

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

LAÍS SEVILHA DOS SANTOS

**QUANTIFICAÇÃO DO DNA DE *Mycobacterium leprae* EM DIFERENTES
CAMADAS DA PELE: ESTUDO SOBRE ELIMINAÇÃO TRANSEPIDÉRMICA,
PROGRESSÃO PARA CURA E TRANSMISSÃO**

BRASÍLIA

2023

**QUANTIFICAÇÃO DO DNA DE *Mycobacterium leprae* EM DIFERENTES
CAMADAS DA PELE: ESTUDO SOBRE ELIMINAÇÃO TRANSEPIDÉRMICA,
PROGRESSÃO PARA CURA E TRANSMISSÃO**

LAÍS SEVILHA DOS SANTOS

Tese de Doutorado apresentada ao programa de pós-graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília para obtenção do título de doutor em Ciências Médicas, na área de concentração: Ciências Aplicadas em Saúde.

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

Coorientadora: Dra. Viviane Medeiros Silva.

BRASÍLIA

2023

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Sq Sevilha-Santos , Lais
QUANTIFICAÇÃO DO DNA DE Mycobacterium leprae EM
DIFERENTES CAMADAS DA PELE: ESTUDO SOBRE ELIMINAÇÃO
TRANSEPIDÉRMICA, PROGRESSÃO PARA CURA E TRANSMISSÃO / Lais
Sevilha-Santos ; orientador Ciro Martins Gomes; co
orientador Viviane Medeiros-Silva. -- Brasília, 2023.
72 p.

Tese(Doutorado em Ciências Médicas) -- Universidade de
Brasília, 2023.

1. Hanseníase. 2. Reação em cadeia da polimerase em tempo
real. 3. Transmissão . 4. Diagnóstico . I. Martins Gomes,
Ciro, orient. II. Medeiros-Silva, Viviane , co-orient. III.
Titulo.

**QUANTIFICAÇÃO DO DNA DE *Mycobacterium leprae* EM DIFERENTES
CAMADAS DA PELE: ESTUDO SOBRE ELIMINAÇÃO TRANSEPIDÉRMICA,
PROGRESSÃO PARA CURA E TRANSMISSÃO**

BANCA EXAMINADORA

Presidente

Professor Dr. Ciro Martins Gomes
Universidade de Brasília - UnB

Membros

Professor Dr. Amílcar Sabino Damazo
Universidade de Brasília - UnB

Professora Dra. Ana Carolina Tardin Martins
Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal - SES

Professor Dr. Daniel Holanda Barroso
Universidade de Brasília - UnB

Suplente

Professora Dra. Letícia Fernandes Barroso
Universidade Católica de Brasília - UCB

24 de fevereiro de 2023

DEDICATÓRIA

Aos pacientes de hanseníase do Hospital Universitário de Brasília – HUB.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por essa vida extraordinária, por todas as oportunidades que agarrei ao longo do caminho e por sempre segurar a minha mão. Sem Ele a minha vida não faria sentido e a minha caminhada seria muito solitária.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Ciro Martins Gomes, por toda a paciência no modo de ensinar, pelo cuidado com a minha formação profissional e pelo incentivo para que eu aproveitasse todas as oportunidades profissionais. Seu apreço pela pesquisa e pelos pacientes é inspirador e todos os seus ensinamentos foram essenciais para a minha vida profissional e pessoal.

Agradeço à minha coorientadora, Viviane Medeiros Silva, pela dedicação e pelo companheirismo em todos os momentos de dificuldade, por ter sempre se empenhado para que eu aprendesse a execução de todas as técnicas e caminhado comigo nessa jornada tão difícil. Tornamo-nos amigas ao longo desses anos e espero que essa amizade perdure por muitos outros anos.

Agradeço à Selma Regina Penha Silva Cerqueira por todo o empenho e ajuda com os dados de prontuários.

Agradeço à Profa. Dra. Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio por ter acreditado no meu potencial. Esse foi o ponto de partida para que essa tese tenha acontecido.

Aos residentes, *staffs* e enfermeiros do setor de Dermatologia do Hospital Universitário de Brasília – HUB, por dedicarem tempo para que as coletas fossem realizadas da melhor forma possível.

Aos pacientes que aceitaram ser incluídos na pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela bolsa fornecida para que eu conseguisse me dedicar exclusivamente ao desenvolvimento do projeto.

À Universidade de Brasília pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal. Aos funcionários da coordenação e secretaria do programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da UnB, que estão sempre dispostos a responder perguntas e solucionar problemas.

Ao meu pai Ézio Albino dos Santos. Eu não seria nada sem todo o tempo que investiu em meu futuro.

À minha mãe Maria de Fátima Sevilha da Silva. Espero ser capaz de retribuir um dia todo o seu afeto.

Ao meu marido, Marcos Vinícius Nery, pela paciência, dedicação, amor, cuidado e apoio durante todo o mestrado e doutorado. Sei que este ciclo se encerra, mas a nossa caminhada na vida apenas começou.

À minha irmã, Janaína Sevilha Lopes, por sempre estar presente quando eu precisei de apoio e por ser tão importante na minha caminhada.

Aos meus sogros, Sara Ferreira Amaro Nery e Celso Nery Junior, por serem pais maravilhosos, por terem me acolhido na família e pelo carinho.

A todos os membros da minha família que estão presentes em todos os momentos da minha vida e pelo incentivo fundamental para o meu crescimento.

Deus dá as batalhas mais difíceis aos seus melhores soldados.

Papa Francisco

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Pavilhão de terceira classe no Lazareto da Ilha Grande, instalado nas antigas fazendas do Holandês e de Dois Rios, situadas na enseada do Abraão no Rio de Janeiro.

Figura 2. Casos novos de hanseníase segundo sexo e faixa etária no Brasil entre os anos de 2016 e 2020.

Figura 3. Fotografia de microscopia do bacilo de *M. leprae*.

Figura 4. Divisão das camadas da pele.

Figura 5. Coleta nasofaringe.

Figura 6. Sequência *locus* 20ACBI4C_RLEP481 do *M. leprae*.

Figura 7. Curva padrão para a quantificação do *M. leprae*.

Figura 8. Curva padrão para a quantificação da beta globulina humana.

Figura 9. Prega do sítio de coleta e incisão para coleta da linfa.

Figura 10. Representação do material coleta na lâmina de microscopia.

Figura 11. Diagrama do fluxo de participantes dentro do estudo.

Figura 12. Representação do gráfico em floresta com os valores de sensibilidade e especificidade.

Figura 13. Ilustração da curva ROC.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sistema utilizado para a amplificação do alvo *M. leprae*.

Tabela 2. Ciclos utilizados para a amplificação do alvo *M. leprae*.

Tabela 3. Sistema utilizado para a amplificação do alvo beta globulina.

Tabela 4. Ciclos utilizados para a amplificação do alvo beta globulina.

Tabela 5. Características clínicas e populacionais dos grupos hanseníase e controle.

Tabela 6. Comparativo hanseníase recidiva e IBP.

Tabela 7. Comparativo de reações hansênicas apresentadas pelo grupo hanseníase.

Tabela 8. Quantificação absoluta e relativa das amostras.

Tabela 9. Análise dos valores de sensibilidade, especificidade e acurácia nos diferentes pontos de corte estabelecidos para a qPCR.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Esquemas farmacológicos para tratamento da infecção pelo *M. leprae* de acordo com a faixa etária, peso corporal e classificação operacional.

Quadro 2. Comparativo entre hanseníase recidiva e média de bacilos da quantificação relativa por tipo de amostra.

Quadro 3. Sensibilidade, especificidade e acurácia do teste de qPCR no primeiro ponto de corte.

Quadro 4. Sensibilidade, especificidade e acurácia do teste de qPCR no segundo ponto de corte.

Quadro 5. Sensibilidade, especificidade e acurácia do teste de qPCR no terceiro ponto de corte.

Quadro 6. Mediana e média do número de bacilos por camada.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Cq	Ciclo de quantificação (<i>Quantification cycle</i>)
DD	Dimorfo-dimorfo
DF	Distrito Federal
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DT	Dimorfo-tuberculóide
DV	Dimorfo-virchowiano
FM	Faculdade de medicina
GO	Goiás
HUB	Hospital Universitário de Brasília
IBP	Índice baciloscópico
IC	Intervalo de Confiança
kDNA	DNA do cinetoplasto
M	Massa molar
MB	Multibacilar
MG	Minas Gerais
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
OMS	Organização Mundial da Saúde
pb	Pares de bases
PB	Paucibacilar
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PGL-1	Glicolípido fenólico-1
PQT-U	Poliquimioterapia Única
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real
QUADAS	Avaliação da Qualidade de Estudos de Precisão Diagnóstica (<i>Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies</i>)
RLEP	Elemento Repetitivo
ROC	Característica de Operação do Receptor (<i>Receiver Operating Characteristic</i>)
SUS	Sistema Único de Saúde
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Tm	Temperatura <i>melting</i>
TT	Tuberculóide
UnB	Universidade de Brasília
VV	Virchowiano

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Histórico.....	19
1.2. Panorama dos casos atuais no Brasil.....	20
1.3. Agente Causador.....	21
1.4. Sinais e Sintomas.....	22
1.5. Formas clínicas.....	23
1.6. Transmissão.....	24
1.7. Diagnóstico.....	24
1.8. Exames complementares de apoio ao diagnóstico.....	25
1.8.1. Baciloscopia direta para bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR).....	25
1.8.2. Histopatologia.....	25
1.8.3. Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) para detecção de <i>M. leprae</i> em biópsia.....	26
1.8.4. Avaliação Neurológica Simplificada (ANS).....	26
1.9. Tratamento.....	27
2. JUSTIFICATIVA	28
3. OBJETIVOS	29
3.1. Objetivo geral.....	29
3.2. Objetivos específicos.....	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1. Local e período do estudo.....	30
4.2. Cálculo amostral.....	30
4.3. Comitê de ética.....	31
4.4. Recrutamento para a biópsia de pele.....	31
4.5. Critérios de inclusão.....	31
4.6. Critérios de exclusão.....	31
4.7. Definição de caso (Padrão de Referência Composto).....	32
4.8. Separação das camadas da pele.....	32
4.9. Coleta do <i>swab</i> nasal.....	33
4.10. Extração do DNA.....	33
4.11. Teste índice (teste desenvolvido e avaliado no estudo).....	34
4.11.1. Desenho do par de <i>primers</i> da qPCR para <i>M. leprae</i>	34
4.11.2. Curva padrão para o alvo do <i>M. leprae</i>	34

4.11.3. Critérios de positividade	36
4.12. Curva para beta globulina humana.....	36
4.13. Quantificação relativa camadas da pele e <i>swab</i> nasal	37
4.14. Exame de baciloscopia.....	37
4.15. Análise estatística.....	39
5. RESULTADOS	40
5.1. Características clínicas e populacionais	40
5.2. Grupo Hanseníase.....	42
5.3. Grupo controle	44
5.4. Sensibilidade, especificidade e acurácia do teste de qPCR para os três pontos de corte.....	44
6. DISCUSSÃO.....	51
7. CONCLUSÃO	55
7.1. Conclusão inicial.....	55
7.2. Quantificação do <i>M. leprae</i> na porção epidérmica, dérmica (superior e inferior), hipodérmica de lesões de hanseníase e em <i>swab</i> nasal.....	55
7.3. Avaliação dos diferentes limiares de detecção na porção epidérmica, dérmica (superior e inferior) e hipodérmica	55
7.4. Relação da quantificação com a avaliação dos contatos intradomiciliares	56
7.5. Avaliação da acurácia diagnóstica em amostras de pacientes paucibacilares	56
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
ANEXO 1.....	63
ANEXO 2.....	64
ANEXO 3.....	67
APÊNDICE 1.....	71

RESUMO

O progresso das técnicas moleculares foi primordial para o diagnóstico prévio da hanseníase. Porém, os atuais estudos na área ainda não conseguiram esclarecer o desempenho dessas técnicas na prática clínica. O presente projeto teve como objetivo principal testar na prática clínica a acurácia, sensibilidade e especificidade de um novo par de iniciadores desenvolvido para o alvo do elemento repetitivo (RLEP) do *Mycobacterium leprae*. Além disso, como objetivo secundário, buscou-se identificar o potencial de transmissão de pacientes com hanseníase multibacilar e paucibacilar. Desta forma, foi realizado um estudo de coorte transversal de acurácia diagnóstica com um total de cem pacientes com quadro clínico compatível com hanseníase. Nesse estudo, utilizou-se a Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) para quantificar o *M. leprae* nas diferentes camadas da pele e em *swab* nasal. As amostras de pele foram divididas em quatro camadas: epiderme, derme superior, derme inferior e hipoderme. Os resultados da quantificação do bacilo nas amostras de *swabs* nasais foram relacionados ao número de contatos intradomiciliares. Como critério de positividade para a reação da qPCR, foram estabelecidos três pontos de corte: 1 - qualquer DNA de bacilo quantificável, 2 - quantificação acima ou igual a 0,1 bacilo, 3 - quantificação acima ou igual a 1 bacilo. A validação da quantificação *in vitro* da reação resultou em um limite de quantificação de 0,03 bacilos. A melhor sensibilidade foi observada na derme superior de acordo com o primeiro ponto de corte estabelecido [sensibilidade = 59,26% (IC 95% = 45,97 – 71,32)]. Na epiderme, o terceiro ponto de corte resultou em 100% de especificidade (IC 95% = 92,29 - 100). A melhor acurácia foi encontrada na hipoderme no primeiro ponto de corte [acurácia = 68,09% (95% CI = 58,11 – 76,64)]. Para as amostras de *swab*, a melhor sensibilidade foi de 20,83% (95% CI = 11,73 – 34,26), e foi alcançada no primeiro ponto de corte. Nos três pontos de corte testados, foi obtida 100% de especificidade nas amostras de *swab*. O número de bacilos encontrados nos *swabs* nasais não teve relação significativa com o número de contatos domiciliares também diagnosticados com hanseníase. Pacientes paucibacilares testaram positivo apenas para fragmentos de bacilo em *swabs* nasais, mas não para o bacilo inteiro. Este fato demonstra que pacientes paucibacilares podem não ser uma fonte relevante de transmissão da doença. Concluiu-se que diferentes tipos de amostras de pele têm pouca influência

na acurácia do teste de qPCR. Porém, em contraste com esse resultado, diferentes pontos de corte podem influenciar na acurácia, sensibilidade e especificidade do teste de qPCR.

