cuidados aos pacientes das ainda várias doenças negligenciadas, especialmente a Hanseníase.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a meus guias espirituais nessa jornada da vida.

Aos meus pais pela vida, paciência e dedicação exemplares.

Ao meu companheiro, André, parceiro em tudo e sem o qual este trabalho jamais teria acontecido. Por seu apoio direto e indireto, por compreender a ausência, pela motivação, carinho e inspiração, inclusive.

Às minhas filhas, Clara Açucena, Luna e Tainá, pelo amor, carinho e paciência. Que no futuro possam entender um pouco melhor minha ausência física em razão dos inúmeros períodos necessários para concretizar esta etapa tão importante e almejada.

Ao meu orientador, Professor Doutor Ciro Martins Gomes, pela paciência, auxílio, boa vontade e gentileza. Que muito me ensinou e ensina. Que fez e faz essa jornada de aprendizagem científica, mesmo durante uma pandemia, leve, rica e repleta de aprendizados. Uma eterna referência e exemplo.

RESUMO

AVALIAÇÃO DA ACURÁCIA DA REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE EM TEMPO REAL (QPCR) PARA O DIAGNÓSTICO DA HANSENÍASE NO SORO DE SANGUE PERIFÉRICO

Introdução: A hanseníase é uma doença infecto contagiosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae* e pelo *Mycobacterium lepromatosis*, que atinge principalmente a pele e o sistema nervoso periférico. Configura um problema de saúde pública, com suas manifestações, resultando da interação entre patógeno-hospedeiro. Seu diagnóstico é basicamente clínico, porém exames complementares podem aumentar a acurácia do diagnóstico e resultar em início mais precoce do tratamento e na interrupção da cadeia de transmissão.

Metodologia: Trata-se de estudo transversal analítico com objetivo de avaliar a acurácia diagnóstica da reação em cadeia de polimerase em tempo real (qPCR) para o diagnóstico de hanseníase no soro de sangue periférico. Consiste na identificação da presença de fragmento genético do *M. leprae* no soro periférico de pacientes imunocompetentes atendidos no ambulatório de hansenologia do HUB de 01/06/2020 a 01/06/2021. Uma quantidade de 1,5ml do soro periférico foi desidratada/concentrada em incubadora e utilizada para análise molecular. Seu resultado foi comparado com o soro não concentrado, chamado de soro normal e esses dados comparados. O alvo escolhido no estudo foi o de sequências repetitivas RLEP.

Resultados: Foram incluídos 56 pacientes no estudo, sendo 20 casos e 36 controles. As idades tiveram média de 39,9 anos (DP 17,3) no grupo dos casos e 45,19 anos no dos controles (DP 14,75). A maioria dos pacientes foi diagnosticada com a forma Virchowiana (multibacilar – 50%), seguido das formas dimorfa (30%), tuberculóide (15%) e neural pura (5%). Trabalho anterior utilizou 200µl de soro, enquanto a análise do presente estudo utilizou o conteúdo de até 1500µl, o chamado soro concentrado. Apenas dois pacientes tiveram a positividade do gene RLEP na análise de soro concentrado, gerando sensibilidade de 10% (IC 95% - 2,79-30,10%). A avaliação do soro concentrado demonstrou melhor acurácia, pois a especificidade foi de 100% (IC 95% - 2,79-30,10%), enquanto no soro normal a especificidade ficou em 94,44% (IC 95% - 81,86-98,46%). Na comparação das duas técnicas de análise no soro, o teste de McNemar demonstrou que as técnicas não apresentaram diferença estatística ($p = 0.633$), apesar da melhor especificidade no soro concentrado. Entretanto, a avaliação de concordância pelo método Kappa resultou em 0.3 (IC 95% - 0.05 - 0.55), mostrando que os testes não têm boa concordância.

Conclusão: Mesmo com o aprimoramento de técnicas, incluindo a concentração da amostra, o qPCR do RLEP no soro de sangue periférico dos pacientes acometidos mantém baixa sensibilidade, apesar da especificidade elevada. Estes achados sugerem que o qPCR do sangue tem utilidade limitada no diagnóstico laboratorial da hanseníase.

Palavras-chave: Hanseníase, *Mycobacterium leprae*, Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

ABSTRACT

ASSESSMENT OF THE ACCURACY OF THE REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION (QPCR) FOR THE DIAGNOSIS OF LEPROSY IN PERIPHERAL BLOOD SERUM

Introduction: Leprosy is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium lepromatosis* that mainly affects the skin and peripheral nervous system. It constitutes a public health problem, and its manifestations are a result of pathogen-host interactions. Its diagnosis is basically clinical, but complementary tests can increase the accuracy of the diagnosis and result in earlier initiation of treatment and interruption of the transmission chain.

Methodology: This is an analytical cross-sectional study with the objective of evaluating the diagnostic accuracy of the real-time polymerase chain reaction (qPCR) for the diagnosis of leprosy in peripheral blood serum. It consists of identifying the presence of a genetic fragment of *M. leprae* in the peripheral serum of immunocompetent patients treated at the HUB leprosy clinic from 06/01/2020 to 06/01/2021. An amount of 1,5 ml of peripheral serum was dehydrated/concentrated in an incubator and used for molecular analysis. Their result was compared with the unconcentrated serum, called normal serum, and these data compared. The target chosen in the study was the repetitive sequences RLEP.

Results: A total of 56 patients were included in the study, being 20 cases and 36 controls. Ages averaged 39.9 years (SD 17.3) in the case group and 45.19 years in the controls (SD 14.75). Most patients were diagnosed with the Virchowian form (multibacillary - 50%), followed by borderline (30%), tuberculoid (15%) and pure neural (5%) forms. Previous work used 200µl of serum, while the analysis of the present study used the content of up to 1500µl, the so-called concentrated serum. Only 2 patients had positive expression of the RLEP gene in the concentrated serum analysis, with a sensitivity of 10% (95% CI - 2.79-30.10). The evaluation of concentrated serum showed better accuracy, as the specificity was 100% (95% CI - 2.79-30.10), while in normal serum the specificity was 94.44% (95% CI - 81.86 -98.46). Comparing these two techniques with the McNemar test, no significantly statistical difference was observed ($p = 0.633$), despite the better specificity in concentrated serum. However, the agreement evaluation by the Kappa method resulted in 0.3 (95% CI - 0.05 - 0.55), showing that these tests had limited agreement.

Conclusion: Despite improvements of techniques and sample concentration, the qPCR of RLPE in the serum of affected patients showed low sensitivity, even with its high specificity and can contribute to the evaluation of difficult-to-manage cases. These findings suggest that qPCR of RLPE in the serum has limited utility in the diagnosis of leprosy.

Keywords: Leprosy, *Mycobacterium leprae*, Polymerase Chain Reaction

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição Geográfica da Incidência de Hanseníase em 2020	17
Figura 2 - Lesão hipocrômica com alteração de sensibilidade	19
Figura 3 - Lesão eritematosa com borda elevada e alteração de sensibilidade	20
Figura 4 - Hanseníase Dimorfa	21
Figura 5 - Hanseníase Dimorfa	22
Figura 6 - Hanseníase Virchowiana	23
Figura 7 - Hanseníase Neural Pura	25
Figura 8 - Reação Hansênica Tipo 1	26
Figura 9 - Reação Hansênica Tipo 2	27
Figura 10 - Estrutura molecular PGL-1 do <i>M. leprae</i>	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Volume das soluções utilizadas no termociclador Quantstudio 1 para realização de PCR em tempo real.....	40
Tabela 2 - Programação Quant Studio.....	41
Tabela 3 - Informações Sociodemográficas dos pacientes em estudo	44
Tabela 4 - Classificação dos Casos de Hanseníase - Classificação de Madri	47
Tabela 5 - Positividade no qPCR	48
Tabela 6 - Análise quantitativa qPCR indicando o número de bacilos por amostra ..	48

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Incidência de Hanseníase ao longo dos anos no Brasil	18
Gráfico 2 - Distribuição das Idades nos grupos Casos e Controles	45
Gráfico 3 - Distribuição do Sexo entre os grupos Casos e Controles.....	45
Gráfico 4 - Naturalidade	46
Gráfico 5 - Etnia	46
Gráfico 6 - Classificação dos casos de Hanseníase conforme a Classificação de Madri	47

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BB	Borderline-Borderline
Cq	Quantification cycle
DF	Distrito Federal
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ENH	Eritema Nodoso Hansênico
IB	Índice Bacilar
HUB	Hospital Universitário de Brasília (HUB)
OMS	Organização Mundial de Saúde
PB	Formas paucibacilares
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico
PCR	Cadeia de polimerase convencional
qPCR	Reação em cadeia de polimerase em tempo real
SUS	Sistema Único de Saúde
SVS	Subsecretaria de Vigilância Sanitária
TB	Tuberculóide Borderline
Tm	Curva melting

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	13
- Etiopatogenia	13
- Epidemiologia	15
- Manifestações Clínicas e Classificações da Doença	19
- Reações Hansênicas	25
- Diagnóstico	27
-- Anticorpos específicos para o <i>M. leprae</i> – PGL-1	28
-- Testes Moleculares.....	30
-- Reação em Cadeia de Polimerase em tempo real (qPCR)	31
- Tratamento.....	32
- Imunoprofilaxia.....	33
JUSTIFICATIVA.....	34
OBJETIVOS	35
- Objetivo Geral	35
- Objetivos específicos	35
METODOLOGIA	36
- População do Estudo e Amostragem	36
- Critérios de Inclusão	36
- Critérios de exclusão.....	36
- Comitê de Ética.....	37
- Definição de caso e controle	37
- Classificação dos pacientes entre casos e controles.....	37
- Exame índice (análise sorológica por PCR em tempo real).....	37
-- Etapas	38
- Critérios de Positividade.....	41
- Análise Estatística.....	41
RESULTADOS	43
- Teste Índice	47
DISCUSSÃO	49
CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS	53

INTRODUÇÃO

- ETIOPATOGENIA

A Hanseníase é uma doença infectocontagiosa causada pelo *Mycobacterium leprae* e pelo *Mycobacterium lepromatosis*. Seu agente causal é um bacilo álcool-ácido resistente, também conhecido como bacilo de Hansen em homenagem ao autor de sua descoberta, Armauer Hansen, em 1873, na Noruega (SINGH; COLE, 2011; HESS; RAMBUKKANA, 2019).

Foi a primeira bactéria associada a uma doença humana. Apresenta tropismo por macrófagos e células neurais, especialmente, as células de *Schwann* dos nervos periféricos (PEREIRA, 2002; SINGH; COLE, 2011). Além dos nervos, acomete principalmente a pele, mas também pode atingir olhos, mucosas, ossos e até testículos (WHITE; FRANCO-PAREDES, 2015; MAKHAKHE, 2021).

Trata-se de um patógeno intracelular obrigatório, que depende do metabolismo e das demais funções da célula do hospedeiro para sobreviver e conseguir multiplicar-se. Sua conformação genética favorece isso, já que seu DNA é composto mais por pseudogenes e genes não codificadores de proteínas do que por genes codificadores de proteínas.

Os genes aparentemente relacionados à hanseníase são os genes PARK2 e PACRG (localizados no cromossomo 6q25-q27), os quais já são reconhecidos como fatores de risco para a doença. Curiosamente, mutações no gene PARK2 (que codifica uma ubiquitina E3 ligase) demonstrou ser uma das causas da doença de Parkinson de início precoce, conectando a hanseníase a esse outro grupo de doenças neurodegenerativas ainda de etiologia desconhecida (HESS; RAMBUKKANA, 2019; CÁCERES-DURÁN, 2022).

Outros genes relacionados à suscetibilidade a essa doença são também associados à imunidade inata e adaptativa, como, por exemplo, o gene NRAMP1 (localizado no cromossomo 2q35), o *locus* do cromossomo 10p13, os genes TAP1 e TAP2 (associados ao processamento de antígenos, localizados no cromossomo 6p21), o gene do Fator de necrose tumoral- α (TNF- α , localizado no cromossomo 6p21) e o gene VDR (receptor de vitamina D, localizado no cromossomo 12q12 (WHITE; FRANCO-PAREDES, 2015).