Palavras-chave: Hanseníase, *Mycobacterium leprae*, reação em cadeia da polimerase em tempo real, transmissão, diagnóstico.

ABSTRACT

The progress of molecular techniques was essential for the previous diagnosis of leprosy. However, current studies in the area have not been able to clarify the performance of these techniques in clinical practice yet. The main objective of this project was to test in clinical practice the accuracy, sensitivity and specificity of a new pair of primers developed for the repetitive element target (RLEP) of *Mycobacterium leprae*. Furthermore, as a secondary objective, was sought to identify the transmission potential of patients with multibacillary and paucibacillary leprosy. Thus, a cross-sectional cohort study of diagnostic accuracy was carried out with a total of one hundred patients with a clinical picture compatible with leprosy. In this study, real-time Polymerase Chain Reaction (qPCR) was used to quantify *M. leprae* in different layers of the skin and in nasal swabs. Skin samples were divided into four layers: epidermis, upper dermis, lower dermis and hypodermis. The results of quantification of the bacillus in nasal swab samples were related to the number of household contacts. As a positivity criterion for the qPCR reaction, three cutoff points were established: 1 - any quantifiable bacillus DNA, 2 - quantification greater than or equal to 0.1 bacillus, 3 - quantification greater than or equal to 1 bacillus. Validation of the in vitro quantification of the reaction resulted in a quantification limit of 0.03 bacilli. The best sensitivity was observed in the upper dermis according to the first established cut-off point [sensitivity = 59.26% (95% CI = 45.97 – 71.32)]. In the epidermis, the third cutoff point resulted in 100% specificity (95% CI = 92.29 - 100). The best accuracy was found in the hypodermis at the first cutoff point [accuracy = 68.09% (95% CI = 58.11 – 76.64)]. For swab samples, the best sensitivity was 20.83% (95% CI = 11.73 – 34.26) and was achieved at the first cutoff point. At the three tested cutoff points, 100% specificity was obtained in the swab samples. The number of bacilli found in nasal swabs was not significantly related to the number of household contacts also diagnosed with leprosy. Paucibacillary patients tested positive only for bacillus fragments in nasal swabs, but not for the entire bacillus. This fact demonstrates that paucibacillary patients may not be a relevant source of disease transmission. It was concluded that different types of skin samples have little influence on the accuracy of the qPCR test. However, in contrast to this result, different cutoff points may influence the accuracy, sensitivity and specificity of the qPCR test.

Keywords: Leprosy, *Mycobacterium leprae*, real-time polymerase chain reaction, transmission, diagnostics.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico

A hanseníase é uma doença infectocontagiosa, crônica, causada pelo bacilo álcool - ácido resistente, *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) ou *Mycobacterium lepromatosis* (*M. lepromatosis*). É classificada como uma das doenças infecciosas mais antigas que afetam os seres humanos, e que continua sendo, principalmente no Brasil, um grande problema de saúde pública (1,2).

A hanseníase já foi denominada por diferentes sinonímias nas mais diversas civilizações. Algumas dessas denominações são: *Morbus phenicius*, *Elephantiasis graecorum*, *Lepra arabum*, Jusdam, Mal de São Lázaro, Maalzen dos Alemães, Spedaskld da Scandinavia, Morféa, Fogo de Santo Antônio, Malrosse, Kakoba e Mal de Hansen (3).

Em 1873, o bacilo causador da hanseníase foi descrito pela primeira vez pelo médico norueguês Gerhard Armauer Hansen (4,5). Porém, muito antes da descrição do agente causador, ainda na antiguidade, já havia relatos em diversos textos de doenças com características muito parecidas com a da hanseníase (6). Um desses textos foi encontrado, no Egito, em um papiro da época do faraó Ramsés II (7).

A exatidão do local de sua aparição gera controvérsias até os dias de hoje. Alguns estudiosos acreditam que sua origem pode ter sido na África (8), outros autores acreditam que ela seja originária da Ásia (9). Acredita-se que sua chegada no continente americano ocorreu através da vinda dos colonizadores entre os séculos XVI e XVII (10).

No Brasil, a hanseníase chegou por vários pontos do litoral com a vinda dos colonizadores portugueses. Os escravos africanos e os povos europeus contribuíram para a sua disseminação pelo território (11,12). O primeiro caso da doença foi notificado no Brasil em 1600, na cidade do Rio de Janeiro, local onde foi criado o primeiro lazareto que era destinado a abrigar pessoas diagnosticadas com hanseníase (10) (Figura 1).

Em 2008, Xiang Y Han e seus colaboradores descreveram pela primeira vez *M. lepromatosis* como um agente causador da hanseníase. O bacilo foi isolado de dois

pacientes que morrerem de hanseníase lepromatosa difusa. Essa espécie pode ser responsável por parte da variabilidade clínica e geográfica da hanseníase (13,14).



Figura 1. Pavilhão de terceira classe no Lazareto da Ilha Grande, instalado nas antigas fazendas do Holandês e de Dois Rios, situadas na enseada do Abraão no Rio de Janeiro.

Fonte: Santos, 2007 (15).

1.2. Panorama dos casos atuais no Brasil

De acordo com o último boletim epidemiológico publicado em 2022 pela Secretaria de Vigilância em Saúde, o Brasil ocupa o segundo lugar entre os países com mais casos. A Organização Mundial da Saúde (OMS) relatou que foram registrados 127.396 casos novos em 2020 em todo o mundo. A região das américas é responsável por 19.195 (15,1%) dos casos, os quais 17.979 (93,6%) foram notificados no Brasil. O Brasil, a Índia e a Indonésia notificaram mais de 10.000 casos novos, o que corresponde a 74% dos casos que foram notificados no ano de 2020 (16,17).

No Brasil, entre os anos de 2016 e 2020, foram diagnosticados 155.359 casos novos de hanseníase. Nesses anos ocorreu uma predominância de casos no sexo masculino, que totalizou 86.225 (55,5%) das ocorrências (Figura 2). Essa

predominância foi identificada em todas as faixas etárias com uma variação de aproximadamente 20% após a faixa etária dos 60 anos (17).

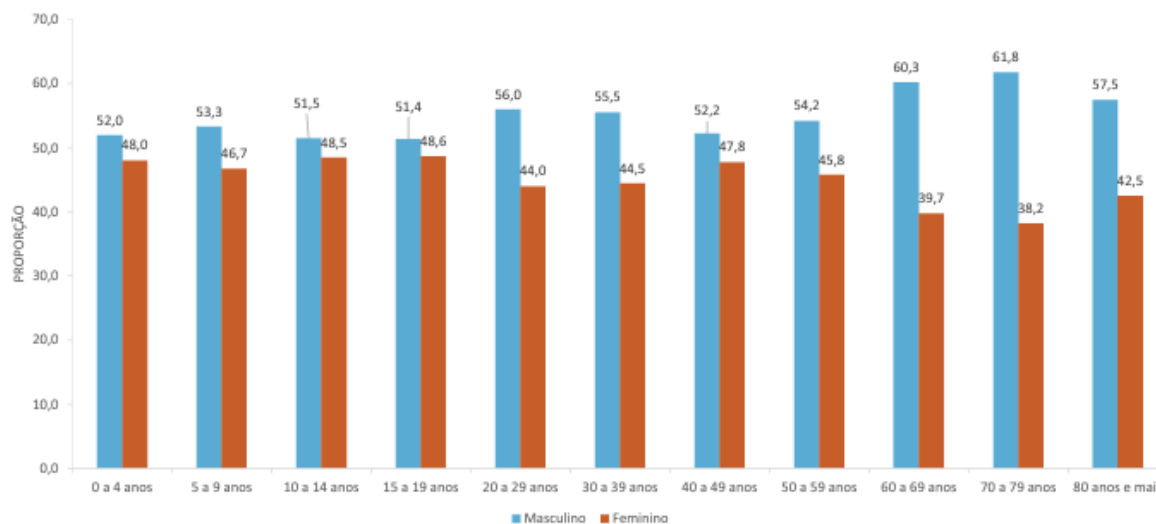


Figura 2. Casos novos de hanseníase segundo sexo e faixa etária no Brasil entre os anos de 2016 e 2020.

Fonte: Sinan/SVS/MS.

1.3. Agente Causador

O *M. leprae* pertence à classe dos *Actinobacteria*, ordem *Actinomycetales*, família *Mycobacteriaceae* e gênero *Mycobacterium*. É um bacilo gram positivo, não cultivável, aeróbico e corado pelo método de coloração Ziehl-Neelsen (3). Além disso, é um patógeno intracelular obrigatório que apresenta alta infectividade e baixa patogenicidade. Sua divisão ocorre de forma binária e lenta (Figura 3).

O bacilo tem tropismo por células cutâneas e pelos nervos periféricos, mais especificamente pelas células de *Schwann* encontradas no axônio. Isso ocorre devido ao glicolípido fenólico-1 (PGL-1), que está presente externamente na bactéria e se liga especificamente a laminina-2 das unidades do axônio (18,19). Essa característica lhe dá um potencial para causar grandes incapacidades físicas (1).

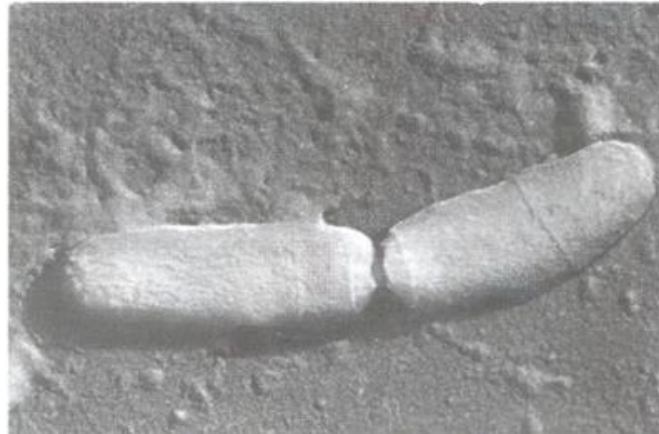


Figura 3. Fotografia de microscopia do bacilo de *M. leprae*.

Fonte: Macieira, 2000 (20).

1.4. Sinais e Sintomas

O Ministério da Saúde descreve em seu Guia Prático sobre hanseníase os seguintes sinais e sintomas:

1. Regiões da pele com manchas esbranquiçadas (hipocromia), acastanhadas ou avermelhadas, com alterações de sensibilidade;
2. Formigamentos, choques e câimbras nos braços e pernas, que evoluem para dormência;
3. Nódulos, pápulas e tubérculos (normalmente indolores);
4. Redução ou queda da quantidade de pelos, localizada ou difusa, especialmente nas sobrancelhas (madarose);
5. Infiltrado na pele (avermelhada), com diminuição ou ausência de suor no local;
6. Espessamento de nervos periféricos;
7. Redução ou perda de sensibilidade nas áreas dos nervos afetados, principalmente nas regiões dos olhos, mãos e pés;
8. Redução ou perda de força nos músculos inervados pelos nervos afetados;
9. Edema (inchaço) de mãos e pés com cianose (arroxeamento dos dedos) e ressecamento da pele;
10. Febre e artralgia (dor nas articulações), associados a caroços dolorosos;
11. Ressecamento do nariz e dos olhos (1).

1.5. Formas clínicas

A forma clínica desenvolvida pelo hospedeiro depende de sua resposta imune ao bacilo. As classificações mais utilizadas são a operacional (OMS), a de Madri (1953) e a de Ridley e Jopling (1966) (1,21,22).

A classificação operacional, definida pela OMS, é utilizada para estabelecer o tratamento da hanseníase e é dividida em paucibacilar (PB) e multibacilar (MB). A hanseníase PB é caracterizada pelos casos que apresentam de uma a cinco lesões cutâneas e baciloscopia negativa, já a hanseníase MB compreende o grupo de casos que apresentam mais de cinco lesões cutâneas ou que apresentam algum comprometimento dos nervos e resultado de baciloscopia positiva (23).

A classificação de Madri aborda os aspectos clínicos, bacteriológicos, imunológicos e histológicos da hanseníase, separando a hanseníase nas seguintes formas (1):

1. Indeterminada;
2. Tuberculóide;
3. Dimorfa;
4. Virchowiana.

A classificação de Ridley e Jopling (1966) leva em consideração a imunidade dentro de um espectro de resistência do hospedeiro e utiliza o exame histopatológico para auxiliar na classificação. Os casos de hanseníase são divididos da seguinte forma (22):

1. Tuberculóide (TT);
2. Dimorfo-tuberculóide (DT);
3. Dimorfo-dimorfo (DD);
4. Dimorfo-virchowiano (DV);
5. Virchowiano (VV).

A forma tuberculóide é caracterizada por apresentar uma lesão de pele ou um nervo comprometido, baciloscopia negativa e alta resistência imunológica à bactéria. A forma dimorfo-tuberculóide apresenta características tuberculóides e a dimorfo-virchowiano manifesta características virchowianas. A forma dimorfo-dimorfo é definida pela presença de lesões anulares assimétricas com perfurações típicas e comprometimento médio de sensibilidade. E por último a forma virchowiana, que se

caracteriza pela manifestação de nódulos e placas, com comprometimento simétrico de nervos, com baciloscopia positiva e sem de resistência imunológica (24).

1.6. Transmissão

Pessoas infectadas pela doença e não tratadas são consideradas a principal fonte de transmissão, que ocorre por meio das vias respiratórias. Desse modo, o contato prolongado de pessoas suscetíveis à infecção com pessoas que ainda não estão em tratamento é considerado a principal fonte descrita de transmissão (1).

Apesar do contato domiciliar com pessoas infectadas ser a principal forma de contágio, em algumas regiões o número de infectados é muito baixo e pode não representar a fonte de infecção mais importante. Em alguns casos não é possível estabelecer um histórico de contato prévio com pacientes infectados pelo bacilo, o que evidencia a teoria de que outras formas de transmissão podem ocorrer (25).