Trata-se de um microrganismo com crescimento lento (sua taxa de duplicação pode chegar a duas semanas, com média de 11 a 16 dias), que ainda não pode ser cultivado *in vitro* (PEREIRA, 2002; SINGH; COLE, 2011). Para melhor compreensão da ação do bacilo, estudos tentaram desenvolver modelos animais (SHEPARD, 1960) inclusive em tatus (KIRCHHEIMER; STORRS, 1971), sendo os da espécie *Dasypus novemcinctus*, os mais apropriados para pesquisas clínicas (OLIVEIRA; DEPS; ANTUNES, 2019).

O Homem aparece como principal hospedeiro do *M. leprae*, mas há algumas décadas foi descoberto que certas espécies de tatus, principalmente o tatu-galinha ou tatu-nove-bandas, como é chamado o tatu verdadeiro (*Dasypus novemcinctus*), também podem hospedar esse microrganismo na natureza (SINGH; COLE, 2011; TRUMAN et al., 2014; HESS; RAMBUKKANA, 2019; DEPS et al., 2020). Tais animais podem inclusive ser infectados por essa microbactéria, sendo considerados reservatórios naturais do bacilo.

No Brasil, o primeiro artigo que evidenciou a infecção natural em tatus apareceu em 2002, a partir da análise por reação em cadeia de polimerase (PCR) de amostras de sangue periférico desses animais (DEPS; SANTOS; YAMASHITA-TOMIMORI, 2002; DEPS et al., 2020). Nota-se ainda que as áreas com maiores índices de contato com esses animais apresentam mais chances de desenvolvimento da doença de Hansen, com a suspeita de poder comportar-se como uma zoonose (DEPS; SANTOS; YAMASHITA-TOMIMORI, 2002; DA SILVA et al., 2018; OLIVEIRA; DEPS; ANTUNES, 2019; DEPS et al., 2020).

É importante mencionar que bacilos viáveis já foram localizados no solo próximo a residências de pacientes com a doença em regiões da Índia, sugerindo a hipótese de transmissão ambiental (DEPS; ROSA, 2021) e em esquilos vermelhos selvagens (HESS; RAMBUKKANA, 2019).

O mecanismo preciso pelo qual a doença é transmitida ainda padece de várias respostas, mas estima-se que a infecção entre humanos ocorra por liberação de gotículas do trato respiratório superior de indivíduos multibacilares infectados e possível disseminação hematogênica (PEREIRA, 2002; CÁCERES-DURÁN, 2022).

A infecção pelo *M. leprae* apresenta alta infectividade, mas baixa patogenicidade. Isso significa que mesmo com a exposição ao patógeno, apenas um

baixo percentual dos indivíduos desenvolverá a doença (até 20%) em uma das suas diversas formas clínicas (PEREIRA, 2002; MAKHAKHE, 2021).

A maior incidência da doença ocorre em indivíduos suscetíveis (geneticamente, inclusive) e/ou indivíduos de regiões endêmicas com piores índices de desenvolvimento socioeconômico, onde costumam ser maiores as dificuldades de acesso aos serviços de saúde para diagnóstico, tratamento e seguimento, prejudicando a interrupção da cadeia de transmissão da doença (CÁCERES-DURÁN, 2022).

Estima-se que cerca de 95% da população mundial não seja suscetível ao adoecimento, tanto por questões genéticas quanto históricas (exposição ancestral ao bacilo), sendo essa predisposição marcante na expressão fenotípica da doença, reflexo entre a resposta imune resultante da interação entre o agente e seu hospedeiro (PEREIRA, 2002; WHITE; FRANCO-PAREDES, 2015; SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE RJ, 2018).

Conforme já mencionado, os principais sítios acometidos pelo bacilo de Hansen são a pele e o tecido nervoso periférico. Seu comprometimento cutâneo ocorre principalmente nos queratinócitos, histiócitos e macrófagos, tendo ainda predileção por áreas mais frias do corpo (PEREIRA, 2002; SINGH; COLE, 2011; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2020).

Os queratinócitos parecem desempenhar papel de destaque na liberação do peptídeo β -defensina, um potencial antimicrobiano ativado na defesa contra o bacilo. Já nas células de Schwann, ocorre a ligação à α 2-laminina e adesinas, localizadas na lâmina basal, aos receptores de α -dístroglicanos e aos receptores ErbB2 presentes na superfície celular. A entrada do bacilo nessas células promove uma *desdiferenciação* da mesma e seu retorno a formas mais imaturas por meio da ativação da sinalização da via Erk1/2, favorecendo a proliferação do agente infeccioso (WHITE; FRANCO-PAREDES, 2015; HESS; RAMBUKKANA, 2019).

- EPIDEMIOLOGIA

A hanseníase é uma doença conhecida há milhares de anos, aparecendo em escritos antigos da China, Índia e Egito, pelo menos, desde 600 a.C (HESS;

RAMBUKKANA, 2019). Até hoje estigmatizada, já foi mais prevalente em uma série de países do mundo, obtendo redução expressiva após o início do tratamento medicamentoso, o que se deu a partir de 1940 (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2020).

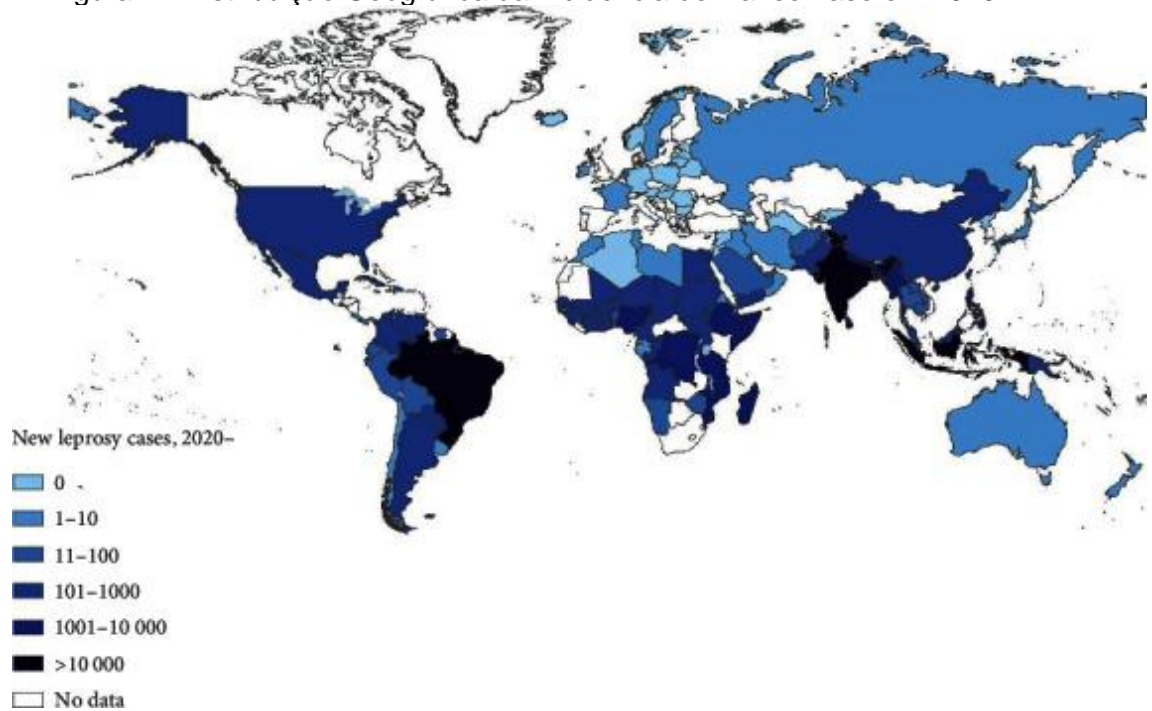
Devido a sua elevada capacidade de transmissão no passado e às deformidades causadas pela doença, o impacto socioemocional nos pacientes acometidos foi agravado pelas medidas políticas e sanitárias implementadas até então. Por muito tempo, a solução encontrada para frear a transmissão da doença foi o de isolamento desses indivíduos da sociedade, inclusive, em casas de saúde específicas (HESS; RAMBUKKANA, 2019).

As mudanças se seguiram com o início da quimioterapia, mas a prevalência de transtornos psiquiátricos nos indivíduos com a doença parece ser maior do que na população em geral (SINGH, 2012), com subsequente piora em marcadores de qualidade de vida (PATIL; MAYUR, 2021). Ainda hoje, estima-se redução superior a 13 anos na capacidade produtiva dos indivíduos acometidos pelas formas graves e com incapacidades físicas secundárias à doença (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2020).

A partir da terapia com múltiplas drogas (poliquimioterapia) no início da década de 1980, a Organização Mundial de Saúde (OMS) definiu como meta a redução da prevalência da hanseníase em menos de 1 caso para 10.000 habitantes, marca atingida no início dos anos 2000 (2005, mais especificamente). O número de casos no mundo passou de mais de 5 milhões na época para cerca de 200 mil novos casos em 2020 (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2020).

Apesar do bom resultado alcançado, esse controle ocorreu de forma desigual (Figura 1). Em determinados países, com destaque negativo para Brasil, Índia e Indonésia, a doença permanece um importante problema de saúde pública (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2020; CÁCERES-DURÁN, 2022).

Figura 1 - Distribuição Geográfica da Incidência de Hanseníase em 2020

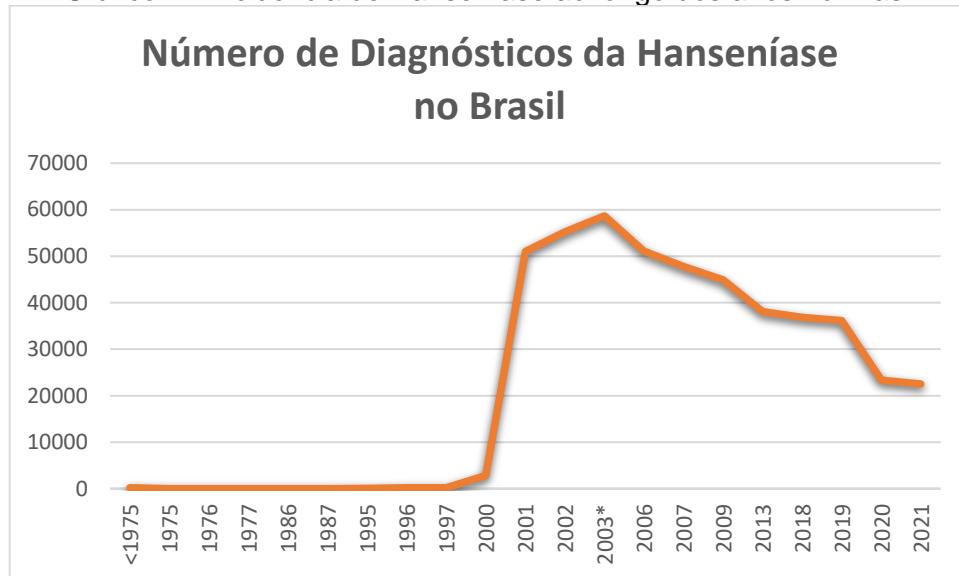


Fonte: ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2021.

No Brasil, cerca de 30mil casos de hanseníase ao ano são diagnosticados, com distribuição heterogênea em território nacional, que ainda apresenta áreas hiperendêmicas (≥ 40 casos/100.000 habitantes) (DEPS; ROSA, 2021). Regiões como Norte e Nordeste têm maior prevalência da doença, além de também contarem com localidades em que há mais problemas de acesso a serviços de saúde e atraso do diagnóstico, favorecendo a manutenção da cadeia de transmissão, agravada pela provável subnotificação dos casos (SARNO et al., 2012; MARQUES et al., 2021; CÁCERES-DURÁN, 2022).

Curiosamente, nos anos de 2020 e 2021 houve redução de 35,4% e 37,7%, respectivamente, em relação ao ano de 2019 no número de casos diagnosticados conforme dados obtidos pelo DATASUS (BRASIL, 2022). Essa redução tão acentuada chama a atenção, sendo importante considerar que tal evento pode estar relacionado a um retardo na procura de serviços de saúde por pacientes com lesões suspeitas e subsequente atraso do diagnóstico devido à pandemia de Covid-19 do que por melhor controle da doença e da vigilância dos contactantes (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Incidência de Hanseníase ao longo dos anos no Brasil



Fonte: DATASUS (BRASIL, 2022). Elaboração própria.