Okada e seus colaboradores (1978) demonstraram a presença do *M. leprae* na epiderme da pele de pessoas infectadas pelo bacilo (26). Um estudo realizado sugeriu que os bacilos poderiam ser transferidos para as camadas epidérmicas através da atividade fagocitária de células basais e eliminados pela pele intacta (26). Em 1997, Namisato e seus colaboradores atribuíram a eliminação transepidérmica do *M. leprae* ao crescimento rápido de densos granulomas na derme superior (27).

A presença do bacilo em todas as camadas da epiderme pode indicar que o *M. leprae* é absorvido pelas células basais da derme superior, que por sua vez pode mover-se para o interior das células epidérmicas e ser eliminado do estrato córneo para o ambiente (28). A saída transepidérmica do *M. leprae* apresentada por vários estudos indica que possivelmente a pele poderia ser uma porta de saída e entrada para o bacilo (28).

1.7. Diagnóstico

Ainda hoje não existe um exame laboratorial que seja capaz de diagnosticar e classificar todas as formas da doença, o que torna o diagnóstico essencialmente clínico. Exames como a baciloscopia e a biópsia de pele são considerados como exames subsidiários e sozinhos não são suficientes para fechar diagnóstico (1,29).

De acordo com o Ministério da Saúde do Brasil, o diagnóstico deve ser baseado na presença de um ou mais dos seguintes parâmetros (30):

1. Lesão ou lesões e/ou áreas da pele com alteração de sensibilidade térmica e/ou dolorosa e/ou tátil;
2. Espessamento de nervo periférico, associado a alterações sensitivas e/ou motoras e/ou autonômicas;
3. Presença do *M. leprae*, confirmada na baciloscopia de esfregaço intradérmico ou na biópsia de pele.

1.8. Exames complementares de apoio ao diagnóstico

1.8.1. Baciloscopia direta para bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR)

O BAAR é um exame laboratorial utilizado para pesquisar a presença do *M. leprae* em esfregaços de raspado intradérmico para estimar a carga bacilar (31). É indicado nos casos em que há necessidade de realizar o diagnóstico diferencial com outras doenças dermatológicas ou neurológicas, quando há dúvida no diagnóstico e para definir a classificação operacional (31).

O raspado é obtido através de uma pequena incisão em sítios padronizados (cotovelos e lobos auriculares) e em lesões de pele. O raspado é corado pela técnica de Ziehl-Neelsen e a quantidade de bacilos no esfregaço é calculada de acordo com a escala logarítmica de Ridley, através do índice baciloscópico (IB), que varia de 0 a 6+. A média do IB dos esfregaços auxilia na estimativa da carga bacilar (32).

1.8.2. Histopatologia

O exame histopatológico é indicado nos casos em que o diagnóstico permanece indeterminado mesmo depois da avaliação clínica e do exame de BAAR. Pode ser utilizado também no diagnóstico diferencial com outras doenças e em casos de comprometimento neural sem lesões cutâneas, casos em que o fragmento é obtido de tecido nervoso. As amostras de pele obtidas de biópsias cutâneas são preferencialmente coletadas nas bordas de lesões mais recentes e ativas. O

fragmento coletado deve incluir toda a espessura da derme e pelo menos uma porção da hipoderme (33).

1.8.3.Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) para detecção de *M. leprae* em biópsia

A qPCR é uma técnica de biologia molecular que permite a detecção e quantificação do DNA de diferentes patógenos em diversas amostras biológicas (34). Por permitir a identificação de um fragmento específico de DNA, a qPCR passou a ser utilizada no diagnóstico de diferentes doenças infecciosas e parasitárias, o que marca um grande avanço tecnológico no diagnóstico dessas doenças (35,36).

A técnica da qPCR fundamenta-se na aplicação de sondas ou corantes fluorescentes que possibilitam a visualização em tempo real da amplificação de sequências específicas do DNA (37). O termociclador é o equipamento encarregado de realizar a captura da emissão da fluorescência e transportar esses dados para um *software* que realiza a leitura da reação (34).

O Ministério da Saúde, por meio da Portaria SCTIE/MS nº 78, de 31 de dezembro de 2021, incorporou ao Sistema Único de Saúde (SUS), o teste de qPCR para a identificação qualitativa de alvos específicos do *M. leprae*, o que contribui no diagnóstico de hanseníase. A qPCR será realizada no nível da atenção especializada, na avaliação de contatos, e é indicada para amostras de biópsia de pele ou de nervos (38,39) (Anexo 1).

1.8.4.Avaliação Neurológica Simplificada (ANS)

A ANS é um exame de caráter obrigatório que verifica se há alterações autonômicas, comprometimento da sensibilidade ou diminuição da força muscular como resultado do dano neural. Esse exame tem por objetivo monitorar a função neural do paciente acometido pela hanseníase. Por meio da ANS é possível detectar o grau de incapacidade física apresentado. A avaliação é realizada no diagnóstico, a cada três meses e ao final do tratamento. Além disso, a ANS deve ser repetida sempre que o paciente apresentar novas queixas e nos casos de reações hansênicas (40).

1.9. Tratamento

Conforme definição do Ministério da Saúde (2021), o tratamento deve ser realizado através da utilização da Poliquimioterapia Única (PQT-U), que se constitui na associação da rifampicina, dapsona e clofazimina, independente da classificação operacional (Quadro 1).

Quadro 1. Esquemas farmacológicos para tratamento da infecção pelo *M. leprae* de acordo com a faixa etária, peso corporal e classificação operacional.

Faixa etária e peso corporal	Apresentação	Posologia	Duração do tratamento	
			MB	PB
Pacientes com peso acima de 50 Kg	PQT-U Adulto	DOSE MENSAL (supervisionada) Rifampicina 600 mg Clofazimina 300 mg Dapsona 100 mg	12 meses	6 meses
		DOSE DIÁRIA (autoadministrada) Clofazimina 50 mg diariamente Dapsona 100 mg diariamente		
Crianças ou adultos com peso entre 30 e 50 Kg	PQT-U Infantil	DOSE MENSAL (supervisionada) Rifampicina 450 mg Clofazimina 150 mg Dapsona 50 mg	12 meses	6 meses
		DOSE DIÁRIA (autoadministrada) Clofazimina 50 mg em dias alternados Dapsona 50 mg diariamente		
Crianças com peso abaixo de 30 Kg	Adaptação da PQT-U Infantil	DOSE MENSAL (supervisionada) Rifampicina 10 mg/Kg de peso Clofazimina 6 mg/Kg de peso Dapsona 2 mg/Kg de peso	12 meses	6 meses
		DOSE DIÁRIA (autoadministrada) Clofazimina 1 mg/Kg de peso/dia Dapsona 2 mg/Kg de peso/dia		

Fonte: Adaptado do Guideline for the diagnosis, treatment and prevention of leprosy (WHO, 2018).

2. JUSTIFICATIVA

Apesar da transmissão da hanseníase ocorrer pelas vias respiratórias, em alguns casos não é possível identificar o foco principal de transmissão da doença. Isto dificulta o início do tratamento e a quebra da cadeia de transmissão (40). O longo período de incubação e a dificuldade de identificar o bacilo no estágio inicial da doença justificam a padronização das técnicas de biologia molecular que agregam uma melhor acurácia, sensibilidade e especificidade como alternativa para identificar possíveis focos de infecção e evitar a propagação da doença pela comunidade.

O diagnóstico da hanseníase é baseado em testes clínicos e laboratoriais em doentes já no estágio crônico da doença, onde já ocorre o acometimento motor. Em pacientes no estágio inicial, onde há baixa carga bacilar, o diagnóstico é basicamente clínico, o que contribui para o desenvolvimento da hanseníase para o estágio mais crônico e dificulta o controle da transmissão. As técnicas moleculares podem ser uma boa alternativa para os casos de difícil diagnóstico (casos com: baciloscopia negativa e histopatológico inconclusivo), e para ajudar no controle da transmissão (40). Destarte, faz-se necessário a padronização de novas metodologias laboratoriais para auxiliarem no diagnóstico mais precoce da hanseníase.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O presente projeto tem como objetivo principal testar na prática clínica a acurácia, sensibilidade e especificidade de um novo par de iniciadores desenvolvido para o alvo do elemento repetitivo (RLEP) do *Mycobacterium leprae*.

3.2. Objetivos específicos

- A. Quantificar o *M. leprae* na porção epidérmica, dérmica (superior e inferior), hipodérmica de lesões de hanseníase e em *swab* nasal;
- B. Avaliar diferentes limiares de detecção na porção epidérmica, dérmica (superior e inferior) e hipodérmica;
- C. Relacionar a quantificação com a avaliação dos contatos intradomiciliares;
- D. Avaliar a acurácia diagnóstica em amostras de pacientes paucibacilares.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Local e período do estudo

O presente projeto está em conformidade com as ferramentas STARD 2015 e QUADAS-2 (Anexo 2) (41,42). O primeiro contém uma lista atualizada de itens essenciais para estudos de precisão diagnóstica e o segundo contém métodos para melhor validação dos resultados. Os pacientes foram recrutados no ambulatório de hanseníase do Hospital Universitário de Brasília - HUB de agosto de 2018 a agosto de 2020 (42). O HUB é um centro terciário de referência responsável pelo diagnóstico diferencial da hanseníase em pacientes encaminhados de instituições de atenção primária e secundária.

4.2. Cálculo amostral

O cálculo amostral baseou-se em diversos parâmetros. Primeiramente, foram considerados valores de sensibilidade de 78,5% (IC 95% 61,9 – 89,2) e de especificidade 89,3% (CI 95% 61,4 – 97,8) da qPCR de acordo com revisão sistemática da literatura (43). Como tratou-se de um estudo de coorte transversal e com cegamento das análises, considerou-se uma sensibilidade e especificidade iniciais de 60% (H0) compatíveis com o limite inferior de ambos os intervalos de confiança. A prevalência de pacientes diagnosticados com hanseníase no serviço de dermatologia do HUB com as características daqueles que perfazem os critérios de inclusão deste estudo, segundo dados internos, é em torno de 50%.

Considerou-se arbitrariamente uma melhora de 20% da sensibilidade e especificidade do teste índice considerando todas as alterações previstas neste estudo (melhor camada da pele para avaliação) e melhor ponto de corte para a qPCR (H1). Considerando um valor de 0,80 e um p-valor < 0,05, chegou-se ao cálculo amostral mínimo de 45 pacientes por grupo (casos de hanseníase e controles), totalizando 90 pacientes. Um acréscimo de cerca de 10% neste cálculo foi considerado para suprir efeitos deletérios das perdas e uma possível inclusão não suficiente de um dos grupos fora do previsto pelo cegamento da amostra.

4.3. Comitê de ética

O presente projeto foi aprovado no comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Medicina na UNB sobre o número de CAAE 93279318.9.0000.5558 (Anexo 3).

4.4. Recrutamento para a biópsia de pele

O recrutamento sempre foi realizado pelo mesmo dermatologista credenciado, sendo os exames laboratoriais realizados no Laboratório de Dermatologia da UnB por um biomédico especializado. Ambos os especialistas estavam cegos para o diagnóstico dos pacientes até o final do período de avaliação laboratorial.

4.5. Critérios de inclusão

Foram incluídas amostras de pacientes em duas situações:

1. Paciente recebeu indicação para realizar a biópsia como parte do diagnóstico diferencial da hanseníase. Neste caso, foi solicitada autorização apenas para processamento da amostra de pele coletada nos objetivos desta pesquisa (separar as camadas da pele e avaliar a quantidade de bacilos).
2. No segundo caso, o paciente já foi diagnosticado com hanseníase, não necessitava de biópsia de pele para o tratamento, mas consentiu voluntariamente em participar do projeto de pesquisa.

4.6. Critérios de exclusão

Foram excluídas amostras de pacientes que apresentaram alguma das características descritas abaixo:

1. Menores de 18 anos;
2. Pacientes que não assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Apêndice 1);
3. Pertencentes a comunidades indígenas.

4.7. Definição de caso (Padrão de Referência Composto)

Todos os pacientes incluídos foram submetidos ao mesmo conjunto de exames e, posteriormente, alocados para o grupo hanseníase ou controle.

Os pacientes foram alocados no grupo hanseníase quando apresentavam os critérios definidos pela OMS para a definição como um caso de hanseníase. Já o grupo controle, foi composto de pacientes com outras doenças de pele, que podem ser confundidas com hanseníase por unidades de saúde primárias e secundárias.

O teste índice não foi utilizado como critério para a alocação dos pacientes nos grupos para que fosse evitado viés nos resultados de acurácia, sensibilidade e especificidade.

4.8. Separação das camadas da pele

O fragmento de pele coletado foi dividido, de forma transversal, em quatro partes assim denominadas: epiderme, derme superior, derme inferior e hipoderme (44,45).

A separação da epiderme da derme superior foi realizada pela técnica de *salt-split skin* que consiste em incubar a pele normal humana em solução de cloreto de sódio a 1,0M (NaCl 1,0M) de 72 a 120 horas a -4°C . A divisão das demais camadas foi feita de forma visual como auxílio do bisturi (Figura 4) (44,45).

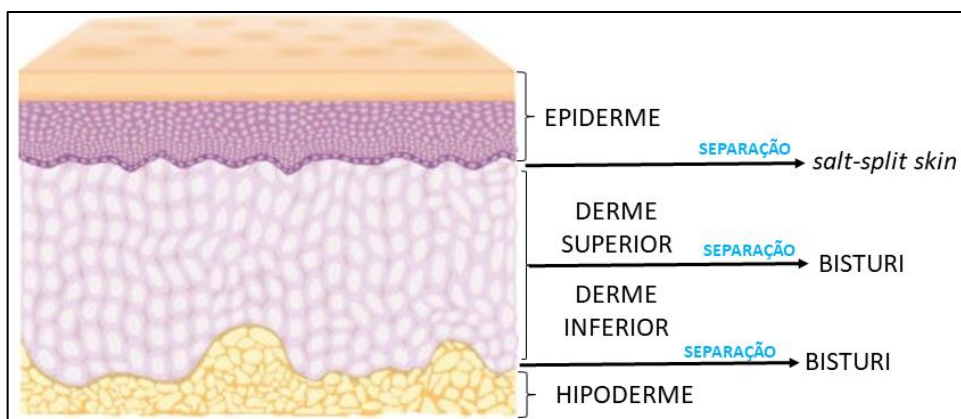


Figura 4. Divisão das camadas da pele.