Do mesmo modo, os dados mundiais entre os anos de 2019 e 2020 mostraram redução significativa, com incidência de 127.396 casos em 2020, o que representa incidência 37,1% menor do que no ano anterior. Novamente, o mais provável é que esteja relacionada à menor detecção do período, bem como ao menor número de informações obtidas pelas organizações de saúde (informação de apenas 127 países em 2020 e de 160 países em 2019) (MARQUES et al., 2021; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2021; CÁCERES-DURÁN, 2022).

Em sua estratégia global, visando ao controle da hanseníase para o período de 2021 a 2030, a OMS definiu a redução mais acentuada dos casos, indicando a meta de Hanseníase zero para vários locais. Tal ação tem como objetivo estimular aqueles países que ainda têm a Doença de Hansen como problema de saúde pública, a reduzir o número de casos, ao mesmo tempo em que incentiva os países com índices já diminutos a, de fato, zerar os casos autóctones, cumprindo o papel histórico de erradicação da doença.

Essa iniciativa procura alcançar a meta zero em 120 países, bem como a redução do número de novos casos para a faixa de 63.000/ano (redução próxima a 70%). Outros objetivos consistem em reduzir as taxas de incapacidade física e acometimento da população infantil (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2021; CÁCERES-DURÁN, 2022).

- MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E CLASSIFICAÇÕES DA DOENÇA

As manifestações clínicas da doença são um reflexo da interação entre o agente patogênico e a resposta imune do hospedeiro, resultando em espectro variado (NAIK; MORE; JOSHI, 2022). Conforme menção anterior, o bacilo apresenta forte tropismo pela pele, macrófagos e células de Shwann de nervos periféricos, podendo acometer ainda ossos, olhos, mucosas e testículos (WHITE; FRANCO-PAREDES, 2015; MAKHAKHE, 2021). As apresentações clínicas mais frequentes são lesões de pele hipocrômicas ou eritematosas com alteração de sensibilidade, podendo ou não ter bordas elevadas (Figuras 2 e 3). Os casos suspeitos devem ser encaminhados aos serviços de saúde para melhor avaliação e diagnóstico adequado.

Figura 2 - Lesão hipocrômica com alteração de sensibilidade



Fonte: Secretaria Municipal de Saúde RJ, 2018.

Figura 3 - Lesão eritematosa com borda elevada e alteração de sensibilidade



Fonte: Acervo pessoal.

A Classificação Operacional da Hanseníase definida pela OMS propõe uma esquematização simples, na qual se baseia o esquema terapêutico e da qual se infere a capacidade de transmissão da doença. Ela divide os casos em dois grandes grupos, baseados nos achados clínicos (número de lesões/alterações suspeitas) e na identificação do Bacilo em esfregaços de regiões frias do corpo, como os lóbulos de orelhas, joelhos e cotovelos (WHITE; FRANCO-PAREDES, 2015; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017).

- **Paucibacilares:** até cinco lesões e sem presença de bacilos no exame de baciloscopia ou exame histopatológico.
- **Multibacilares:** seis ou mais lesões de pele; ou com comprometimento de nervo; ou com achado de bacilos na baciloscopia ou biópsia, independentemente do número de lesões de pele.

Essa relevante classificação apresenta limitações que podem levar ao subdiagnóstico ou a sobrediagnóstico. Uma das classificações mais empregadas é a de Madri (1953), utilizada pelo Ministério da Saúde. Ela divide os achados dos pacientes em quatro grupos (ARAÚJO, 2003; WHITE; FRANCO-PAREDES, 2015; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017):

- **Forma Indeterminada (Paucibacilar):** geralmente se apresenta como lesão única na pele, hipocrômica, sem relevo, bordas mal delimitadas, com alteração de sensibilidade (hipoestesia ou anestesia térmica e/ou dolorosa), podendo ou não manter a sensibilidade tátil, com lesão seca (sem sudorese na área acometida), decorrentes do comprometimento de fibras nervosas sensitivas e autonômicas.

Usualmente é a resposta inicial (recente) à infecção pelo patógeno, a partir da qual, em período que varia de meses a anos, podendo evoluir para outras formas da doença. A baciloscopia e biópsia de pele são negativas.

- **Hanseníase Tuberculóide (paucibacilar)**: manifesta-se, em geral, como uma placa anestésica com ou sem bordas elevadas, bem delimitadas, com centro claro (forma de anel). Eventualmente pode apresentar-se como único nervo espessado e com perda total da sensibilidade no seu território de inervação. A imunidade celular do hospedeiro é capaz de agir e combater o patógeno, evitando o agravo da doença.

- **Hanseníase Dimorfa (multibacilar)**: forma mais comum de apresentação da doença no momento do diagnóstico (até 70% dos casos), com longo período de incubação (10 anos ou mais). Caracteriza-se pela presença de manchas avermelhadas ou esbranquiçadas, com bordas elevadas e mal definidas na periferia, havendo alteração de sensibilidade e perda das funções autonômicas (sudorese). É comum ainda o comprometimento nervoso periférico assimétrico, com baciloscopia positiva na maioria dos casos (Figuras 4 e 5).

Figura 4 - Hanseníase Dimorfa



Fonte: Ministério da Saúde, 2021.

Figura 5 - Hanseníase Dimorfa



Fonte: Imagem própria. Acervo pessoal.

- **Hanseníase Virchowiana (Multibacilar)**: polo de menor resistência imune, com formas mais graves e disseminadas da doença. Pode evoluir a partir de uma forma indeterminada/*borderline* ou manifestar-se assim desde o começo. Sua evolução leva à infiltração difusa na pele e tem a capacidade de acometer ainda as mucosas das vias aéreas superiores, olhos, testículos, nervos e linfonodos, bem como fígado e baço. É possível que ocorra a queda ou a rarefação de pelos, incluindo nos cílios e supercílios (madarose). Tem bacterioscopia positiva, maior capacidade de transmissão e indivíduos acometidos podem comportar-se como reservatórios da doença (Figura 6).

Figura 6 - Hanseníase Virchowiana



Fonte: Acervo pessoal.

Outra classificação proposta, a de Ridley e Jopling, foi formulada em 1966 e é muito utilizada. Baseia-se nas características das lesões cutâneas, nas alterações neurológicas e na identificação e quantificação do bacilo (seja pela baciloscopia direta ou análise anatomopatológica). Entre dois polos (forma tuberculóide e virchowiana), encontra-se um amplo espectro de manifestações: (NAIK; MORE; JOSHI, 2022; WHITE; FRANCO-PAREDES, 2015; MAKHAKHE, 2021; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

- Forma Tuberculóide (TT - Paucibacilar);
- Virchowiana (Multibacilar);
- Tuberculóide Borderline (TB);
- Borderline-Borderline (BB);

- Borderline lepromatosa ou Virchowiana.

Pacientes com formas intermediárias (*borderline*) podem sofrer ao longo do curso da doença com a progressão ou regressão da doença (formas mais brandas ou mais agressivas). Além das diferenças na carga bacilar, as formas pauci e multibacilar parecem apresentar respostas imunes diferentes. Enquanto nas formas paucibacilares a imunidade celular parece ser a mais envolvida, nas formas multibacilares há também intensa resposta humoral, com menor papel da imunidade celular, sendo esse um importante mecanismo para limitar a disseminação do patógeno (SINGH; COLE, 2011).

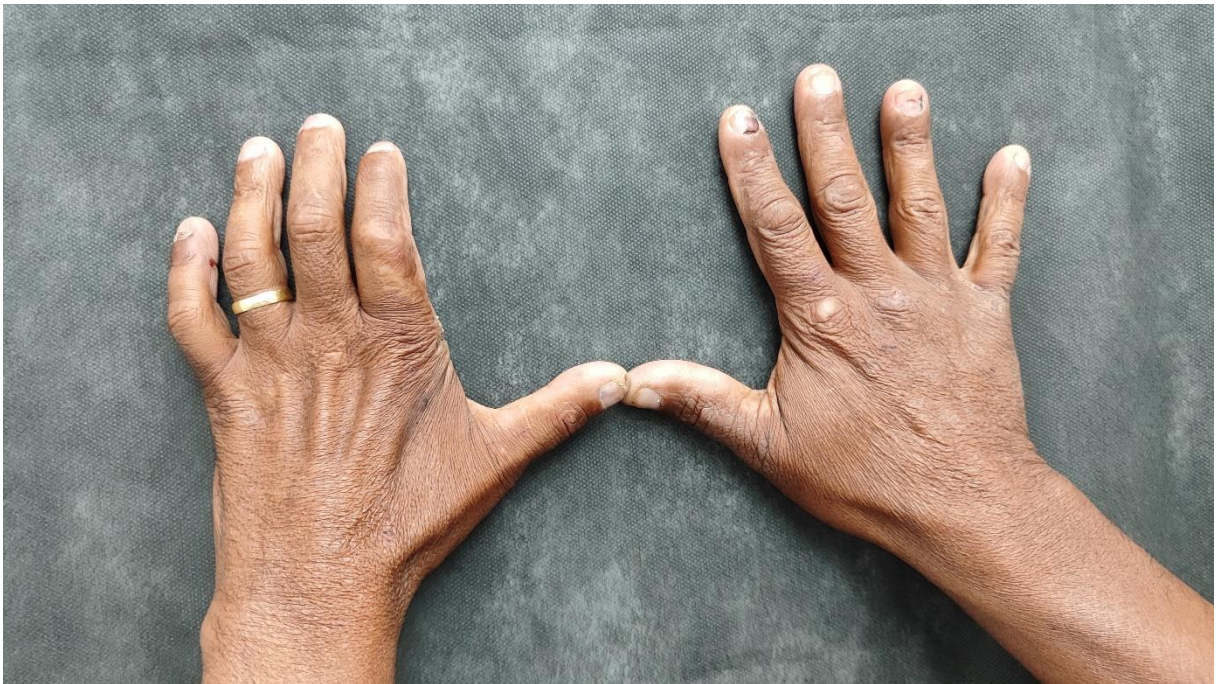
A despeito das lesões cutâneas, a Doença de Hansen vem sendo cada vez mais reconhecida como neuropatia periférica, cujas consequências em médio e longo prazo aceleram a perda funcional e reduzem a qualidade de vida nos indivíduos acometidos. As lesões nervosas podem ocorrer nas diversas formas da doença e vem se revelando mais difusas e comuns que previamente estimado, envolvendo nervos sensoriais, motores e autonômicos. O mecanismo de lesão é complexo e não bem estabelecido, indo além da resposta imune do indivíduo. Ao mesmo tempo em que pacientes com formas paucibacilares (exemplo a Tuberculóide) parecem apresentar o dano nervoso secundário a resposta do indivíduo a infecção, pacientes com formas multibacilares (imunidade celular incapaz de controlar a doença) também apresentam grande acometimento (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2020; HESS; RAMBUKKANA, 2019).

Rambukkana (2010) observou que a predileção pelas células de *Schwann* ocorre após a ligação a $\alpha 2$ -lamininas e adesinas localizadas na lâmina basal, e a receptores de superfície celular α -dístroglicanos e ErbB2. A entrada do bacilo nessas células parece promover uma desdiferenciação das mesmas em formas imaturas, favorecendo a multiplicação do patógeno e contribuindo para a disseminação sistêmica do microrganismo. A expressão fenotípica da doença parece então ser decorrente das diferentes vias biológicas moduladas pelo *M. leprae*, como a reprogramação de células de *Schwann* adultas e interações da imunidade inata e adaptativa (WHITE; FRANCO-PAREDES, 2015).

Em até 8% dos casos de hanseníase pode acontecer o comprometimento neural puro (forma neural pura primária), ou seja, sem lesões cutâneas sugestivas, aumentando a dificuldade diagnóstica, o atraso da terapêutica e o agravamento do dano,

sendo, inclusive, necessária a biópsia do nervo em algumas situações (Figura 7). Muitos desses pacientes são paucibacilares e o achado do bacilo mesmo em amostras histopatológicas pode ser inconclusivo. Outros meios diagnósticos devem ser então utilizados e o paciente encaminhado para serviços mais especializados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

Figura 7 - Hanseníase Neural Pura



Fonte: Imagem própria. Acervo pessoal.