4.9. Coleta do *swab* nasal

O *swab* foi inserido na narina até atingir o fundo da coana nasal. Depois de inserir eram realizados movimentos circulares para coletar as células da mucosa (Figura 5). O mesmo procedimento foi realizado em ambas as cavidades nasais. Após a coleta o *swab* foi transferido para um *eppendorf* de 1,5mL e a haste quebrada para melhor acondicionar o material.

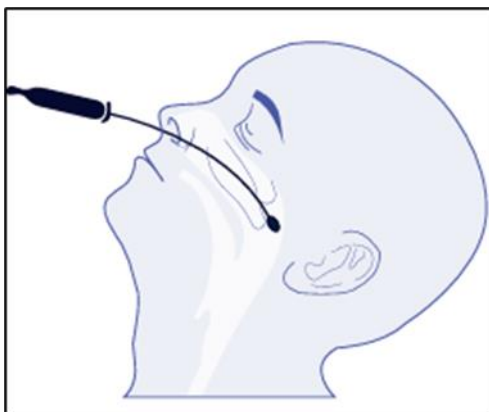


Figura 5. Coleta nasofaringe.

Fonte: <https://www.dbmolecular.com.br/uploads/materiais/2021/07/dbmol-flyer-instrucao-h1n1-prespe.pdf>

4.10. Extração do DNA

A extração do DNA das amostras de pele e *swab* foram realizadas pelo Kit comercial *PureLink Genomic DNA Mini Kit* (Invitrogen, *Thermo Fisher Scientific*, Waltham, Massachusetts, EUA). Após as extrações as amostras foram acondicionadas a -80°C no laboratório de Dermatocologia da Faculdade de Medicina da UnB até a realização das demais fases do projeto.

4.11. Teste índice (teste desenvolvido e avaliado no estudo)

4.11.1. Desenho do par de *primers* da qPCR para *M. leprae*.

O par de *primers* foi construído para a região específica de repetições dispersas (RLEP) do *M. leprae*. Os iniciadores foram projetados com a ferramenta *Primer designing tool* (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland, USA), com as seguintes sequências: 5' - CTTGCACCATTCTGCCGCT - 3' e 5' - TGCGCTAGAAGGTTGCCGTA - 3', o que resultou em um fragmento de 156bp.

As reações foram realizadas no termociclador *QuantStudio 1* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), utilizando 1x *PowerUp SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), com um volume final de 15µL, seguindo as especificações das tabelas 1 e 2. A curva *melting* foi processada em incrementos de 0,3°C de 55°C a 95°C.

Tabela 1. Sistema utilizado para a amplificação do alvo *M. leprae*.

	CONCENTRAÇÃO	VOLUME (µL)
SYBR	1X	7,5
primer-R	10µM	0,45
primer-F	10µM	0,45
H₂O	--	4,6
DNA	20 - 30ng	3
VOLUME FINAL	--	15

Tabela 2. Ciclos utilizados para a amplificação do alvo *M. leprae*.

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

4.11.2. Curva padrão para o alvo do *M. leprae*

O gene escolhido na clonagem do alvo utilizado para a confecção da curva de quantificação foi o RLEP, encontrado no *locus* 20ACBI4C_RLEP481, que resultou em

um fragmento de 481pb (Figura 6). A clonagem foi realizada pelo serviço da *Thermo Fisher Scientific GENEART* (Regensburg, Germany).

```

ORIGIN
  1  GCTTCGTGTG  CTTTGCCGCA  GTGGACACGA  TTAGCGCGGC  GCACGTAAGC  ATGTCGGTGG
 61  TGGATGCTGC  TTGGTCTACA  TGTTGATGAT  GCCAGGGGCT  GGGCACCTGG  GCTGTGCTGA
121  AGGCGATATC  GATGCAGGCG  TGAGTGTGAG  GATAGTTGTT  AGCGCCGCGG  GGTAGGGGCG
181  TTTTAGTGTG  CATGTCATGG  CCTTGAGGTG  TCGGCGTGGT  CAATGTGGCC  GCACCTGAAC
241  AGGCACGTCC  CCGTGCACGG  TATAACTATT  CGCACCTGAT  GTTATCCCTT  GCACCATTTT
301  TGCCGCTGGT  ATCGGTGTCG  GCGGCTTGTT  GACCGGCCCT  CAGCCAGCAA  GCAGGCATGC
361  CGCCGGGTGC  AGCAGTATCG  TGTTAGTGAA  CAGTGCATCG  ATGATCCGGC  CGTCGGCGGC
421  ACATACGGCA  ACCTTCTAGC  GCAGATCAAC  CACCCACACC  CCACCAGCCC  ACCACAACAC
481  C
//

```

Figura 6. Sequência *locus* 20ACBI4C_RLEP481 do *M. leprae*.

O número de cópias da solução estoque resultado da clonagem do *locus* 20ACBI4C_RLEP481 foi igual a $9,63 \times 10^{12}$ bacilos. Assumindo que 37 cópias do gene RLEP é igual a um bacilo, o cálculo do número de bacilos foi realizado da seguinte forma: $\frac{9,63 \times 10^{12}}{37}$, logo a solução estoque possui 260.270.270.270 bilhões de bacilos.

A curva padrão foi construída com oito pontos triplicados com diluições seriadas de 1:10 de $7,8 \times 10^7$ a 7,8 bacilos (Figura 7). As propriedades da curva não mudaram quando o controle positivo foi diluído com DNA genômico humano. O limite de quantificação e detecção foi fixado em 0,03 bacilos, considerando a quantidade mínima possivelmente detectável pelo método.

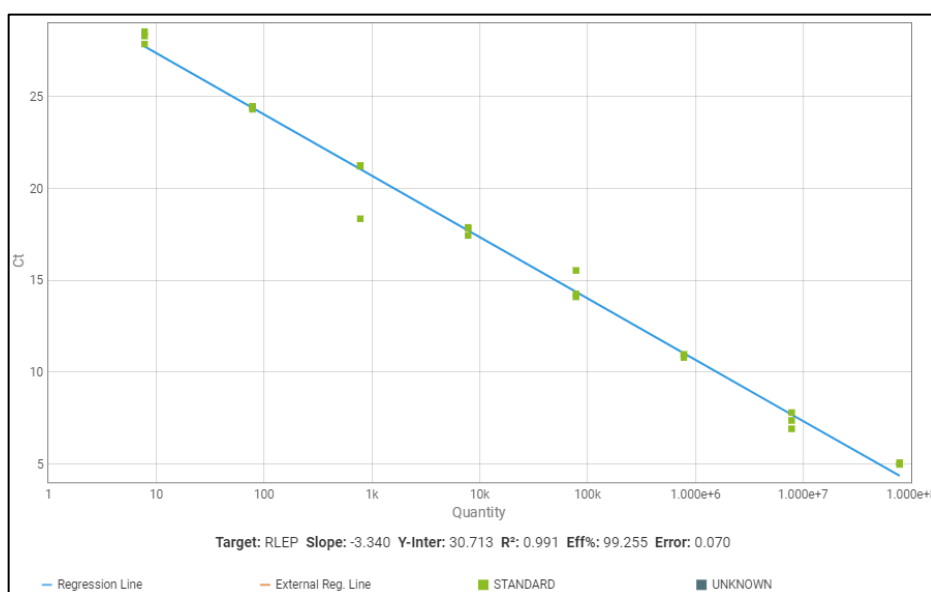


Figura 7. Curva padrão para a quantificação do *M. leprae*.

4.11.3. Critérios de positividade

Através da curva padrão realizada foram estabelecidos três pontos de corte para as amostras serem consideradas positivas:

1. Qualquer DNA de bacilo quantificável;
2. Quantificação acima ou igual a 0,1 bacilo;
3. Quantificação acima ou igual a 1 bacilo.

4.12. Curva para beta globulina humana

O conjunto de iniciadores escolhido foi: BGF 5' - GGCAGGTTGGTATCAAGGTTAC - 3' e BGR 5' - CCTAAGGGTGGGAAATAGACC - 3', que são específicos para beta globulina humana. Esse alvo endógeno apresentou um melhor desempenho quando medido pela eficiência da curva padrão do que outros alvos testados nesse processo de validação.

A curva padrão foi construída através de uma diluição seriada 1:10, que continha 20mg do equivalente de DNA de tecido da pele por reação (Figura 8).

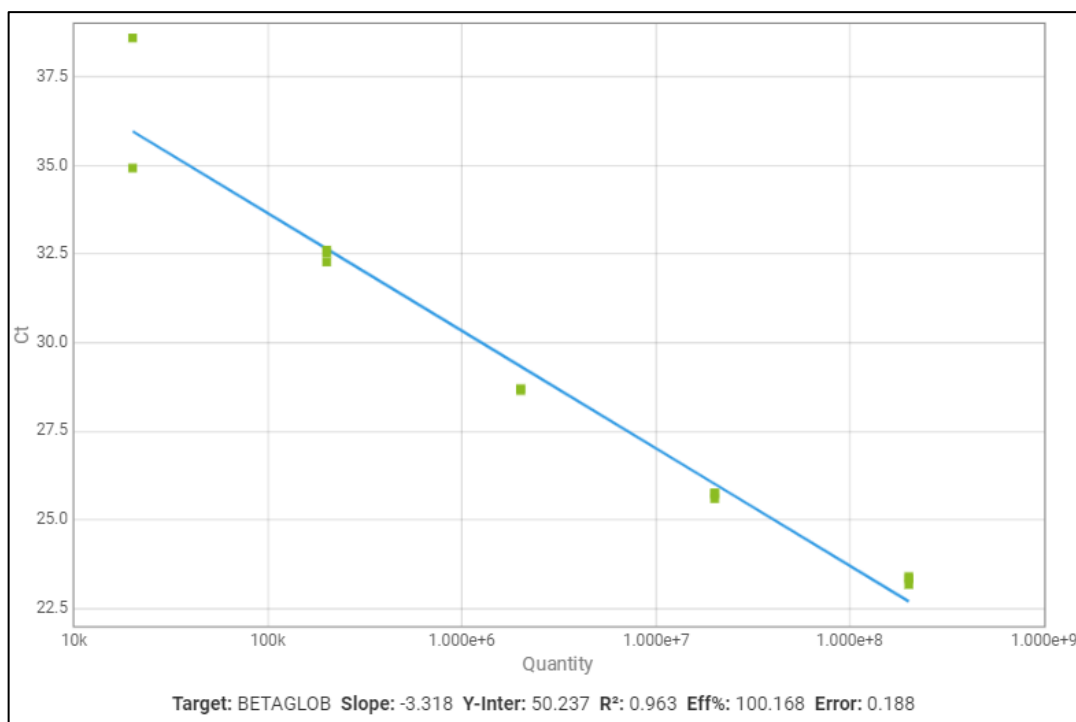


Figura 8. Curva padrão para a quantificação da beta globulina humana.

As reações foram realizadas no termociclador QuantStudio 1 (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA), e foi utilizado o *PowerUp SYBR Green Master Mix 1x* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA), com um volume final de 15µL (Tabelas 3, 4). A curva *melting* foi processada em incrementos de 1,6°C de 60°C a 95°C.

Tabela 3. Sistema utilizado para a amplificação do alvo beta globulina.

	CONCENTRAÇÃO	VOLUME (µL)
SYBR	1X	7,5
primer-R	10µM	0,45
primer-F	10µM	0,45
H₂O	--	1,6
DNA	--	5
VOLUME FINAL	--	15

Tabela 4. Ciclos utilizados para a amplificação do alvo beta globulina.

ETAPA	TEMPERATURA	TEMPO	CICLOS
UDG ativação	50 °C	2min	1x
Ativação enzima	95 °C	2min	1x
Desnaturação	95 °C	15s	45x
Anelamento	57°C	15s	45x
Extensão	72°C	1min	45x

4.13. Quantificação relativa camadas da pele e swab nasal

A quantificação relativa das camadas da pele foi realizada pelo seguinte cálculo (46):

$$\text{Quantificação relativa} = \frac{\text{Quantificação } M. leprae}{\text{Quantificação Beta globulina}}$$

4.14. Exame de baciloscopia

Para os pacientes que apresentaram lesões cutâneas visíveis ou áreas com alteração de sensibilidade a coleta foi realizada nos seguintes sítios: lóbulo auricular direito, lóbulo auricular esquerdo, cotovelo direito e lesão. Em pacientes que não

apresentavam lesões ativas visíveis a coleta foi realizada nos seguintes sítios: lóbulo auricular direito, lóbulo auricular esquerdo, cotovelo direito e cotovelo esquerdo (32).

O sítio de coleta foi pressionado com uma pinça Kelly (formando uma prega) para obter uma isquemia no local e evitar sangramentos durante o exame (Figura 9). Após a realização da prega um corte com o bisturi foi realizado na região da prega (de aproximadamente 5mm de extensão por 3mm de profundidade). A lâmina de bisturi foi utilizada do lado não cortante para raspar quantidade suficiente e visível de linfa na região onde foi realizado o corte. Este material raspado foi transferido para uma lâmina de microscopia (Figura 10) (32).

As lâminas contendo os raspados intradérmicos ficaram em temperatura ambiente até estarem completamente secas. Após essa etapa os esfregaços foram fixados passando as lâminas de duas a três vezes, rapidamente, na chama de uma lamparina ou bico de Bunsen, com os esfregaços voltados para cima. Após a fixação, o esfregaço foi corado pelo método de Ziehl-Neelsen a frio (32).



Figura 9. Prega do sítio de coleta e incisão para coleta da linfa.

Fonte: Normas técnicas e procedimentos para o Exame Bacilosκόpio em Hanseníase – MS (1989).





	LD	LE	CD	CE
Ponta fosca				
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a

Figura 10. Representação do material coleta na lâmina de microscopia.

Legenda: LD = lóbulo auricular direito; LE = lóbulo auricular esquerdo; CD = cotovelo direito; CE = cotovelo esquerdo.