- REAÇÕES HANSÊNICAS

As reações hansênicas são exacerbações das manifestações clínicas da hanseníase, ou seja, períodos de aumento da atividade da doença e subsequente piora dos sinais e sintomas. Podem acontecer em até 30-50% dos pacientes antes, durante ou após o tratamento com a poliquimioterapia. Sua fisiopatologia é decorrente do aumento da atividade imune, podendo agravar o dano e a incapacidade física, especialmente nos casos com comprometimento neural mais acentuado (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; WHITE; FRANCO-PAREDES, 2015).

Nos casos de reações após o tratamento, estas não devem ser confundidas com recidiva da doença ou falha terapêutica, podendo ocorrer até 5 anos do final da poliquimioterapia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

As reações são mais comuns em pacientes com as formas multibacilares e ocorrem por resposta imune exagerada, sendo didaticamente divididas em dois tipos: tipo 1 e tipo 2. É importante sinalizar que ambas podem se sobrepor e ocorrer conjuntamente em alguns casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021; NERY et al, 2013; WHITE; FRANCO-PAREDES, 2015).

-- Reação Hansênica Tipo 1: Também chamada de reação reversa, assemelha-se à fase aguda da doença. É causada pelo aumento na resposta imunológica contra o *M. leprae*, ou mesmo contra os fragmentos de bacilos mortos, promovendo um processo inflamatório intenso, com piora das lesões cutâneas e da inflamação neural (neurite), agravando os sintomas e dano incapacitante da doença. São reações de hipersensibilidade tardia, com aumento da resposta imune mediada pela imunidade celular (HOOIJ; GELUK, 2021). Seu tratamento usual é com corticosteroides em dose imunossupressora: prednisona na dose de 1mg/kg de peso (Figura 8).

Figura 8 - Reação Hansênica Tipo 1



Fonte: Ministério da Saúde, 2021.

-- Reação Hansênica Tipo 2: Também chamada de Eritema Nodoso Hansênico (ENH) ocorre mais comumente em formas multibacilares, especialmente a Virchowiana (até 50% dos casos). É resultado da resposta imune desencadeada por antígenos do bacilo de Hansen (fragmentos proteicos dos bacilos mortos) e formação de imunocomplexos, podendo inclusive comprometer órgãos e tecidos à distância e promover manifestações sistêmicas, tais como febre, mialgia e mal-estar. As lesões cutâneas são representadas com a formação de nódulos subcutâneos (paniculite em

análises histopatológicas). Outras manifestações como hepatite, nefrite e orquite também podem aparecer (Figura 9).

Figura 9 - Reação Hansênica Tipo 2



Fonte: Ministério da Saúde, 2021.

- DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da Hanseníase é essencialmente clínico, em especial, nos países endêmicos, acrescentando-se análises complementares, que são importantes para melhor classificação da forma da doença e da estratégia terapêutica (índice bacteriológico ou pesquisa histopatológica). Considera-se como paciente positivo aquele que apresenta pelo menos um dos três seguintes sinais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021):

- Lesão de pele com alteração de sensibilidade (térmica, tátil e/ou dolorosa);
- Espessamento de nervo periférico associado a alterações neuronais (sensitivas, motoras e/ou autonômicas);
- Presença de bacilos do *M. leprae* na bacterioscopia de esfregaço intradérmico ou em biópsia de pele.

O índice de bacilar (IB) é medido após pesquisa direta de bacilos álcool-ácido-resistentes presentes nos linfonodos de seis áreas do corpo em visualização no microscópio óptico. Os locais mais frequentes de coletas são o lobo da orelha e cotovelos, bem como nas lesões.

Situações mais complexas, como formas neurais puras, são de mais difícil avaliação, tornando-se necessários, então, mais recursos para a elucidação diagnóstica e o tratamento adequado (NAIK; MORE; JOSHI, 2022).

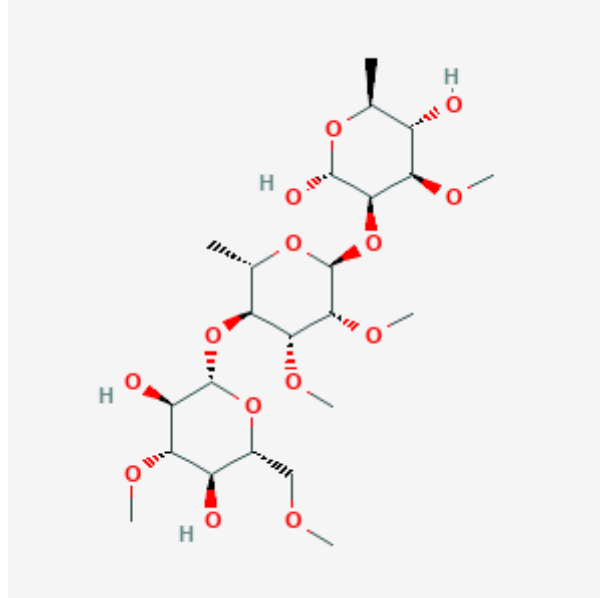
Os testes diagnósticos disponíveis dividem-se basicamente em dois grupos, os imunológicos e os que identificam diretamente o bacilo, incluindo a baciloscopia direta e os exames moleculares, sendo a reação de Cadeia de Polimerase (PCR) um dos mais promissores.

Revisão sistemática e Meta-análise recente (GURUNG et al., 2019) revisou e selecionou ao final 78 estudos sobre o assunto, dos quais 39 deles (50%) utilizaram o ELISA como referência de exame complementar, com sensibilidade que variou de 0 a 100% e especificidade que variou de 13-100%, sendo o antígeno PGL-1 (glicolípido fenólico -1) o mais estudado (31 trabalhos). Os testes moleculares foram aplicados em 22 estudos, dos quais 16 utilizaram a reação de cadeia de polimerase convencional (PCR), com sensibilidade que variou de 50-93% e especificidade que variou de 90 a 100%. Em cinco deles foram utilizados o PCR quantitativo (qPCR), com sensibilidade que variou de 51-91% e especificidade, de 46 a 100%.

-- ANTICORPOS ESPECÍFICOS PARA O *M. LEPRAE* – PGL-1

A parede celular do *M. leprae* contém uma extensa camada em grande parte composta por glicolípídeos, principalmente o glicolípídeo fenólico-1 específico do *M. leprae* (PGL-1). Este é considerado um marcador específico da hanseníase por conter um trissacarídeo que se comporta como um antígeno ainda não encontrado em outras bactérias (Figura 10) (BÜHRER-SÉKULA, 2008; HESS; RAMBUKKANA, 2019). Algumas análises mostram a participação do PGL-1 no tropismo do bacilo pelos nervos periféricos, sendo que estudo de Vincent, 2000, mostrou que o PGL-1 purificado liga-se especificamente à cadeia $\alpha 2$ - laminina da lâmina basal dos axônios das células de *Schwann* (NG et al., 2000).

Figura 10 - Estrutura molecular PGL-1 do *M. leprae*



Fonte: National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 45480571, Mycobacterium leprae PGL-1 trisaccharide¹.

A presença de anticorpos específicos para o *M. leprae* estão relacionados com a carga bacilar dos pacientes infectados e sua resposta imune. O anticorpo anti-PGL-1 está comumente presente em pacientes multibacilares, enquanto os paucibacilares costumam ser soronegativos (MAKHAKHE, 2021).

Os testes imunológicos apresentam limitações e dependem especialmente da capacidade de o organismo produzir proteínas específicas e anticorpos monoclonais ou policlonais, bem como da resposta imune mediada pelas células T e pelo Interferon γ (IFN γ). Pacientes com formas paucibacilares (PB) apresentam carga bacilífera baixa e baixa formação de anticorpos, porém parecem apresentar maior produção de IFN γ *in vitro* quando expostos a antígenos do *M. leprae* específico. Tal fato, entretanto, não ocorre em pacientes com formas multibacilares, que por sua vez apresentam maiores chances de detecção por PCR e pela dosagem de PGL-1. Observou-se ainda que a presença de IFN γ em valores mais elevados também ocorre em contactantes de pacientes confirmados (MARTINEZ et al., 2014).

¹ Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Mycobacterium-leprae-PGL-1-trisaccharide>. Acesso em: 19.09.2022.

--TESTES MOLECULARES

Alguns pacientes apresentam quadro de difícil diagnóstico, mesmo para equipes treinadas. A detecção do DNA do *M. leprae* em amostras favorece o diagnóstico preciso e início de terapêutica apropriada. As tecnologias mais utilizadas são a reação em cadeia de polimerase (PCR) e a reação em cadeia de polimerase em tempo real (qPCR) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

Os primeiros métodos de amplificação do DNA do *M. leprae* a partir do PCR ocorreram nas últimas duas a três décadas, com expressivo avanço a partir do sequenciamento genético do bacilo (COLE et al., 2001b; SINGH et al., 2015). Essa micobactéria apresenta importante estabilidade genômica mesmo com o passar dos anos, contribuindo para menor índice de resistência farmacológica e de falha terapêutica.

Diferentes sequências genéticas foram utilizadas como marcadores no PCR, como o antígeno 36kDa, antígeno 18-kDa, antígeno 65-kDa, complexo 85, 16S rDNA e sequências repetitivas de outros genes do patógeno, como o RLEP. O cromossomo do *M. leprae* contém 29 cópias do RLEP, cada uma com um núcleo invariável de 545bp, flanqueado algumas vezes por segmentos adicionais que variam de 44 a 100bp (TRUMAN et al., 2008).

Revisão sistemática de Tatipally; Srikantam; Kasetty (2018) sobre a PCR na avaliação diagnóstica de Hanseníase fez o levantamento dos estudos e com diversos marcadores genéticos, sendo o RLEP o marcador de maior sensibilidade (MARTINEZ et al., 2011; TURANKAR et al., 2015).

A quantidade e a qualidade do DNA também estão ligadas aos melhores resultados dos testes, sendo uma ferramenta potencial para se avaliar eventual resposta terapêutica (MARTINEZ et al., 2014). As técnicas de PCR podem ser aplicadas em diferentes espécimes de estudo, como pele, swabs, nervos, urina e sangue (DEPS; SANTOS; YAMASHITA-TOMIMORI, 2002; SANTOS et al., 1993; GAMA et al., 2018). Apesar do uso em amostras de pele e nervos ser a mais comum, métodos menos invasivos vêm sendo estudados para avaliar a ampliação da capacidade diagnóstica, especialmente em casos mais complexos.

Amostras de sangue ainda são pouco estudadas, com especificidade elevada, mas a sensibilidade ainda baixa (WEN et al., 2013; REIS et al., 2014). Dissertação de

Scalia (2022), analisou a presença da sequência RLEP em diferentes fases do sangue periférico (plasma, soro, células mononucleares de sangue periférico – PBMC, e série vermelha), tendo identificado o soro como fase com maior sensibilidade (sensibilidade = 11,54%; IC 95%= 5,39-22,97). Nesse estudo, utilizou-se 200µl de cada amostra e o marcador genético escolhido foi o RLEP.

-- REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE EM TEMPO REAL (QPCR)

A reação em cadeia de polimerase em tempo real (qPCR) é uma evolução da PCR, sendo descrita pela primeira vez por Higuchi e col. em 1992. Baseia-se no uso de sondas ou marcadores fluorescentes que permitem o acompanhamento em tempo real da replicação das sequências genéticas estudadas (ALEXANDRE, 2015), favorecendo uma melhor avaliação qualitativa e quantitativa.

No qPCR as amostras são colocadas em placas específicas de um Termociclador, aparelho capaz de reconhecer a emissão da fluorescência e transferir em tempo real essas informações para um programa de computador que realiza a leitura da reação. Suas análises gráficas são divididas em quatro fases (COELHO, 2013):

- *Ground phase*;
- Exponencial;
- Linear;
- Platô;

O ponto em que o nível da fluorescência chega ao limiar da fase exponencial é chamado *de threshold*. Este equivale ao número de ciclos que são necessários para que a fluorescência seja detectável pelo programa, ou seja, para que a reação transponha o limiar estabelecido, chamado de Quantification cycle (Cq) (KUBISTA et al., 2006; COELHO, 2013).

O valor de Cq é proporcional ao número de moléculas de DNA, permitindo também que as concentrações de DNA sejam comparadas à curva padrão. Um dos

sistemas usados no qPCR utiliza a TaqMan (TRUMAN et al., 2008), uma sonda que liga-se a extremidade 5' (*reporter*), responsável pela fluorescência emitida e por um *quencher*, que absorve a luminosidade emitida pelo *probe* anterior na extremidade 3' traçando um gráfico ao longo dos ciclos (KUBISTA et al., 2006).

Estudo de Sevilha-Santos, (SEVILHA-SANTOS; CERQUEIRA; GOMES, 2021), validou o uso do corante SYBR Green no qPCR do *M. leprae* para o gene RLEP. Esse corante liga-se de forma inespecífica à fita dupla de DNA, emitindo o sinal fluorescente captado pelo termociclador. Essa ligação inespecífica ao DNA pode gerar também uma amplificação, corrigida no estudo citado a partir da análise de curva melting (T_m), que corresponde ao ponto em que 50% do DNA encontram-se em fita simples.

- TRATAMENTO

A OMS e Ministério da Saúde têm como tratamento de primeira linha para a Hanseníase a poliquimioterapia com uso de três medicações: **rifampicina, dapsona e clofazimina**. O tempo de tratamento varia de acordo com a forma da doença, sendo 6 meses nas formas paucibacilares e 12 meses nas multibacilares (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017).

A dapsona é uma sulfa com ação bacteriostática capaz de inibir a multiplicação do *M. leprae* em modelos animais e humanos. A rifampicina é a principal droga bactericida na poliquimioterapia, bloqueando a transcrição genética e impedindo a formação de RNA. Age mais especificamente na subunidade β da RNA polimerase, impedindo sua ligação ao DNA e subsequente formação de RNM mensageiro, promovendo em pouco tempo a morte celular. A clofazimina é agente bactericida fraco para o *M. leprae*, mas é utilizado no esquema terapêutico para evitar a resistência a rifampicina e por seus outros efeitos, como ação anti-inflamatória. Também atua na prevenção das reações hansênicas tipo 2 nos indivíduos multibacilares. Esse esquema triplo diminui a resistência terapêutica à rifampicina (EBENEZER; SCOLLARD, 2021).

A padronização das medicações para os pacientes multibacilares e paucibacilares facilitou o acesso e adesão ao tratamento, bem como melhor chance de cobertura de pacientes com formas multibacilares com diagnóstico prévio

divergente, reduzindo a transmissão da doença. Estima-se a cura em até 98% dos pacientes, tendo uma taxa de recaída em torno de 1% em 5 a 10 anos, sendo baixas as resistências terapêuticas. A melhora clínica é variável, especialmente nos casos de neuropatia mais severa (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017).

Nos casos suspeitos de reinfecção após o tratamento por 12 meses, é importante seguir a investigação de resistência à poliquimioterapia. Nos pacientes resistentes à rifampicina, pelo menos duas drogas de segunda linha (claritromicina, minociclina ou uma quinolona), além da clofazimina, devem ser utilizadas diariamente por um período de 6 meses, seguido da clofazimina e de um desses fármacos por outros 18 meses. Nos casos de resistência às quinolonas, elas não devem fazer parte do esquema terapêutico alternativo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017).

- IMUNOPROFILAXIA

As diretrizes clínicas brasileiras recomendam a imunoprofilaxia dos contactantes maiores de 1 ano de pacientes com hanseníase, tanto dos não vacinados ou dos que receberam apenas uma dose da vacina BCG. A revacinação é contraindicada em pacientes com imunodeficiência primária ou adquirida, incluindo portadores de neoplasias malignas, usuários de corticóides em doses elevadas e gestantes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

A vacinação com a BCG, apesar de promissora, não aparenta prevenir a infecção pelo bacilo de Hansen. Parece estar associada à soropositividade para o PGL-1, por mecanismo também ainda não estabelecido (SARNO et al., 2012).

JUSTIFICATIVA

A hanseníase é uma doença infecciosa causada pelo *M. leprae* ou pelo *M. lepromatosis*. Apesar da etiologia infecciosa, a maioria das manifestações clínicas da doença são decorrentes da resposta imunológica provocada pelo bacilo infectante. A doença causa elevado impacto físico e social aos pacientes acometidos. Por ter maior incidência e prevalência nos países em desenvolvimento, com destaque negativo para Índia e Brasil, os investimentos em pesquisa e saúde são baixos, configurando uma doença ainda negligenciada.

A principal estratégia para o combate à hanseníase como problema de Saúde Pública consiste no diagnóstico precoce e na instituição do tratamento, contribuindo para a quebra da cadeia de transmissão da doença e subsequente redução do número de casos e grau de incapacidade física. O diagnóstico da hanseníase permanece clínico e exames laboratoriais complementares são escassos. Apenas a baciloscopia atua na definição de caso, sendo este um exame com baixa sensibilidade.

A busca por novas estratégias, incluindo o desenvolvimento de ferramentas diagnósticas sensíveis e específicas são primordiais para o combate à doença, sendo os testes moleculares promissores, especialmente os que analisam a presença da sequência RLEP nos tecidos. O aprimoramento diagnóstico favorece o início mais rápido do tratamento, bem como a redução das taxas de infecção e de incapacidade.

OBJETIVOS

- OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo é avaliar qualitativa e quantitativamente a acurácia dos testes diagnósticos moleculares da hanseníase, utilizando-se o soro extraído de amostras de sangue periférico e de solução concentrada do mesmo nos participantes do estudo, visando ao aprimoramento de técnicas para diagnóstico molecular da doença.

- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a acurácia da detecção do DNA no soro extraído do sangue periférico para o diagnóstico da hanseníase;
- Propor estratégia para concentração de soro periférico com o objetivo de aumentar a concentração de possíveis moléculas circulantes;
- Avaliar a acurácia da detecção do DNA no soro concentrado extraído do sangue periférico para o diagnóstico da hanseníase;
- Conhecer o perfil epidemiológico de paciente atendido no Hospital Universitário de Brasília com suspeita de hanseníase;

METODOLOGIA

Trata-se de um estudo transversal analítico, com objetivo de avaliar a acurácia diagnóstica de uma nova técnica laboratorial (detecção de fragmento genético do *M. leprae* no soro concentrado de pacientes) para o diagnóstico de Hanseníase. Os pesquisadores do estudo só tiveram o conhecimento da real classificação do paciente após a análise quantitativa e qualitativa final.

- POPULAÇÃO DO ESTUDO E AMOSTRAGEM

Trata-se de pesquisa clínica que envolveu os pacientes imunocompetentes atendidos no ambulatório de Hansenologia do Hospital Universitário de Brasília (HUB) de 01/06/2020 a 01/06/2021 que aceitaram participar do estudo. O estudo contou com a inclusão de uma amostra de conveniência. Os pacientes foram incluídos de forma consecutiva.

- CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos os pacientes atendidos no ambulatório de Hansenologia do Hospital Universitário de Brasília (HUB) que aceitaram participar do estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

- CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos pacientes imunossuprimidos, além daqueles que não concordaram em participar da pesquisa ou não assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido para participação na pesquisa. Não foram incluídas populações especiais, como populações indígenas, devido às limitações éticas vigentes.

- COMITÊ DE ÉTICA

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília pelo número de protocolo 34164820.6.0000.0030. Todos os pacientes foram incluídos após concordância e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.

- DEFINIÇÃO DE CASO E CONTROLE

Após inclusão dos pacientes, foram realizados os exames índices da pesquisa para teste (avaliação do soro) e exames padrão para o diagnóstico da hanseníase. Todos os pesquisadores desconheciam a real condição do paciente no momento da inclusão e coleta dos exames índice. Foram considerados os casos positivos os pacientes atendidos com hanseníase segundo os critérios da OMS. Foram considerados controles os pacientes atendidos que não receberam o diagnóstico de hanseníase, incluindo contactantes de casos confirmados.

- CLASSIFICAÇÃO DOS PACIENTES ENTRE CASOS E CONTROLES

O diagnóstico da doença seguiu as recomendações da Organização Mundial de Saúde e Ministério da Saúde do Brasil, com os pacientes estratificados conforme a classificação de Madri. Foi considerado positivo o paciente que apresentasse um ou mais dos seguintes critérios e que o especialista responsável decidiu pelo tratamento:

- Lesões de pele com alteração de sensibilidade;
- Lesões neurológicas assimétricas, espessamento neural ou deformidades;
- Achado do bacilo no exame de baciloscopia ou em biópsia de pele.

- EXAME ÍNDICE (ANÁLISE SOROLÓGICA POR PCR EM TEMPO REAL)

Na primeira avaliação foi coletado sangue venoso, preferencialmente de punção da fossa cubital, armazenado em Tubo Gel BD SST® II Advance® com ativador de coágulo.

Após a coleta do sangue, a amostra foi centrifugada (2000rpm) por 10 minutos, sendo separado então o soro do sobrenadante. As amostras foram armazenadas refrigeradas a -80°C até o momento de preparação, extração e amplificação do DNA, conforme os manuais do *Pure Link Genomic DNA Mini Kit*®. O gene escolhido no estudo foi o RLEP, sendo as reações realizadas em um termociclador Quantstudio 1 (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA*).

-- ETAPAS

1) Preparação das amostras e Extração do DNA purificado.

Foram utilizados o mínimo 200 μl de soro concentrado de cada amostra.

- Preparação do lisado de células:

A análise molecular do sangue periférico se deu por 2 maneiras comparativas:

1 análise do soro periférico não processado ("soro normal") e análise do soro periférico após técnica de concentração.

Soro periférico não processado

Após a retirada das amostras armazenadas em *ependorfs* de 1500 μl do freezer a -80°C , estas foram utilizadas, sem qualquer processamento, para análise comparativa.

Soro concentrado

Após a retirada das amostras armazenadas em *ependorfs* de 1500 μl do freezer a -80°C , estas foram aquecidas a 90°C por 1h. Esta etapa reduziu o volume

da amostra e garantiu que maior parte do material fosse analisada em comparação ao formato usual.

- Na sequência foram adicionados em cada frasco:
 - 180µl do tampão de digestão genômica da Pure Link (Pure Link® Genomic Digestion Buffer), devendo a solução cobrir todo o material biológico;
 - Adição de 20µl de Proteinase K.
- As amostras foram vortexadas e incubadas a 55°C por 24h.
- Para remoção de partículas, seguiu-se com a centrifugação em velocidade máxima por 3 minutos na temperatura ambiente.
- Transferência do sobrenadante para novo tubo estéril.
- Adição de 20µl de RNase A, vortexar e incubação por 2 minutos em temperatura ambiente.
- Adição de 200µl de Tampão de lise/ligação (*Genomic Lysis/Binding Buffer*®). Misturar bem.
- Adição de 200µl de etanol 96-100%. Misturar bem.

- Ligação do DNA – estágio de concentração do DNA;
- Lavagem do DNA – etapa de quebra de lipídios e proteínas das membranas celulares;
- Eluição do DNA - liberação dos ácidos nucléicos, com o DNA purificado.

2) Reação em Cadeia de Polimerase em tempo real (qPCR)

A partir do DNA purificado, procedeu-se à realização da reação em Cadeia de Polimerase em tempo real, com as seguintes concentrações e proporções de reagentes (Tabela 1):

Tabela 1 - Volume das soluções utilizadas no termociclador Quantstudio 1 para realização de PCR em tempo real

<i>Reagentes</i>	<i>Volume</i>
<i>SyBR green</i>	7,5µl
<i>Primer F</i>	0,45µl
<i>Primer R</i>	0,45µl
<i>H2O</i>	3,6µl
<i>Total</i>	12µl

Fonte: Elaboração própria.

Em cada poço da placa do aparelho termociclador Quantstudio 1 foram adicionados 3µl de DNA purificado e 12µl do Mix acima. Os ensaios qualitativos e quantitativos de qPCR foram realizados utilizando SYBR Green (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA) e primers para amplificar o gene RLEP, conforme descrito pelo estudo de Sevilha-Santos, Cerqueira e Gomes em 2021.