Fonte: Guia de procedimentos técnicos: baciloscopia em hanseníase. Editora do Ministério da Saúde, 2010.

4.15. Análise estatística

O teste do qui-quadrado de Pearson foi utilizado para realizar a comparação das variáveis categóricas. O teste de Shapiro-Wilk foi empregado para verificar a normalidade das amostras. O teste t de Student foi utilizado para relacionar os dados das amostras dependentes. O coeficiente de correlação de Pearson foi usado para medir a relação estatística entre as variáveis contínuas.

A sensibilidade, especificidade e acurácia dos testes foi realizada no programa *OpenEpi* (Dean AG, Sullivan KM, Soe MM. *OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health*. www.OpenEpi.com, atualizado em 06/04/2013, acessado em 22/02/2021). A sensibilidade foi calculada considerando a porcentagem de resultados positivos em pacientes com hanseníase e a especificidade foi calculada através da porcentagem de resultados negativos em pacientes sem hanseníase. O valor de acurácia foi considerado através do seguinte cálculo:

$$\frac{\textit{Verdadeiro positivo} + \textit{Verdadeiro negativo}}{\textit{Total de pacientes avaliados}}$$

Para todas as propriedades de teste referidas, foi considerado o exato IC binomial de 95%.

Valores faltantes foram ignorados em testes não pareados e ambos os grupos que perderam correspondentes foram excluídos na aplicação de testes pareados. O programa R Studio (250 Northern Ave, Boston, MA 02210), foi utilizado para as análises. A significância estatística foi definida como um valor de p inferior a 0,05 e o IC foi estabelecido em 95%.

5. RESULTADOS

5.1. Características clínicas e populacionais

Durante o período de recrutamento, 100 pacientes foram incluídos no presente estudo, dos quais 47/100 (47%) eram do gênero feminino e 53/100 (53%) do gênero masculino. Os 100 pacientes foram divididos em dois grupos: 54 alocados para o grupo hanseníase e 46 para o grupo controle. O terceiro ponto de corte foi o que apresentou o maior número de resultados negativos no teste índice ($n = 72$), destes no diagnóstico final 31 realmente tinham hanseníase e 41 não tinham hanseníase. O primeiro ponto de corte foi o que apresentou o maior número de resultados positivos ($n = 63$), destes no diagnóstico final 43 realmente tinham hanseníase e 20 não tinham hanseníase (Figura 11).

No grupo controle, 20/46 (43,48%) pacientes eram do gênero feminino e 26/46 (56,52%) do gênero masculino. No grupo hanseníase, 27/54 (50%) eram do gênero feminino e 27/54 (50%) do gênero masculino (valor de $p = 0,652$) (Tabela 5). A média de idade do grupo hanseníase foi de 47,9 anos, e no grupo controle de 46,3 anos (valor de $p = 0,580$).

Tabela 5. Características clínicas e populacionais dos grupos hanseníase e controle.

	HANSENÍASE	CONTROLE	Valor de p
Sexo			0,652
Masculino, n (%)	27 (50%)	26 (56,52%)	
Feminino, n (%)	27 (50%)	20 (43,48%)	
Média de idade (QR)	47,9 (21,0)	46,3 (20,2)	0,580

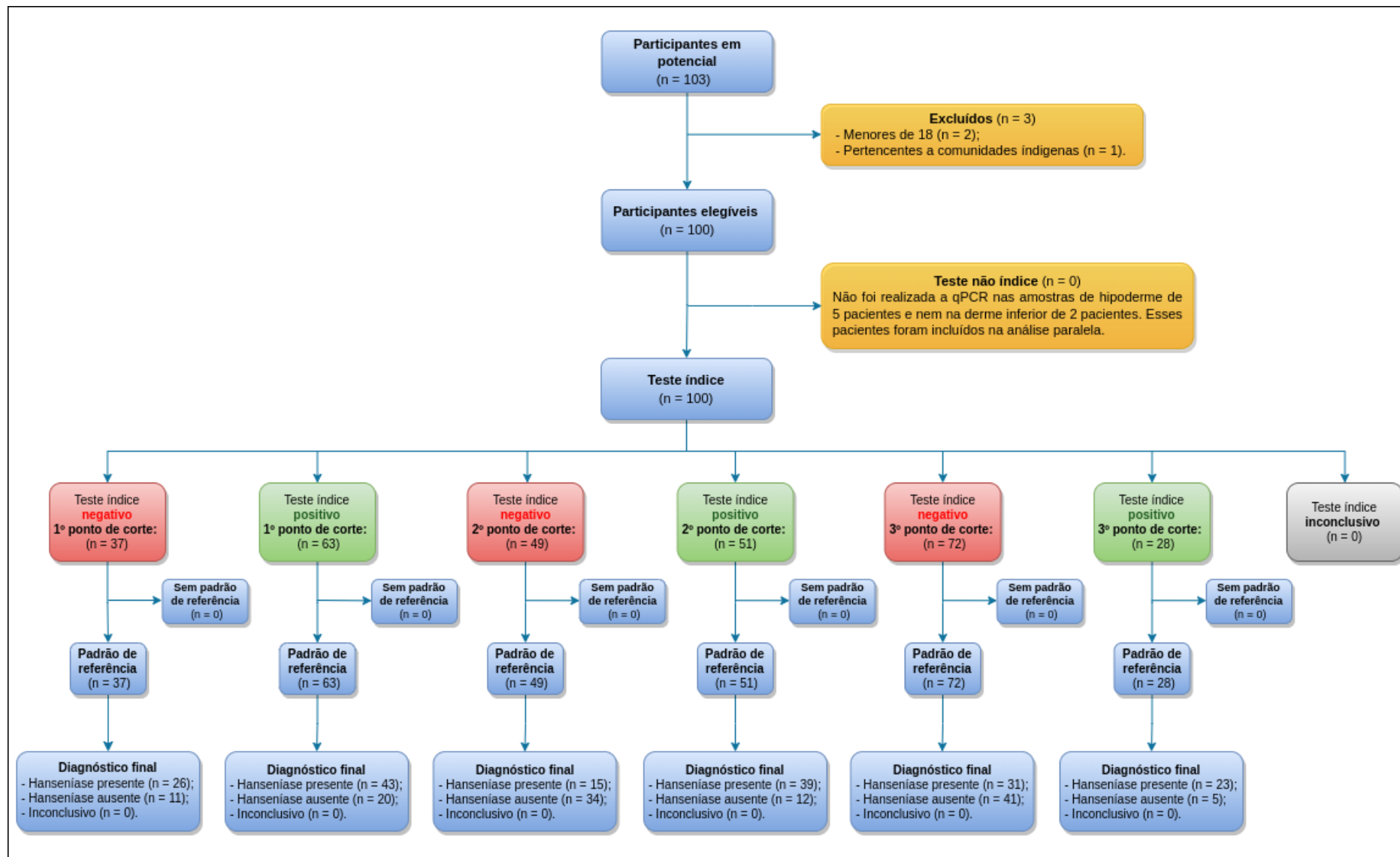


Figura 11. Diagrama do fluxo de participantes dentro do estudo.

5.2. Grupo Hanseníase

No grupo hanseníase, 23/54 (42,59%) dos casos eram reincidentes. A maioria dos casos de hanseníase (32/54, 59,26%) foi caracterizada como paucibacilar (um caso de neural, cinco tuberculóide e vinte e seis dimorfo-tuberculóide), enquanto os demais (22/54, 40,74%) foram caracterizados como multibacilar (cinco dimorfo - dimorfo, três dimorfo - virchowiana e quatorze virchowiana).

Em pacientes que apresentaram hanseníase pela primeira vez a média do IB foi de 0,89 (desvio padrão = 1,62), e em pacientes que apresentaram hanseníase reincidente a média do IB foi de 1,44 (desvio padrão = 1,88) (valor de $p = 0,271$) (Tabela 6).

Tabela 6. Comparativo hanseníase recidiva e IBP.

Hanseníase recidiva	IBP (média / desvio padrão)	Valor de p
Não	0,89/1,62	0,271
Sim	1,44/1,88	

A média da quantificação de bacilos no *swab* nasal dos pacientes diagnosticados com hanseníase pela primeira vez foi de $1,459279^{-8}$ (desvio padrão = $5,786078^{-8}$). Em pacientes com hanseníase reincidente a média da quantificação do *swab* nasal foi de $1,014881^{-8}$ (desvio padrão = $2,050214^{-8}$) (valor de $p = 0,780$). O quadro 2 demonstra o comparativo da média da quantificação relativa por amostras de pele e *swab* analisados com a hanseníase reincidente.

O número de contatos diagnosticados com hanseníase foi dividido pelo número total de contatos examinados. O resultado dessa divisão foi comparado com a quantificação relativa de todas as amostras analisadas (valor de p : epiderme = 0,540; derme superior = 0,625; derme inferior = 0,697; subcutâneo = 0,645; *swab* nasal = 0,663). Este resultado demonstrou que não há nenhuma relação entre o número de contatos intradomiciliares doentes e a quantificação dos bacilos.

Quadro 2. Comparativo entre hanseníase recidiva e média de bacilos da quantificação relativa por tipo de amostra.

Amostra	Hanseníase recidiva	Média bacilos / Desvio padrão	Valor de p
Epiderme	Não	2,055518 ⁻⁶ /4,920999 ⁻⁶	0,133
	Sim	2,955819 ⁻⁸ /7,055114 ⁻⁸	
Derme superior	Não	5,057637 ⁻⁶ /1,494600 ⁻⁵	0,219
	Sim	9,956515 ⁻⁸ /1,882599 ⁻⁷	
Derme inferior	Não	1,526318 ⁻⁵ /5,310695 ⁻⁵	0,291
	Sim	2,187645 ⁻⁷ /2,423710 ⁻⁷	
Hipoderme	Não	1,002252 ⁻⁵ /3,226092 ⁻⁵	0,273
	Sim	1,701150 ⁻⁷ /4,690172 ⁻⁷	
Swab nasal	Não	1,459279 ⁻⁸ /5,786078 ⁻⁸	0,780
	Sim	1,014881 ⁻⁸ /2,050214 ⁻⁸	

A reação do tipo 1 foi a mais comum dentro do grupo hanseníase com o total de 19 casos (35,18%). 22/54 (40,47%) dos pacientes não apresentaram nenhum tipo de reação (Tabela 7).

Tabela 7. Comparativo de reações hansênicas apresentadas pelo grupo hanseníase.

Reação	Total / porcentagem (%)
Tipo 1	19 / 35,18
Tipo 2	7 / 12,96
Tipo 1 e 2	6 / 11,11
Não apresentou reação	22 / 40,47

Foram confirmados casos de hanseníase no Distrito Federal - DF, em Goiás - GO e em Minas Gerais - MG. As seguintes cidades do DF foram confirmadas: Águas Claras, Asa Norte, Brazlândia, Ceilândia, Córrego Arrozal, Fercal, Gama, Guará, Itapoã, Lago Norte, Núcleo Rural Vargem Bonita, Paranoá, Planaltina, Sobradinho I e II, Recanto das Emas, Riacho Fundo II, Samambaia, Santa Maria, São Sebastião, Setor O e Vicente Pires. As seguintes cidades de GO tiveram casos confirmados: Formosa, Luziânia, Novo Gama, Ocidental, Padre Bernardo, Planaltina, Santo Antônio

do Descoberto e Valparaíso. Na cidade de MG, o caso confirmado foi da cidade de Divinópolis.

5.3. Grupo controle

Os pacientes incluídos no grupo controle apresentaram os seguintes diagnósticos: 20 com Leishmaniose Tegumentar Americana, 8 com eczemas cutâneos, 6 com lúpus cutâneo, 2 com linfomas cutâneos, 1 com carcinoma espinocelular, 1 com carcinoma basocelular, 3 com micose subcutânea, 2 com tuberculose cutânea, 1 com fibroepitelioma de pinkus, 1 com hidradenite supurativa atípica e 1 com sífilis.

5.4. Sensibilidade, especificidade e acurácia do teste de qPCR para os três pontos de corte

A melhor sensibilidade encontrada no teste de qPCR foi no primeiro ponto de corte na derme superior (59,26% / IC 95% 45,97 - 71,32). A epiderme no terceiro ponto de corte alcançou 100% de especificidade (IC 95% / 92,29 - 100). A melhor acurácia foi encontrada na hipoderme no primeiro ponto de corte (68,09% / IC 95% 58,11 - 76,64) (Quadros 3, 4 e 5).

Quadro 3. Sensibilidade, especificidade e acurácia do teste de qPCR no primeiro ponto de corte.

Amostra	Sensibilidade – positivo / hanseníase (IC 95%)	Especificidade – negativo / controle (IC 95%)	Acurácia (IC 95%)
Epiderme	57,41% - 31/54 (44,16 - 69,67)	76,09% - 35/46 (62,06 - 86,09)	66% (56,28 - 74,54)
Derme superior	59,26% - 32/54 (45,97 - 71,32)	73,91% - 34/46 (59,74 - 84,4)	66% (56,28 - 74,54)
Derme inferior	58,49% - 31/53 (45,09 - 70,74)	77,27% - 34/44 (63,01 - 87,16)	67,01% (57,16 - 75,56)
Hipoderme	54,9%- 28/51 (41,38 - 67,73)	83,72% - 36/43 (70,03 - 91,88)	68,09% (58,11 - 76,64)
Swab nasal	20,83% - 10/48 (11,73 - 34,26)	100% - 28/28 (87,94 - 100)	50% (39,03 - 60,97)

Quadro 4. Sensibilidade, especificidade e acurácia do teste de qPCR no segundo ponto de corte.

Amostra	Sensibilidade – positivo / hanseníase (IC 95%)	Especificidade – negativo / controle (IC 95%)	Acurácia (IC 95%)
Epiderme	38,89% - 21/54 (27,04 - 52,21)	89,13% - 41/46 (76,96 - 95,27)	62% (52,21 - 70,9)
Derme superior	40,74% - 22/54 (28,68 - 54,03)	86,96% - 40/46 (74,33 - 93,88)	62% (52,21 - 70,9)
Derme inferior	49,06% - 26/53 (36,12 - 62,12)	84,09% - 37/44 (70,63 - 92,07)	64,95% (55,05 - 73,71)
Hipoderme	41,18% - 21/51 (28,75 - 54,83)	93,02% - 40/43 (81,39 - 97,6)	64,89% (54,83 - 73,78)
Swab nasal	8,33% - 4/48 (3,288 - 19,55)	100% - 28/28 (87,94 - 100)	42,11% (31,65 - 53,32)

Quadro 5. Sensibilidade, especificidade e acurácia do teste de qPCR no terceiro ponto de corte.

Amostra	Sensibilidade – positivo / hanseníase (IC 95%)	Especificidade – negativo / controle (IC 95%)	Acurácia (IC 95%)
Epiderme	24,07% - 13/54 (14,64 - 36,95)	100% - 46/46 (92,29 - 100)	59% (49,2 - 68,13)
Derme superior	33,33% - 18/54 (22,24 - 46,64)	93,48% - 43/46 (82,5 - 97,76)	61% (51,2 - 69,98)
Derme inferior	30,19% - 16/53 (19,52 - 43,54)	95,45% - 42/44 (84,86 - 98,74)	59,79% (49,84 - 69)
Hipoderme	29,41% - 15/51 (18,71 - 43)	97,67% - 42/43 (87,94 - 99,59)	60,64% (50,53 - 69,91)
Swab nasal	6,25% - 3/48 (18,71 - 43)	100% - 28/28 (87,94 - 99,59)	40,79% (50,53 - 69,91)

A derme inferior foi a camada da pele que apresentou a maior média do número de bacilos ($8,898234^{-6}$), seguida da hipoderme ($5,687462^{-6}$) (Quadro 6). As amostras de *swab* nasal apresentaram os menores resultados de quantificação, enquanto as amostras da derme superior e inferior apresentaram as maiores quantidades de *M. leprae*. Entretanto, os resultados da quantificação absoluta ($p = 0,143$) e relativa ($p =$

0,132) não foram significativamente diferentes entre camadas da pele e amostras de *swab* (Tabela 8).

Quadro 6. Mediana e média do número de bacilos por camada.

Camada da pele	Mediana / Média do número de bacilos (mínimo / máximo)
Epiderme	2,758003 ⁻⁹ / 1,198381 ⁻⁶ (0,0 - 1,446094 ⁻⁵)
Derme superior	2,134938 ⁻⁹ / 2,959991 ⁻⁶ (0,0 - 5,754636 ⁻⁵)
Derme inferior	1,54354 ⁻⁸ / 8,898234 ⁻⁶ (0,0 - 0,000206)
Hipoderme	7,462773 ⁻⁹ / 5,687462 ⁻⁶ (0,0 - 0,000121)

Tabela 8. Quantificação absoluta e relativa das amostras.

Amostra	Quantificação absoluta	Quantificação relativa
	Número médio de bacilos (desvio padrão)	Número médio de bacilos por mg de tecido cutâneo (desvio padrão)
Epiderme	260,59 (965,43)	80,04 (331,98)
Derme superior	1260,89 (5246,18)	401,65 (1434,15)
Derme inferior	1514,15 (7460,72)	661,04 (3491,63)
Subcutâneo	820,96 (170,94)	2158,46 (10285,31)
Swab nasal	0,02 (0,06)	5,85 (22,66)

Não foi encontrado relação direta entre os resultados dos testes de qPCR em qualquer camada da pele e os resultados da baciloscopia, apesar da positividade da qPCR ter sido maior em pacientes multibacilares (epiderme: $p = 0,256$; derme superior: $p = 0,136$; derme inferior: $p = 0,135$; subcutâneo: $p = 0,155$; *swab* nasal: $p = 0,085$) (Tabela 9).

As diferentes camadas da pele analisadas não tiveram grande influência nos valores de acurácia, sensibilidade e especificidade da qPCR. De acordo com a curva ROC, os diferentes pontos de corte estabelecidos são a principal razão para que ocorra alterações na acurácia do teste de qPCR (Figura 13).

A avaliação do gráfico em floresta mostrou que os diferentes pontos de corte influenciaram nos valores de sensibilidade e especificidade (Figura 12).

Tabela 9. Análise dos valores de sensibilidade, especificidade e acurácia nos diferentes pontos de corte estabelecidos para a qPCR.

Ponto de corte	Amostra	Multibacilar			Paucibacilar		
		Sensibilidade – positivo / hanseniase (IC 95%)	Especificidade – negativo / controle (IC 95%)	Acurácia (95% IC)	Sensibilidade – positivo / hanseniase (IC 95%)	Especificidade – negativo / controle (IC 95%)	Acurácia (95% IC)
Primeiro	Epiderme	81,82% - 18/22 (61,48 - 92,69)	76,09% - 35/46 (62,06 - 86,09)	77,94% (66,74 - 86,15)	40,63% - 13/32 (25,52 - 57,74)	76,09% - 35/46 (62,06 - 86,09)	61,54% (50,44 - 71,55)
	Derme superior	90,91% - 20/22 (72,18 - 97,47)	73,91% - 34/46 (59,74 - 84,4)	79,41% (68,36 - 87,32)	37,5% - 12/32 (22,93 - 54,75)	73,91% - 34/46 (59,74 - 84,4)	58,97% (47,89 - 69,22)
	Derme inferior	90,48% - 19/21 (71,09 - 97,35)	77,27% - 34/44 (63,01 - 87,16)	81,54% (70,45 - 89,11)	37,5% - 12/32 (22,93 - 54,75)	77,27% - 34/44 (63,01 - 87,16)	60,53% (49,29 - 70,75)
	Subcutâneo	80% - 16/20 (58,4 - 91,93)	83,72% - 36/43 (70,03 - 91,88)	79,25% (66,54 - 88)	38,71% - 12/31 (23,73 - 56,18)	83,72% - 36/43 (70,03 - 91,88)	64,86% (53,5 - 74,76)
	Swab nasal	36,84% - 7/19 (19,15 - 58,96)	100% - 0/28 (87,94 - 100)	74,47% (60,49 - 84,75)	10,34% - 3/29 (3,58 - 26,39)	100% - 28/28 (87,94 - 100)	54,39% (41,59 - 66,63)
Segundo	Epiderme	68,18% - 15/22 (47,32 - 83,64)	89,13% - 41/46 (76,96 - 95,27)	82,35% (71,64 - 89,61)	18,75% - 6/32 (8,88 - 35,31)	89,13% - 41/46 (76,96 - 95,27)	60,26% (49,16 - 70,39)
	Derme superior	72,73% - 16/22 (51,85 - 86,85)	86,96% - 40/46 (74,33 - 93,88)	82,35% (71,64 - 89,61)	18,75% - 6/32 (8,88 - 35,31)	86,96% - 40/46 (74,33 - 93,88)	58,97% (47,89 - 69,22)
	Derme inferior	80,95% - 17/21 (60 - 92,33)	84,09% - 37/44 (70,63 - 92,07)	83,08% (72,18 - 90,28)	28,13% - 9/32 (15,56 - 45,37)	84,09% - 37/44 (70,63 - 92,07)	60,53% (49,29 - 70,75)
	Subcutâneo	80% - 16/20 (58,4 - 91,93 ¹)	93,02% - 40/43 (81,39 - 97,6)	88,89% (78,8 - 94,51)	16,13% - 5/31 (7,09 - 32,63)	93,02% - 40/43 (81,39 - 97,6)	60,81% (49,42 - 71,14)
	Swab nasal	21,05% - 4/19 (8,508 - 43,33)	100% - 28/28 (87,94 - 100)	68,09% (53,83 - 79,6)	0,0% - 0/29 (0,0 - 11,7)	100% - 28/28 (87,94 - 100)	49,12% (36,62 - 61,74)
Terceiro	Epiderme	45,45% - 10/22 (26,92 - 65,34)	100% - 0/46 (92,29 - 100)	82,35% (71,64 - 89,61)	9,37% - 3/32 (3,24 - 24,22)	100% - 46/46 (92,29 - 100)	62,82% (51,73 - 72,71)
	Derme superior	68,18% - 15/22 (47,32 - 83,64)	93,48% - 43/46 (82,5 - 97,76)	85,29% (75 - 91,81)	9,37% - 3/32 (3,24 - 24,22)	93,48% - 43/46 (82,5 - 97,76)	58,97% (47,89 - 69,22)
	Derme inferior	66,67% - 14/21 (45,37 - 82,81)	95,45% - 42/44 (84,86 - 98,74)	86,15% (75,73 - 92,54)	6,25% - 2/32 (1,73 - 20,15)	95,45% - 42/44 (84,86 - 98,74)	57,89% (46,68 - 68,35)
	Subcutâneo	60% - 12/20 (38,66 - 78,12)	97,67% - 42/43 (87,94 - 99,59)	85,71% (75,03 - 92,3)	9,67% - 3/31 (3,34 - 24,9)	97,67% - 42/43 (87,94 - 99,59)	60,81% (49,42 - 71,14)
	Swab nasal	15,79% - 3/19 (5,52 - 37,57)	100% - 0/28 (87,94 - 100)	65,96% (51,67 - 77,83)	0,0% - 0/29 (0,0 - 11,7)	100% - 28/28 (87,94 - 100)	49,12% (36,62 - 61,74)

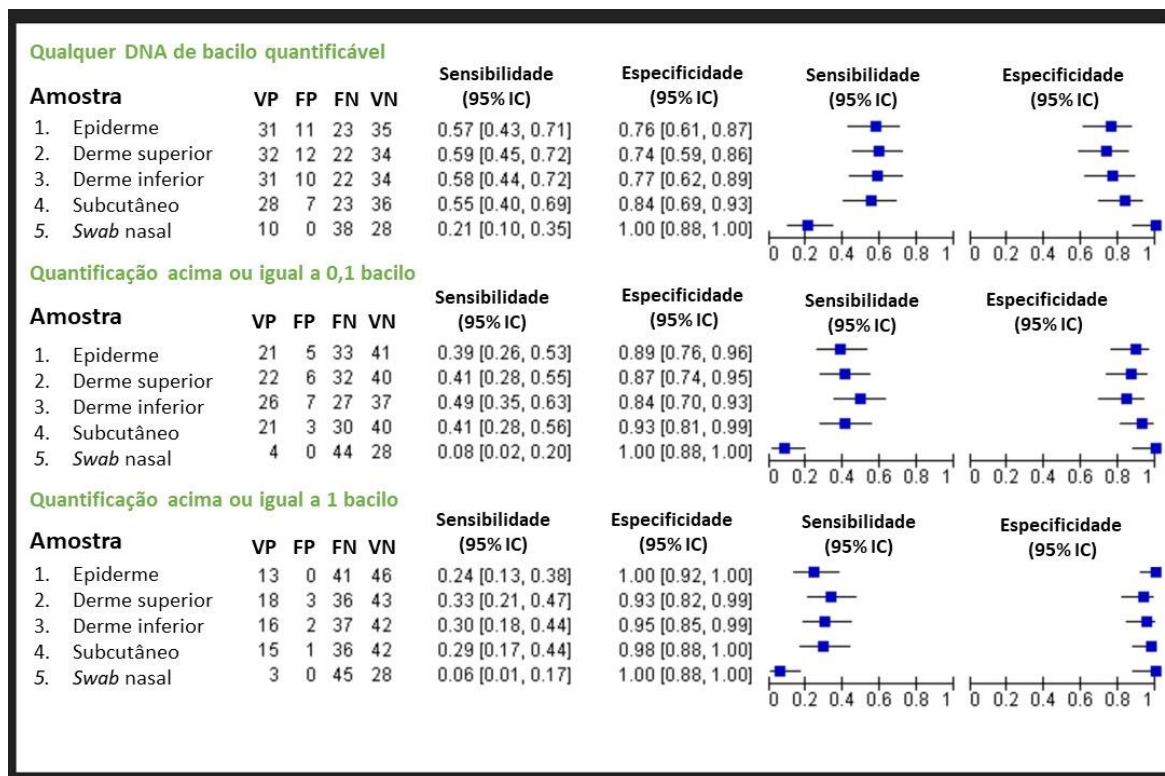


Figura 12. Representação do gráfico em floresta com os valores de sensibilidade e especificidade.

Legenda: VP = verdadeiro positivo; FP = falso positivo; FN = falso negativo; VN = verdadeiro negativo.