Por meio da ferramenta Geneart (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, EUA), foi confeccionado 5 microgramas do alvo genético correspondente com 481 pares de bases (pb) pertencentes ao genoma do *Mycobacterium leprae* após conferência pela ferramenta Primer-BLAST:

5'-

GCTTCGTGTGCTTTGCCGCAGTGGACACGATTAGCGCGGCGCACGTAAG
 CATGTCGGTGGTGGATGCTGCTTGGTCTACATGTTGATGATGCCAGGGG
 CTGGGCACCTGGGCTGTGCTGAAGGCGATATCGATGCAGGCGTGAGTG
 TGAGGATAGTTGTTAGCGCCGCGGGGTAGGGGCGTTTTAGTGTGCATGT
 CATGGCCTTGAGGTGTCGGCGTGGTCAATGTGGCCGCACCTGAACAGG
 CACGTCCCCGTGCACGGTATAACTATTCGCACCTGATGTTATCCCTTGCA
 CCATTTCTGCCGCTGGTATCGGTGTCGGCGGCTTGTTGACCGGCCCTCA
 GCCAGCAAGCAGGCATGCCGCCGGGTGCAGCAGTATCGTGTTAGTGAA
 CAGTGCATCGATGATCCGGCCGTCGGCGGCACATACGGCAACCTTCTAG
 CGCAGATCAACCACCCACACCCACCCAGCCCACCACAACACC

- 3'

Este fragmento foi utilizado como controle positivo para as reações, uma vez que o bacilo alvo não pode ser cultivado por meios artificiais.

Os iniciadores (*primers*) utilizados para a reação foram 5' – CTTGCACCATTCTGCCGCT – 3' e 5' – TGCGCTAGAAGGTTGCCGTA – 3', específicos para o gene RLEP do *Mycobacterium leprae*, que tem 37 cópias por célula e resulta em um fragmento de 156 pares de base. A amplificação foi feita com temperatura inicial de 95° por 20s, seguida de 45 ciclos de 95° por 3s, 55° por 10s e 60° por 30s (Tabela 2). O melting foi processado com incrementos de 0,3°C a partir de 55°C a 95°C.

Tabela 2 - Programação Quant Studio

ETAPA	TEMPERATURA	TEMPO	CICLOS
UDG ativação	50 °C	2min	1x
Ativação enzima	95 °C	2min	1x
Desnaturação	95 °C	15s	45x
Anelamento	60°C	1min	45x

Fonte: Elaboração própria.

A curva padrão de quantificação foi realizada considerando-se que cada bacilo do *Mycobacterium leprae* apresenta 37 cópias do RLEP (gene alvo do estudo). A quantificação mínima detectada foi de 0,03 bacilos.

- CRITÉRIOS DE POSITIVIDADE

A validação do teste seguiu o descrito por Sevilha-Santos, Cerqueira e Gomes (2021) e considerou a positividade em caso de qualquer amplificação compatível com o gene alvo avaliado pela amplificação e pela curva melting.

- ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na análise estatística foram considerados os testes Qui-quadrado ou Fisher na avaliação de variáveis categóricas nominais. As variáveis quantitativas foram analisadas utilizando-se os testes t- de Student e de Mann-Whitney, a depender da distribuição normal ou não da amostra avaliada, respectivamente.

Por sua vez, na comparação entre as amostras de soro e soro concentrado foi utilizado o teste pareado de *Mcnemar* e o método *Kappa*. Na análise das informações sociodemográficas foram utilizadas fórmulas da média, mediana e desvio-padrão. Foram ainda determinados a sensibilidade, a especificidade, a acurácia, o valor preditivo negativo e o valor preditivo positivo dos testes estudados.

As plataformas utilizadas foram o OpenEpi e Excel, com suplemento Real Statistics e pelo software R, pacote ePI.

RESULTADOS

Foram incluídos no presente estudo um total de 56 pacientes, sendo 20 casos e 36 controles. As idades apresentaram distribuição normal em ambos os grupos, com média de 39,9 anos (DP 17,3) no grupo dos casos e 45,19 anos no dos controles (DP 14,75) e p-valor de 0,256, bem como mediana de 42 e 44, respectivamente (gráfico 1). No grupo dos casos, 45% (n=9) dos pacientes eram de sexo feminino e 55% (n=11) de sexo masculino, com 55,56% (n=20) e 44,44% (n=16), no grupo dos controles, respectivamente (gráfico 2). Estas características não foram diferentes entre os grupos de casos ou controles (Tabela 3).

No grupo controle, 94,44% (n=34) dos indivíduos eram contactantes de pacientes com hanseníase (χ^2 - $p < 0,001$). Alguns dos participantes tiveram hanseníase no passado, sendo 35% (n=7) dos pacientes no grupo dos casos e 11,11% (n=4), no dos controles (F p 0,08).

Em relação à naturalidade, temos 35% (7/20) de indivíduos naturais do DF no grupo dos casos e 27,78% (10/36) entre os controles, bem como 35% (7/20) e 41,67% (15/36) de estados da região Nordeste, respectivamente. As demais regiões podem ser visualizadas no Gráfico 4. Nenhum participante era da região Norte. A maioria dos participantes de ambos os grupos eram procedentes do Distrito Federal (DF) (60% dentre os casos e 77,78% dentre os controles, com $p = 0,35$). No grupo dos casos, apenas um paciente era procedente do Nordeste (Maranhão), sendo os demais dos estados de Minas Gerais e Goiás, incluindo áreas do entorno do DF. Nos controles, 87,5% dos pacientes de fora do DF (n=7) eram da região do entorno.

Quanto ao tempo de moradia no DF, temos uma amostra anormal, com média e mediana de 13,65 (DP 15,73) e 8, respectivamente, entre os casos e de 14,69 (DP 15,64) e 7,5 nos controles. O teste de Mann Whitney mostrou que não há diferença entre os grupos em relação ao tempo no DF e a Hanseníase ($U = 328$; p - valor 0,593).

No quesito etnia/raça, no grupo dos casos temos 70% entre negros e pardos (35% em cada grupo), 25% de brancos e 5% de amarelos. Nos controles, a distribuição se inverte e temos quase 70% (69,44%) de brancos, com 16,67% de pardos e 13,89% de negros, sem asiáticos (Gráfico 5).

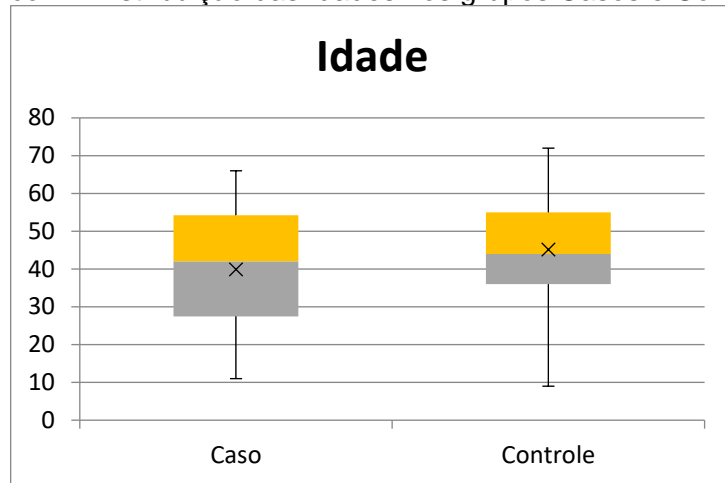
A frequência da vacinação para BCG foi de 65% no grupo dos casos e 75% nos controles, com p-valor 0,31. Alguns indivíduos tomaram duas doses da vacina, sendo 23,07% no grupo dos casos vacinados e 51,85% nos vacinados do grupo controle. A Tabela 3 demonstra os achados descritos

Tabela 3 - Informações Sociodemográficas dos pacientes em estudo

	Casos (n = 20)	Controles (n = 36)	p-valor
Idade			
Média (DP)	39,90 (17,30)	45,19 (14,75)	0,256
Mediana	42	44	
Sexo			
Feminino	9 (45,00%)	20 (55,56%)	0,632
Masculino	11 (55,00%)	16 (44,44%)	
Contactantes	0	34 (94,44%)	<0,001
Hanseníase prévia	7(35,00%)	4 (11,11%)	0,083 (Fisher)
Naturalidade			
*DF	7 (35%)	10 (27,78%)	0,45 (Fisher)
Nordeste	7 (35%)	15 (41,67%)	0,48 (Fisher)
Centro Oeste	2 (10%)	2 (5,56%)	0,46 (Fisher)
Sudeste	4 (20%)	7 (19,44%)	0,61 (Fisher)
Sul	0	2 (5,56%)	0,42 (Fisher)
Norte	0	0	NA
Procedência			
DF	12 (60%)	28 (77,78%)	0,35 (Fisher)
Outros estados	8 (40%)	8 (22,22%)	0,23 (Fisher)
Tempo no DF em anos: média (DP)	13,65 (15,73)	14,69 (15,64)	0,813
Etnia (%)			
Amarelo	1 (5,00%)	0 (0)	0,368 (Fisher)
Branco	5 (25,00%)	25 (69,44%)	0,051 (X ²)
Pardo	7 (35,00%)	6 (16,67%)	0,186 (F)
Negro	7(35,00%)	5 (13,89%)	0,130 (F)
Doses de BCG: mediana (IIQ)	1(1.00) + em 13/20 (65%) 2 doses em 3/13 (23,07%)	1(1.25) + em 27/36 (75%) 2 doses em 14/27 (51,85%)	0,08 0,31 (F)

Fonte: Elaboração própria.

Gráfico 2 - Distribuição das Idades nos grupos Casos e Controles



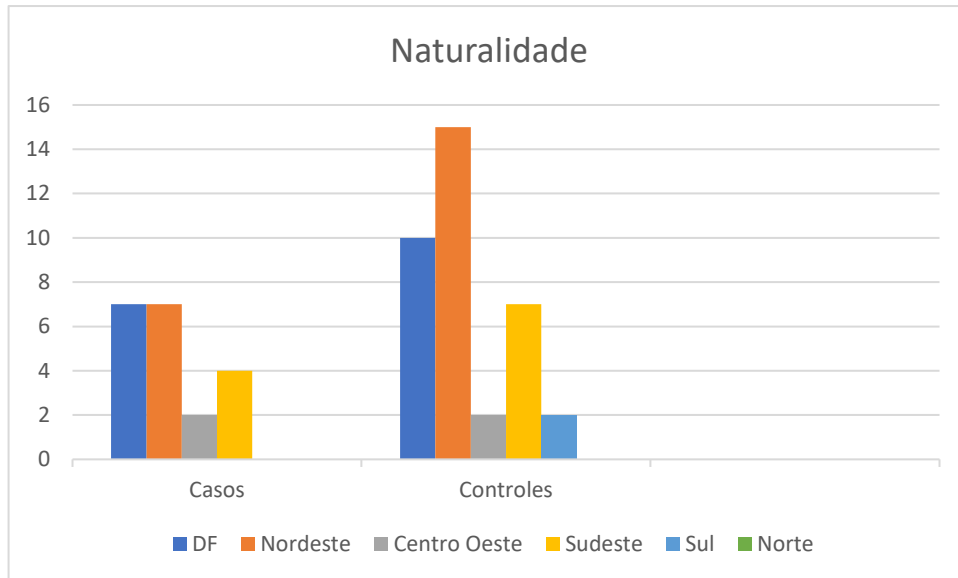
Fonte: Elaboração própria.

Gráfico 3 - Distribuição do Sexo entre os grupos Casos e Controles



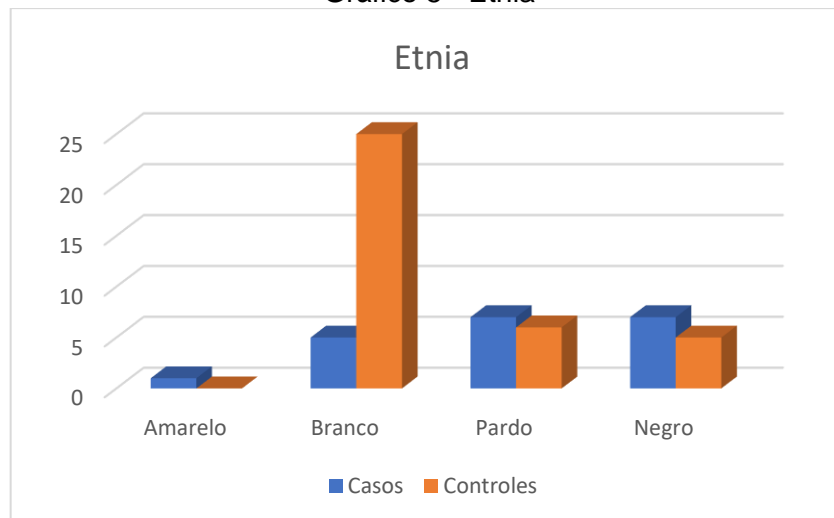
Fonte: Elaboração própria.

Gráfico 4 - Naturalidade



Fonte: Elaboração própria.

Gráfico 5 - Etnia



Fonte: Elaboração própria.

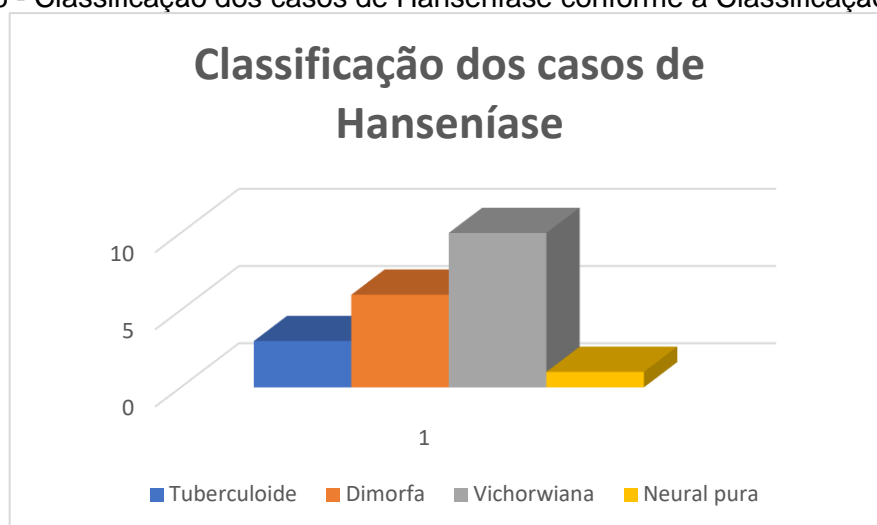
Os pacientes diagnosticados com hanseníase tinham a forma Virchowiana (multibacilar) na maioria dos casos (50%), seguido das formas dimorfa (30%), tuberculóide (15%) e neural pura (5%) (Tabela 4 e Gráfico 6).

Tabela 4 - Classificação dos Casos de Hanseníase - Classificação de Madri

Classificação casos	
Tuberculóide	3 (15%)
Dimorfa	6 (30%)
Virchowiana	10 (50%)
Neural pura	1 (5%)

Fonte: Elaboração própria.

Gráfico 6 - Classificação dos casos de Hanseníase conforme a Classificação de Madri



Fonte: Elaboração própria.

- TESTE ÍNDICE

O trabalho anterior de Scalia (2022) utilizou, conforme mencionado, 200µl de soro, enquanto a análise do presente estudo utilizou o conteúdo de um eppendorf de 1500µl, o chamado soro concentrado. Apenas 2 pacientes tiveram a expressão do gene RLEP na análise de soro concentrado, gerando sensibilidade de 10% (Tabela 5). A avaliação do soro concentrado demonstrou melhor acurácia, pois a especificidade foi de 100%, enquanto a especificidade no soro normal ficou em 94,44%.

No caso da análise tradicional do soro, 3 controles testaram positivo. Ambas técnicas não apresentaram diferença estatística ($p = 0.633$), apesar da melhor especificidade no soro concentrado. Entretanto, a avaliação de concordância pelo

método Kappa resultou em 0.3 (IC 95% - 0.05 - 0.55), mostrando que os testes não têm boa concordância.

Tabela 5 - Positividade no qPCR

Amostra	Soro (200µl)	Soro Concentrado (ependorf 1500µl)
Sensibilidade – positivo/hanseníase (IC95%)	10,00% - 2/20 (2,79-30,10)	10,00% - 2/20 (2,79-30,10)
Especificidade – negativo/controles (IC95%)	91,67% - 33/36 (81,86-98,46)	100% - 36/36 (90,36-100,00)
Valor Preditivo Positivo (VPP)	40% (11,76, 76,93)	100% (34,24 – 100,00)
Valor Preditivo Negativo (VPN)	64,71% (50,99-76,37)	66,67% (53,36-77,76)
Acurácia	62,5% (49,41 – 73,99)	67,86% (54,82 – 78,6)

Fonte: Elaboração própria.

Na análise quantitativa dos dois casos positivos, obteve-se uma quantificação de 0,03 bacilos por reação e outro de 0,082 bacilos por reação no grupo do soro concentrado (Tabela 6).

Tabela 6 - Análise quantitativa qPCR indicando o número de bacilos por amostra

Casos	Soro Concentrado (Bacilos)	Soro Normal (Bacilos)
<i>Caso A</i>	0,03	0
<i>Caso B</i>	0,082	0,068
<i>Caso C</i>	0	0,043
Controles		
<i>Controle A</i>	0	0,05
<i>Controle B</i>	0	0,01
<i>Controle C</i>	0	0,00050774

Fonte: Elaboração própria.

DISCUSSÃO

A hanseníase é uma doença muito antiga, mas, ainda assim, configura importante problema de saúde pública em diversas regiões do mundo, especialmente em países como Índia e Brasil, onde a doença é endêmica e a sua incidência, mesmo estando em queda, segue elevada. Por acometer majoritariamente países em desenvolvimento, é tida como doença negligenciada.

Simultaneamente à meta de **Hanseníase Zero** até 2030, defendida pela OMS para a próxima década em uma série de países do mundo, estimula-se a redução do número de casos para <1 a cada 10.000 indivíduos nas demais regiões (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2021b).

O Brasil, com suas dimensões continentais, apresenta distribuição heterogênea da doença em território nacional, com áreas inclusive hiperendêmicas (≥ 40 casos/10.000 habitantes). O Distrito Federal, por sua característica central, atende com frequência pacientes residentes em outros estados. No presente estudo, 40% dos pacientes com a doença eram procedentes de fora do DF, enquanto 35% dos casos eram naturais do DF.

Segundo o Boletim Epidemiológico da Subsecretaria de Vigilância Sanitária do Distrito Federal (SVS), no ano de 2019, o DF notificou 181 novos casos de Hanseníase, 214 casos em 2020 e 130 casos em 2021, com taxa de transmissão de 1,3 por 10.000 habitantes. A distribuição na unidade federativa também é heterogênea, com regiões onde a incidência ocorre acima de 10/10.000 (região leste – Planaltina, Fercal, Sobradinho) (SECRETARIA DE SAÚDE DF, 2022). Entretanto, é possível que os números mais recentes sejam inferiores à realidade devido ao maior atraso na procura dos serviços de saúde e à subnotificação agravada pela pandemia do novo coronavírus.

No quesito étnico e racial, as discrepâncias também são evidentes. No grupo dos casos, 70% são de pardos e negros (mesma proporção em ambos), enquanto nos controles essa relação se inverte e a maioria é branca (69,44%). Historicamente, no Brasil, a população parda e negra apresenta maiores problemas socioeconômicos e maior dificuldade de acesso adequado aos serviços de saúde. Em relação ao sexo,

houve distribuição semelhante entre os grupos casos e controles, sem predominância estatística entre os sexos masculino e feminino.

Poucos estudos definiram o sangue como tecido de análise nos casos de hanseníase, embora seja um potencial campo de pesquisa devido à possibilidade de uso em maior escala e de forma menos invasiva. Dentre os testes diagnósticos mais promissores, temos os imunológicos e os moleculares.

O antígeno PGL-1, específico para o *M. leprae*, promove a formação de anticorpos específicos e relaciona-se com a carga bacilar dos pacientes infectados e sua resposta imune. Está comumente presente em pacientes multibacilares, enquanto os paucibacilares costumam ser soronegativos, constituindo limitação ao teste.

Em relação aos testes moleculares, temos o PCR e o qPCR, sendo o último capaz de fornecer a informação quantitativa e a qualitativa do material analisado, um aprimoramento da tecnologia inicial. O principal marcador genético estudado é o RLEP (MARTINEZ et al., 2011; TURANKAR et al., 2015).

O trabalho de Scalia (2022) estudou a presença do RLEP em diferentes fases do sangue periférico, dentre as quais o soro mostrou-se a fase de maior sensibilidade. Foram utilizados o corante SyBR Green e o marcador RLEP, validados em trabalho de Sevilha-Santos, Cerqueira e Gomes (2021). Foram utilizados 200µl de cada material processado, com sensibilidade de 11,54% (IC (11,54%; 95%CI = 5,39-22,97) e especificidade de 91,67%.

Com o intuito de aumentar a sensibilidade e a especificidade do exame, no estudo atual foram utilizados até 1500µl de soro congelado. O método proposto para a concentração do sangue foi o de aquecimento para desidratação da amostra e redução do volume a ser analisado. A sensibilidade encontrada foi de 10% (IC 95% 2,79-30,10), com especificidade de 100% (IC 95% - 90,36-100,00), bem como Valor Preditivo positivo de 100% (IC 95% 34,24 – 100,00) e valor preditivo negativo de 66,67% (IC 95% 53,36-77,76). O uso do soro concentrado foi mais vantajoso que na análise de 200µl por apresentar maior especificidade, mas verifica-se que o sangue não é o melhor tecido para análise de qPCR. Análises de tecidos diretamente comprometidos, tais como pele ou lesões, apresentam melhores indicadores (GAMA et al., 2018; TATIPALLY; SRIKANTAM; KASETTY, 2018).

Na avaliação do soro concentrado, nenhum caso de falso-positivo foi detectado no grupo dos controles. Já na avaliação do soro normal, 3 pacientes apresentaram falso-positivo. Todos eram contactantes de casos confirmados, podendo tal achado estar relacionado à exposição ao bacilo sem o desenvolvimento da doença clinicamente expressa, ao menos no momento da avaliação inicial. A especificidade encontrada foi então de 100% na análise do soro concentrado *versus* 91,67% no soro normal.

Outra diferença entre essa pesquisa e a de Scalia (2022) foi o manuseio da amostra congelada, de onde foi aspirado diretamente após breve descongelamento. Na análise do soro concentrado, as amostras foram colocadas a 90°C por 1h, para posteriormente serem processadas. Tal ação pode ter contribuído para desnaturar parte do DNA e dos elementos proteicos dos compostos estudados, reduzindo sua sensibilidade.

O presente estudo sugere que o sangue não é o melhor tecido a ser utilizado no diagnóstico laboratorial da hanseníase. Mesmo com o aprimoramento de técnicas e a concentração da amostra, o qPCR do RLPE no soro dos pacientes acometidos mantém baixa sensibilidade, limitando sua indicação em larga escala. Ainda assim, sua especificidade elevada pode contribuir na avaliação de casos de difícil manejo.