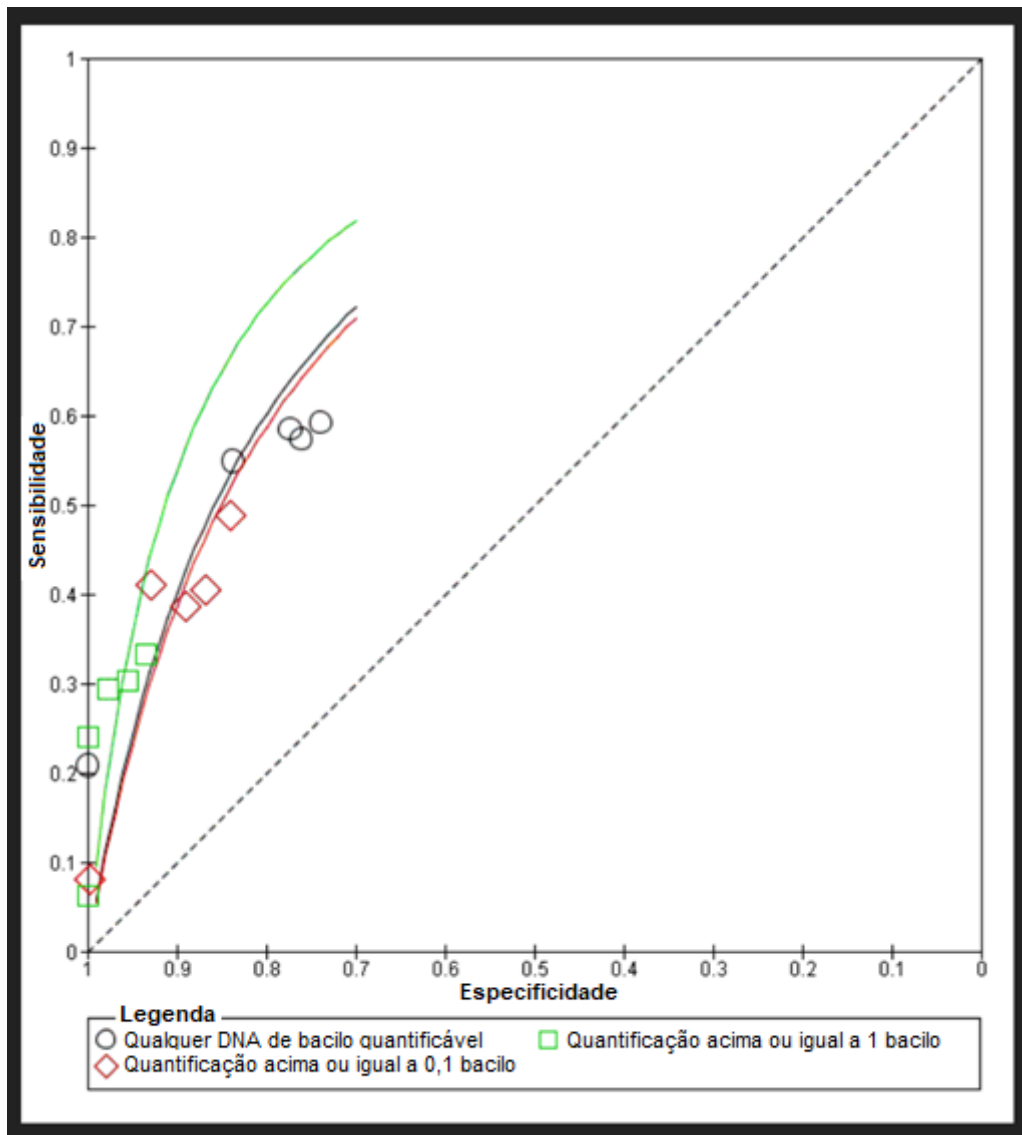


Figura 13. Ilustração da curva ROC.

6. DISCUSSÃO

O diagnóstico da hanseníase é baseado em achados clínicos. Porém, técnicas laboratoriais complementares podem ser necessárias para esclarecer casos atípicos e para definir o esquema terapêutico (47). Nos pacientes em estágios iniciais da doença, nos quais, a carga bacilar é baixa, a maioria dos exames existentes apresenta baixa sensibilidade. O alvo RLEP é considerado um alvo sensível e específico para PCR (48), ainda que estudos anteriores não tenham detectado qualquer influência do par de *primers* escolhido na acurácia do diagnóstico molecular da hanseníase (47).

As propriedades *in vitro* dos *primers* projetados no presente estudo e a reação para *M. leprae* demonstraram resultados eficientes (49). A curva padrão desenvolvida com alvos clonados apresentou uma eficiência satisfatória e um limite de quantificação de 0,03 bacilos. Esses resultados foram considerados um ponto de partida ideal para um teste translacional de acurácia em condições de vida real. Embora a diluição do controle clonado com DNA genômico humano não tenha afetado as propriedades *in vitro* do teste, sabe-se que os resultados de acurácia na prática clínica em uma população- alvo precisavam ser investigados. Muitos fatores, como a presença de inibidores de PCR e um número variável de cópias de genes em patógenos individuais, podem limitar os resultados dos métodos de quantificação. O uso de bacilos purificados também apresentaria barreiras devido à limitação natural dos métodos microscópicos. Por isso, foi projetado um estudo cego de acurácia diagnóstica de coorte transversal. De acordo com as diretrizes metodológicas, essas são medidas essenciais para garantir a generalização da realização de testes diagnósticos na prática clínica (50).

O tipo de amostra analisada no estudo, composta por diferentes camadas de pele e *swab* nasal, não influenciou na precisão das técnicas testadas. Esse resultado mostra que, embora a separação das camadas da pele possa não ser extremamente precisa, isso não teve influência nos resultados da qPCR. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de os kits de extração modernos serem eficientes no isolamento de diferentes tipos de amostras biológicas (51,52). Embora haja controvérsias relacionadas às amostras de sangue (51), estudos anteriores também não encontraram diferenças significativas quando avaliaram os valores de acurácia das técnicas de biologia molecular em diferentes tipos de amostras. A utilização de

amostras de mucosas coletadas com *swabs* nasais mostrou resultados extremamente limitados em relação à acurácia, mesmo em pacientes multibacilares. Esses testes geralmente não são considerados para investigações diagnósticas, mas sua utilidade no monitoramento da transmissão aérea já foi examinada (53).

Esse estudo não encontrou marcadores biológicos de transmissão da doença. Os números da quantificação absoluta e relativa dos bacilos encontrados em qualquer uma das camadas da pele e em amostras de *swab* não foram significativamente relacionados ao número de contatos intradomiciliares infectados. O mais provável é que o tamanho amostral calculado para o teste de propriedades diagnósticas não tenha sido suficiente para testar essa suposição, o que representa uma limitação do estudo. Isso aconteceu com as amostras de *swab*, que não apresentaram relação com o número de contatos doentes, em contraste com a probabilidade biológica de transmissão aérea da hanseníase, que também foi encontrada em estudos anteriores (53).

Três pacientes paucibacilares classificados por critérios clínicos e por resultados de baciloscopia apresentaram amostras de *swab* nasal positivas no primeiro ponto de corte, que corresponde ao limite de detecção de qualquer DNA do bacilo quantificável. Chama-se a atenção para esse resultado devido à controvérsia relacionada à transmissão da hanseníase paucibacilar, que ainda não está bem definida na literatura (54). Embora seja necessário ponderar que existe um grau considerável de subjetividade na classificação da hanseníase e que os pacientes multibacilares podem ser erroneamente classificados como portadores das formas paucibacilares. Nos resultados aqui apresentados, nenhum dos pacientes paucibacilares apresentaram a quantificação de um bacilo inteiro nas amostras de *swab*. Biologicamente, pode-se supor que pacientes paucibacilares eliminem apenas fragmentos de DNA de bacilos e não um bacilo inteiro. Esse achado desfavorece a possibilidade de transmissão aérea por pacientes paucibacilares.

O gráfico de floresta demonstrou que a predefinição dos diferentes pontos de corte, claramente, influenciou os resultados de sensibilidade e especificidade. Essa influência foi presumida em revisões da literatura anteriores, mas nunca foi sistematicamente testada (55). As diferenças de pontos de corte são extremamente difíceis de se comparar entre os estudos, o que impede análises como a avaliação da heterogeneidade entre as meta-análises (56). Essa limitação provavelmente

permanecerá, a não ser que uma padronização das técnicas moleculares seja definida pela comunidade científica. Estudos multicêntricos, que são relativamente incomuns para técnicas de diagnóstico, também podem ser úteis para ajudar a superar essa limitação (57).

A melhor sensibilidade alcançada foi de 59,26%, encontrada em qualquer DNA de bacilo quantificável (primeiro ponto de corte), na derme superior. À primeira vista, isso pode ser considerado um resultado contraditório por causa do limite de quantificação estabelecido pelo estudo, que é inferior a um bacilo. No entanto, espera-se que existam limitações de sensibilidade na prática clínica devido a vários fatores como limitações relacionadas ao homem e fatores biológicos (como a presença de inibidores de DNA) (58). Estudos anteriores de hanseníase atingiram uma sensibilidade de aproximadamente 75% para a qPCR, provando que as condições clínicas implicam em uma variedade de fatores limitantes que vão além daqueles encontrados em estudos puramente laboratoriais (59). Além disso, na maioria dos artigos publicados, os avaliadores não eram cegos e os testes eram realizados em ambientes controlados, nos quais, os diagnósticos de casos e controles eram previamente conhecidos pelos investigadores. O que representa os chamados estudos de acurácia caso-controle (59). Essa estratégia naturalmente gera viés, o que melhora artificialmente a sensibilidade e a especificidade (50).

No presente estudo, os valores de especificidade obtidos foram consideravelmente mais estáveis, com um valor mínimo de 73,91% para a derme superior, que foi obtido de acordo com o primeiro ponto de corte. A proporcionalidade inversa dos valores de sensibilidade versus especificidade e a reduzida acurácia diagnóstica obtida ao simular condições da vida real reforçam a relevância clínica dos resultados apresentados (Figura 13).

Os resultados mostram claramente que a aplicação clínica de testes diagnósticos pode ser muito diferente dos encontrados em testes laboratoriais iniciais, o que é logicamente verdadeiro não apenas para ensaios clínicos de intervenção, mas também para o desenvolvimento de técnicas diagnósticas (60).

Em consonância com revisões sistemáticas anteriores da literatura, esse estudo mostra que a aplicação de testes moleculares para o diagnóstico da hanseníase sofre grande heterogeneidade se aplicada sem critérios bem definidos. Muito provavelmente a aplicação desses testes em pacientes com maior chance de

apresentar hanseníase multibacilar, como contatos domiciliares e pacientes com níveis elevados de anticorpos séricos contra glicolípido fenólico I, é uma estratégia promissora, pois a maioria dos estudos mostra que os testes moleculares têm melhor desempenho nessa população. Essa estratégia também é útil para auxiliar na rastreabilidade dos contatos na população, o que por consequência quebraria a cadeia de transmissão (61).

As recomendações para um exame de baciloscopia com uma boa qualidade afirmam que o acesso à derme mais profunda é o ideal, pois o *M. leprae* é particularmente abundante na circulação linfática que é característica da região (32). Os resultados de quantificação aqui apresentados reforçam essa suposição. Embora a carga bacilífera média tenha sido maior na derme superior e inferior, o DNA do *M. leprae* foi encontrado em todas as camadas da pele, sem diferença significativa levando em consideração a profundidade da avaliação. Um estudo anterior de Sevilha-Santos et al. (2018), que teve como objetivo quantificar o kDNA de *Leishmania* nas diferentes camadas da pele, descreveu um maior número de parasitas nas camadas mais superficiais. Os autores atribuíram a presença de parasitas de DNA na epiderme a um provável mecanismo de defesa do hospedeiro conhecido como eliminação transepidérmica (62). Em consonância com estudos anteriores que utilizaram técnicas de microscopia (26,63,64), o presente estudo mostrou que a eliminação transepidérmica é provavelmente um importante mecanismo de depuração do *M. leprae*.

No entanto, mesmo quando se leva em consideração o achado de maior média de bacilos nas camadas da pele mais superficiais, deve-se considerar que o uso de biópsias e esfregaços superficiais podem resultar em perda de sensibilidade. Estudos futuros podem comparar a quantificação molecular das camadas da pele com a contagem microscópica de exames histopatológicos para gerar dados mais confirmatórios. A imunohistoquímica é uma técnica interessante para esse objetivo.

7. CONCLUSÃO

7.1. Conclusão inicial

Conclui-se que, o tipo de amostra de pele coletada para o diagnóstico da hanseníase tem pouca influência na acurácia do teste de qPCR. Porém, amostras superficiais podem resultar em perda de sensibilidade. Em contraposição, os diferentes tipos de pontos de corte influenciam na acurácia, sensibilidade e especificidade do teste. Da mesma forma, fica evidente que as novas metodologias de qPCR no diagnóstico devem ser amplamente testadas na vida real para garantir sua aplicação na prática, visto que, mesmo técnicas altamente eficientes *in vitro* podem sofrer redução de acurácia quando aplicadas na prática clínica. Os resultados também demonstram que pacientes paucibacilares podem não ser uma fonte relevante de transmissão da doença.

7.2. Quantificação do *M. leprae* na porção epidérmica, dérmica (superior e inferior), hipodérmica de lesões de hanseníase e em *swab* nasal

A maior quantidade de *M. leprae* foi encontrada nas amostras de derme superior e inferior, ao mesmo tempo que as amostras de *swab* nasal apresentaram os menores resultados.

7.3. Avaliação dos diferentes limiares de detecção na porção epidérmica, dérmica (superior e inferior) e hipodérmica

O primeiro ponto de corte apresentou a melhor sensibilidade na amostra da derme superior. No terceiro ponto de corte, os resultados da epiderme e *swab* nasal atingiram 100% de especificidade. A melhor acurácia foi encontrada no subcutâneo no primeiro ponto de corte.

7.4. Relação da quantificação com a avaliação dos contatos intradomiciliares

Não foi encontrada relação entre o número de contatos intradomiciliares infectados e a quantificação nas camadas da pele e na amostra de *swab* nasal.

7.5. Avaliação da acurácia diagnóstica em amostras de pacientes paucibacilares

A melhor acurácia detectada para as amostras de pacientes paucibacilares foi no ponto de corte para qualquer bacilo quantificável e no tecido da epiderme.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRASIL. Ministério da Saúde. Guia prático sobre a Hanseníase [Internet]. 1st ed. Brasil; 2017 [cited 2020 Jun 11]. 70 p. Available from: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_pratico_
2. Araujo S, Freitas LO, Goulart LR, Goulart IMB. Molecular evidence for the aerial route of infection of *Mycobacterium leprae* and the role of asymptomatic carriers in the persistence of leprosy. *Clinical Infectious Diseases*. 2016;63(11):1412–20.
3. BRASIL. Manual de Leprologia. Rio de Janeiro; 1960.
4. Foss NT. Hanseníase: aspectos clínicos, imunológicos e terapêuticos. *An Bras Dermatol*. 1999;74:113–9.
5. GOMES ACB. O processo de Armauer Hansen. *Jornal do Conselho Regional de Medicina do Rio Grande do Sul*. 2000;13.
6. Eidt LM. Trajectory in the Brazilian Public Health. *Saúde sociedade*. 2004;13.
7. Elioenai A, Ferreira TL, Ferreira IN. Hanseníase Avanços e Desafios. 2014. 494 p.
8. BRASIL. Ministério da Saúde. Controle da hanseníase: uma proposta de integração ensino-serviço. Rio de Janeiro: DNDS/NUTES; 1989.
9. Jopling WH; MAC. Manual de hanseníase. 4a. ed. Rio de Janeiro: Livraria Atheneu Editora; 1991.
10. Opromolla DV Araujo. Noções de hansenologia [Internet]. 2000 [cited 2023 Jan 27]. p. 126. Available from: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-642153>
11. Monteiro YN. Hanseníase: história e poder no Estado de São Paulo. *Hansenol Int*. 1987;12:1–7.
12. TERRA F. Esboço histórico da lepra no Brasil. *An Bras Dermatol*. 1926;2:3–4.
13. Han XY, Seo YH, Sizer KC, Schoberle T, May GS, Spencer JS, et al. A new *Mycobacterium* species causing diffuse lepromatous leprosy. *Am J Clin Pathol* [Internet]. 2008 Dec [cited 2022 Apr 17];130(6):856–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19019760/>
14. Deps P, Collin SM. *Mycobacterium lepromatosis* as a Second Agent of Hansen's Disease. *Front Microbiol*. 2021 Sep 10;12:2531.