CONCLUSÃO

Em resposta aos objetivos propostos pelo presente estudo podemos concluir que:

- A análise do soro periférico concentrado apresentou baixa acurácia para o diagnóstico da hanseníase, efeito explicado por uma baixa sensibilidade do teste.
- A concentração do soro periférico não elevou a sensibilidade da análise, apesar de ter melhorado a especificidade do diagnóstico molecular da hanseníase.
- Componentes do sangue periférico não parecem ser amostras adequadas para o diagnóstico molecular da hanseníase.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, M. G. Hanseníase no Brasil Leprosy in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. [s.l: s.n.].
- BRASIL, Ministério da Saúde. **Banco de dados do Sistema Único de Saúde-DATASUS**. Disponível em: <https://datasus.saude.gov.br/sistema-de-gestao/>. Acessado em: 29 de julho de 2022.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Guia para o Controle da hanseníase**. Brasília: Ministério da Saúde, 2002. (Série A. Normas e Manuais Técnicos; n. 111) ISBN: 85-334-0346-1.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Guia prático sobre a hanseníase** [recurso eletrônico]. Brasília: Ministério da Saúde, 2017. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_pratico_hanseniase.pdf. ISBN: 978-85-334-2542-2.
- BÜHRER-SÉKULA, S. **Sorologia PGL-I na hanseníase** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. [s.l: s.n.].
- BUJANG, M. A.; ADNAN, T. H. Requirements for minimum sample size for sensitivity and specificity analysis. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 10, n. 10, p. YE01–YE06, 2016.
- CÁCERES-DURÁN, M. Á. Comportamiento epidemiológico de la lepra en varios países de América Latina, 2011-2020. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 46, p. 1, 23 mar. 2022.
- CARLOS LASTÓRIA, J. I.; APARECIDA MILANEZ MORGADO DE ABREU, M. I. **Hanseníase: diagnóstico e tratamento** *Diagn Tratamento*. [s.l: s.n.].
- CHEN, K.-H. et al. Leprosy: A Review of Epidemiology, Clinical Diagnosis, and Management. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2022, p. 1–13, 4 jul. 2022.
- COLE, S. T. et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. **Nature**, v. 409, n. 6823, p. 1007–1011, fev. 2001a.
- DA SILVA, M. B. et al. Evidence of zoonotic leprosy in Pará, Brazilian Amazon, and risks associated with human contact or consumption of armadillos. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 6, 1 jun. 2018.
- DEPS, P. D. et al. Prevalence of Mycobacterium leprae in armadillos in Brazil: A systematic review and meta-analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 3, 1 mar. 2020.
- DEPS, P. D.; ROSA, P. S. One Health and Hansen's disease in Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 5, p. e0009398, 27 maio 2021.
- DEPS, P. D.; SANTOS, A. R.; YAMASHITA-TOMIMORI, J. Detection of Mycobacterium leprae DNA by PCR in blood sample from nine-banded armadillo:

preliminary results. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v. 70, n. 1, p. 34-35, 2002.

EBENEZER, G. J.; SCOLLARD, D. M. Treatment and Evaluation Advances in Leprosy Neuropathy. **Neurotherapeutics**, v. 18, n. 4, p. 2.337–2.350, 19 out. 2021.

FRANCO-PAREDES, C. et al. Cutaneous Mycobacterial Infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 32, n. 1, 19 dez. 2018.

GAMA, R. S. et al. High frequency of *M. leprae* DNA detection in asymptomatic household contacts. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, 2 abr. 2018.

GURUNG, P. et al. Diagnostic accuracy of tests for leprosy: a systematic review and meta-analysis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 11, 2019a.

HESS, S.; RAMBUKKANA, A. Cell Biology of Intracellular Adaptation of *Mycobacterium leprae* in the Peripheral Nervous System. **Microbiology Spectrum**, v. 7, n. 4, 19 jul. 2019.

HIGUCHI, R.; DOLLINGER, G.; WALSH, P.S.; GRIFFITH, R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA-sequences. **Bio-Technology**, New York, US, v.10 p.413– 417, 1992.

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, 11 maio 2021.

KIRCHHEIMER, W. F.; STORRS, E. E. Attempts to establish the armadillo as a model for the study of leprosy. I. Report of lepromatoid leprosy in an experimentally infected armadillo. **International Journal of Leprosy**, v. 39, p. 693–702, 1971.

KUBISTA, M.; ANDRADE, J.M.; BENGTSSON, M.; FOROOTAN, A.; JONA´K, J.; LIND, K.; SINDELKA, R.; SJO´BACK, R.; SJO´GREEN, B.; STRO´MBOM, L.; STA´HLBERG, A. & ZORIC, N. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, 2006.

LASTÓRIA, Joel Carlos; ABREU, Marilda Aparecida Milanez Morgado de. Hanseníase: diagnóstico e tratamento. **Diagn. Tratamento**, São Paulo, 17(4):173-9, 2012.

MAKHAKHE, L. Leprosy review. **South African Family Practice**, v. 63, n. 1, 29 out. 2021.

MARQUES, N. P. et al. Impact of the coronavirus disease 2019 on the diagnoses of Hansen's disease in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 54, 2021.

MARTINEZ, A. N. et al. Evaluation of qPCR-Based Assays for Leprosy Diagnosis Directly in Clinical Specimens. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 10, p. e1354, 11 out. 2011.

MARTINEZ, A. N. et al. PCR-Based Techniques for Leprosy Diagnosis: From the Laboratory to the Clinic. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 4, 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE - MS. Coordenação de Gestão e Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas. **Relatório de recomendação**: Protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas da Hanseníase. Brasília – DF: Ministério da Saúde, dez. 2021. Disponível em: <http://conitec.gov.br/>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE – MS. Subsecretaria de Vigilância à Saúde | Secretaria de Saúde do Distrito Federal. Situação Epidemiológica da Hanseníase no Distrito Federal. **Informativo Epidemiológico**, Ano 17, nº 1, maio de 2022.

MINISTÉRIO DA SAÚDE – MS. Subsecretaria de Vigilância à Saúde | Secretaria de Saúde do Distrito Federal. Hanseníase 2022. **Boletim Epidemiológico de Hanseníase**, número especial, jan. 2022. ISSN: 9352-7864.

NAIK, S.; MORE, S.; JOSHI, S. Histomorphological Correlation with Bacteriological Index in Leprosy Patients. **Iranian Journal of Pathology**, v. 17, n. 1, p. 48–55, 1 jan. 2022.

NERY, J. A. DA C. et al. Compreender melhor o estado reacional tipo 1 para o diagnóstico e tratamento precoces: Uma forma de se evitar as incapacidades na hanseníase. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 5, p. 787–792, 2013.

NG, V.; ZANAZZI, G.; TIMPL, R.; TALTS, J. F.; SALZER, J. L.; BRENNAN, P. J.; RAMBUKANA, A. Role of the Cell Wall Phenolic Glycolipid-1 in the Peripheral Nerve Predilection of Mycobacterium leprae. **Cell**, v. 103, n. 3, p. 511–524, out. 2000.

OLIVEIRA, I. V. P. DE M.; DEPS, P. D.; ANTUNES, J. M. A. DE P. Armadillos and leprosy: From infection to biological model. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 2019.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE – OMS. **Diretrizes para o diagnóstico, tratamento e prevenção da hanseníase**. 2017. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/274127/9789290227076-por.pdf>.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE – OMS. **Estratégia Global de Hanseníase 2021–2030 – “Rumo à zero hanseníase”**. OMS: Índia, 2021. ISBN: 978-92-9022-842-4.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE – OMS. **Global leprosy (Hansen disease) update, 2021: moving towards interruption of transmission**. Weekly Epidemiological Record, OMS 2021. 08.09.2022. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/who-wer9736-429-450>.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE – OMS. **Leprosy/Hansen Disease: Management of reactions and prevention of disabilities Technical guidance**. 05.05.2020. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789290227595>.

PATIL, A.; MAYUR, S. S. Quality of life and mental health status of hansen disease patients, attending a designated leprosy care center in South-India. **International Journal of Mycobacteriology**, v. 10, n. 1, p. 31–36, 1 jan. 2021.

PEREIRA, G. F. MENDES. **Guia para o controle da Hanseníase**. [s.l.] Ministério da Saúde, Secretaria de Políticas de Saúde, Departamento de Atenção Básica, 2002.

RAMBUKKANA, A. Usage of signaling in neurodegeneration and regeneration of peripheral nerves by leprosy bacteria. **Progress in Neurobiology**, v. 91, n. 2, p. 102–107, jun. 2010.

REIS, E. M. et al. Mycobacterium leprae DNA in peripheral blood may indicate a bacilli migration route and high-risk for leprosy onset. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 5, p. 447–452, 2014.

SANTACROCE, L., DEL PRETE, R., CHARITOS, I. A., BOTTALICO, L. Mycobacterium leprae: A historical study on the origins of leprosy and its social stigma. **Infezioni in Medicina**, v. 29, n. 4, 10 dez. 2021.

SANTOS, A. R. et al. Use of PCR-mediated amplification of Mycobacterium leprae DNA in different types of clinical samples for the diagnosis of leprosy. **Journal of Medical Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 298–304, 1 out. 1993.

SARNO, E. N. et al. Leprosy exposure, infection and disease: a 25-year surveillance study of leprosy patient contacts. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 8, p. 1054–1059, dez. 2012.

SCALIA, Ana Claudia Negret. **Acurácia da reação em cadeia de polimerase em tempo real para o diagnóstico da hanseníase em diferentes fases do sangue periférico: um modelo diagnóstico e de disseminação do Mycobacterium leprae**. 2022. Dissertação (mestrado) — Universidade de Brasília, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Brasília, 2022.

SECRETARIA DE SAÚDE DO DISTRITO FEDERAL – SES. Subsecretaria de Vigilância à Saúde. Situação Epidemiológica da Hanseníase no Distrito Federal. **Informativo Epidemiológico (DF)**, ano 17, n. 1, maio de 2022.

SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE. Subsecretaria de Atenção Primária, Vigilância e Promoção da Saúde. Superintendência de Atenção Primária. **Hanseníase: manejo diagnóstico e terapêutico**. 1. ed. Rio de Janeiro: SMS, 2018. 48 p. (Série F. Comunicação e Educação em Saúde) (Coleção Guia de Referência Rápida, n. 15). ISBN: 978-85-86074-68-4.

SEVILHA-SANTOS, L.; CERQUEIRA, S. R. P. S.; GOMES, C. M. Standardization of SYBR Green-Based Real-Time PCR Through the Evaluation of Different Thresholds for Different Skin Layers: An Accuracy Study and Track of the Transmission Potential of Multibacillary and Paucibacillary Leprosy Patients. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 7 dez. 2021.

SHEPARD, C. C. **The experimental disease that follows the injection of human leprosy bacilli into foot-pads of mice**. Communicable Disease Center, Public Health Service, United States Department of Health, Education, and Welfare, Montgomery, Alabama. April 25, 1960. Disponível em: <http://rupress.org/jem/article-pdf/112/3/445/1267116/445.pdf>.

SINGH, G. Psychosocial aspects of Hansen's disease (leprosy). **Indian Dermatology Online Journal**, v. 3, n. 3, p. 166, 2012.

SINGH, P. et al. Insight into the evolution and origin of leprosy bacilli from the genome sequence of *Mycobacterium lepromatosis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 14, p. 4459–4464, 7 abr. 2015.

SINGH, P.; COLE, S. T. *Mycobacterium leprae*: Genes, pseudogenes and genetic diversity. **Future Microbiology**, jan. 2011.

TATIPALLY, S.; SRIKANTAM, A.; KASETTY, S. Polymerase chain reaction (PCR) as a potential point of care laboratory test for leprosy diagnosis - a systematic review. **Tropical Medicine and Infectious Disease MDPI AG**, 1 out. 2018.

TRUMAN, R. W. et al. Enumeration of *Mycobacterium leprae* using real-time PCR. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 11, 2008.

TRUMAN, R. W. et al. The armadillo as a model for peripheral neuropathy in leprosy. **ILAR Journal**, v. 54, n. 3, p. 304–314, abr. 2014.

TURANKAR, R. P. et al. Comparative evaluation of PCR amplification of RLEP, 16S rRNA, rpoT and Sod A gene targets for detection of *M. leprae* DNA from clinical and environmental samples. **International Journal of Mycobacteriology**, v. 4, n. 1, p. 54–59, 1 mar. 2015.

WEN, Y. et al. Whole-blood nested-PCR amplification of *M. leprae*-specific DNA for early diagnosis of leprosy. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n. 5, p. 918–922, maio 2013.

WHITE, C.; FRANCO-PAREDES, C. Leprosy in the 21st Century. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 1, p. 80–94, jan. 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **Leprosy/Hansen Disease: Management of reactions and prevention of disabilities. Technical guidance.** WHO: Índia, 2020. ISBN: 978-92-9022-759-5.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **Weekly epidemiological record: Relevé épidémiologique hebdomadaire.** Ano 96, n. 36, p.421–444, 10 September 2021. Disponível em: <http://www.who.int/wer>.