15. Santos MS. Lazareto da Ilha Grande: isolamento, aprisionamento e vigilância nas áreas de saúde e política (1884-1942). *Hist Cienc Saude Manguinhos* [Internet]. 2007 [cited 2023 Jan 27];14(4):1173–96. Available from: <http://www.scielo.br/j/hcsm/a/dLDTZHLShzVhcRhrM76PcCr/?lang=pt>
16. WHO. Weekly epidemiological record. *Weekly Epidemiological Record* [Internet]. 2021 [cited 2023 Jan 9];421–44. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/who-wer9636-421-444>
17. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde | Ministério da Saúde Boletim Epidemiológico [Internet]. 2022. Available from: www.saude.gov.br/svs
18. Ng V, Zanazzi G, Timpl R, Talts JF, Salzer JL, Brennan PJ, et al. Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. *Cell*. 2000;3:511–24.
19. Draper P. Structure of *Mycobacterium leprae*. *Lepr Rev*. 1989;2:15–20.
20. Macieira S. Aspectos microbiológicos do *Mycobacterium leprae*. *Noções de Hansenologia* [Internet]. 2000 [cited 2023 Jan 20];13–7. Available from: http://hansen.bvs.ilsl.br/textoc/livros/OPROMOLLA_DILTOR_nocoas/PDF/aspecto_leprae.pdf
21. Silva Souza C. *Hanseníase: Formas clínicas e diagnóstico diferencial*. Ribeirão Preto; 1997.
22. Ridley D, Jopling W. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* . 1966;34(3):255–73.
23. OMS. *Diretrizes para o diagnóstico, tratamento e prevenção da hanseníase*. 2019.
24. Alemu Belachew W, Naafs B. Position statement: LEPROSY: Diagnosis, treatment and follow-up. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* [Internet]. 2019 Jul 1 [cited 2023 Jan 20];33(7):1205–13. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jdv.15569>
25. Goulart IMB, Bernardes Souza DO, Marques CR, Pimenta VL, Gonçalves MA, Goulart LR. Risk and protective factors for leprosy development determined by epidemiological surveillance of household contacts. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2008;15(1):101–5.

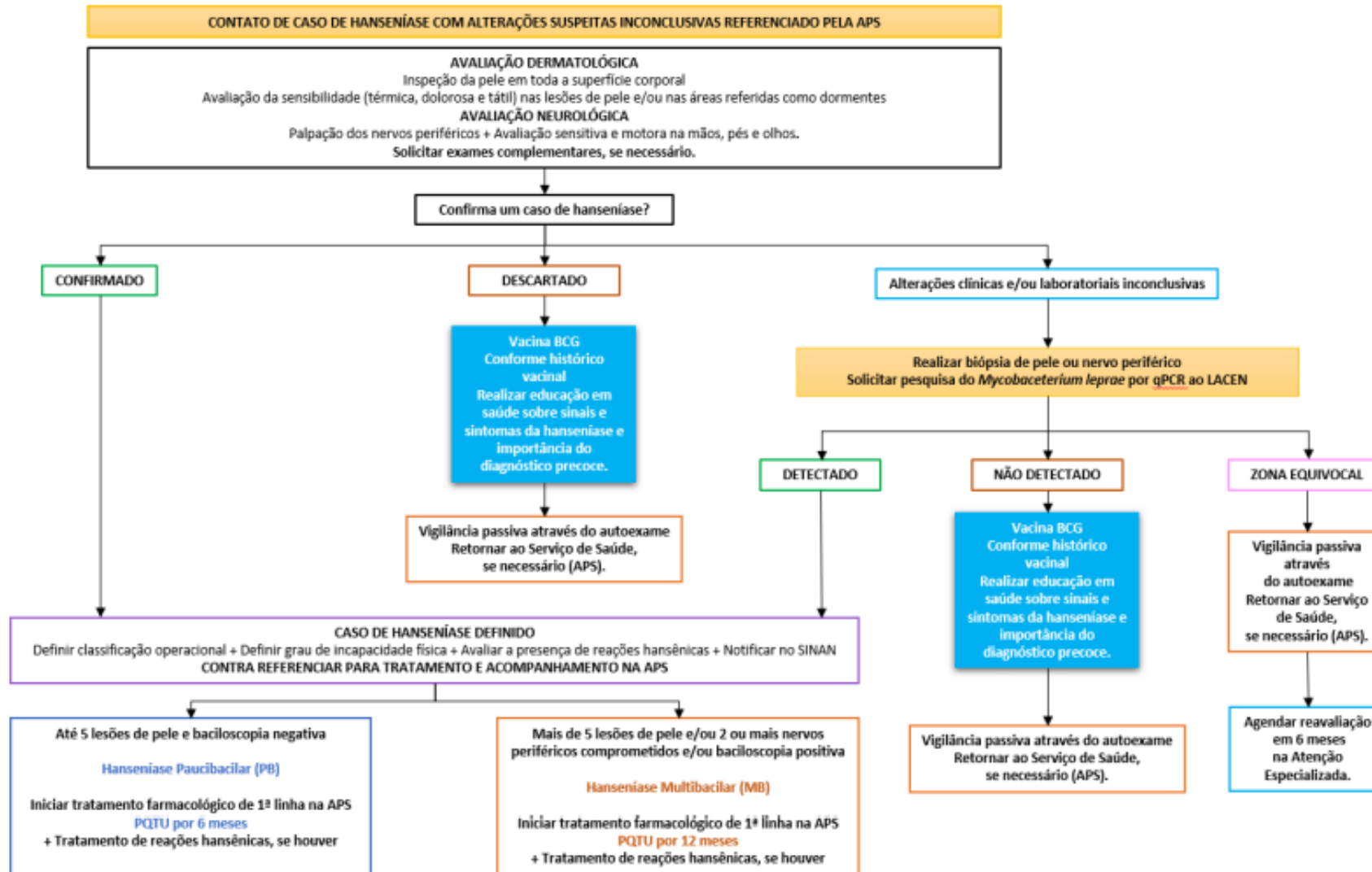
26. Okada S, Komura J, Nishiura M. Mycobacterium leprae found in epidermal cells by electron microscopy . *IntJLeprOther MycobactDis* . 1978;46(0148-916X):30–4.
27. Namisato M, Kakuta M, Kawatsu K, Obara A, Izumi S, Ogawa H. Transepidermal elimination of lepromatous granuloma: a mechanism for mass transport of viable bacilli . *Leprosy Review* . 1997;68(0305–7518):167–72.
28. Ghorpade AK. Transepidermal elimination of Mycobacterium leprae in histoid leprosy: A case report suggesting possible participation of skin in leprosy transmission. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2011 Jan;77(1):59–61.
29. Lastória JC, Abreu MAMM de. Hanseníase: diagnóstico e tratamento. *Diagnóstico e tratamento*. 2012;17(4):173–9.
30. BRASIL. Diretrizes para vigilância, atenção e eliminação da Hanseníase como problema de saúde pública. Ministério da Saúde. 2016;
31. Ule Belotti N, Tonelli Nardi S, Arco Paschoal V, Martins Montanha J, Paro Pedro H, Gazetta C. Laboratory diagnosis of leprosy: Two staining methods from bacilloscopy and rapid ml flow test. *Int J Mycobacteriol* [Internet]. 2021 Oct 1 [cited 2023 Jan 21];10(4):393. Available from: <https://www.ijmyco.org/article.asp?issn=2212-5531;year=2021;volume=10;issue=4;spage=393;epage=397;aulast=Ule>
32. Ministério da Saúde. Guia de procedimentos técnicos: baciloscopia em hanseníase. Editora do Ministério da Saúde do Brasil. 2010;1:1–54.
33. Ura S BJ. Educação continuada em hanseníase Papel da Biópsia Cutânea no Diagnóstico de Hanseníase. 2004. p. 141–4.
34. Zhu H, Zhang H, Xu Y, Laššáková S, Korabečná M, Neužil P. PCR past, present and future. Vol. 69, *BioTechniques*. Future Science Ltd; 2020. p. 317–25.
35. Kralik P, Ricchi M. A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: Definitions, parameters, and everything. *Front Microbiol*. 2017 Feb 2;8(FEB):108.
36. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1991 Aug 8 [cited 2023 Jan 22];88(16):7276. Available from: </pmc/articles/PMC52277/?report=abstract>

37. Alexandre J. Diagnóstico de Leishmaniose Tegumentar Americana utilizando a saliva coletada com swab. Recife; 2015.
38. Britton WJ, Lockwood DNJ. Leprosy. *The Lancet* [Internet]. 2004 Apr 10 [cited 2023 Jan 22];363(9416):1209–19. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S0140673604159527/fulltext>
39. Smith CS, Aerts A, Saunderson P, Kawuma J, Kita E, Virmond M. Multidrug therapy for leprosy: a game changer on the path to elimination. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2017 Sep 1 [cited 2023 Jan 22];17(9):e293–7. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S1473309917304188/fulltext>
40. BRASIL. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Hanseníase [Internet]. Brasil; 2022. Available from: <http://conitec.gov.br/>.
41. Whiting PF, Weswood ME, Rutjes AWS, Reitsma JB, Bossuyt PNM, Kleijnen J. Evaluation of QUADAS, a tool for the quality assessment of diagnostic accuracy studies. *BMC Med Res Methodol*. 2006;6(October).
42. Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, Gatsonis CA, Glasziou PP, Irwig L, et al. STARD 2015-An updated list of essential items for reporting diagnostic accuracy studies Copying with attribution allowed for any non-commercial use of the work (Creative Commons license CC BY-NC 4.0). 2015.
43. Andrade ESN, Brandão JG, da Silva JS, Kurizky PS, Rosa PS, de Araújo WN, et al. A systematic review and meta-analysis of studies on the diagnostic accuracy and screening of tests to detect antimicrobial resistance in leprosy. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2021 May 1;100(1):115325.
44. Sevilha-Santos L. Quantificação do kDNA de *Leishmania Viannia* por qPCR em diferentes profundidades de lesões cutâneas de Leishmaniose Tegumentar Americana. 2018;
45. Rao R, Balachandran C, De A. Salt split technique: A useful tool in the diagnosis of subepidermal bullous disorders. *Indian J Dermatol*. 2010 Oct;55(4):334.
46. Larionov A, KA, and MW. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. *BMC Bioinformatics*. 2005;
47. Gurung P, Gomes CM, Vernal S, Leeflang MMG. Diagnostic accuracy of tests for leprosy: a systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2019 Nov 1 [cited 2022 Apr 18];25(11):1315–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31158516/>

48. Martinez AN, Ribeiro-Alves M, Sarno EN, Moraes MO. Evaluation of qPCR-Based Assays for Leprosy Diagnosis Directly in Clinical Specimens. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011 Oct 11;5(10):e1354.
49. Larionov A, Krause A, Miller W. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. . *BMC Bioinformatics*. 2005;6(1):62.
50. Whiting PF, RAWS, WME, MS, DJJ, RJB, et al. Quadas-2: A revised tool for the quality assessment of diagnostic accuracy studies. *Ann. Intern. Med.* *Ann Intern Med*. 2011;155:529–36.
51. Manta FS de N, Leal-Calvo T, Moreira SJM, Marques BLC, Ribeiro-Alves M, Rosa PS, et al. Ultra-sensitive detection of mycobacterium leprae: DNA extraction and PCR assays. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020 May 1;14(5):1–15.
52. Abundo MEC, Ngunjiri JM, Taylor KJM, Ji H, Ghorbani A, Mahesh KC, et al. Assessment of two DNA extraction kits for profiling poultry respiratory microbiota from multiple sample types. *PLoS One*. 2021 Jan 1;16(1 January).
53. Araujo S, Freitas LO, Goulart LR, Goulart IMB. Molecular Evidence for the Aerial Route of Infection of *Mycobacterium leprae* and the Role of Asymptomatic Carriers in the Persistence of Leprosy. *Clinical Infectious Diseases* [Internet]. 2016 Dec 1 [cited 2021 Mar 26];63(11):1412–20. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1093/cid/ciw570>
54. Halder A, MM, BUK, and SB. Role of paucibacillary leprosy in the transmission of disease. *Indian J Lepr*. 2001;73:11–5.
55. Gurung P, Gomes CM, Vernal S, Leeflang MMG. Diagnostic accuracy of tests for leprosy: a systematic review and meta-analysis. *Clinical Microbiology and Infection*. 2019 Nov 1;25(11):1315–27.
56. Hartzes AM, and MCJ. Meta-analysis for diagnostic tests. *J Nucl Cardiol*. 2019;26:68–71.
57. Meisner A, PCR, and KKF. Biomarker combinations for diagnosis and prognosis in multicenter studies: principles and methods. *Stat Methods Med Res* . 2019;28:969–85.
58. Andrade ESN, Brandão JG, da Silva JS, Kurizky PS, Rosa PS, de Araújo WN, et al. A systematic review and meta-analysis of studies on the diagnostic accuracy and screening of tests to detect antimicrobial resistance in leprosy. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2021 May 1;100(1).

59. Gurung P, Gomes CM, Vernal S, Leeflang MMG. Diagnostic accuracy of tests for leprosy: a systematic review and meta-analysis. *Clinical Microbiology and Infection*. 2019 Nov 1;25(11):1315–27.
60. Colli A, Fraquelli M, Casazza G, Conte D, Nikolova D, Duca P, et al. The architecture of diagnostic research: From bench to bedside-research guidelines using liver stiffness as an example. *Hepatology*. 2014;60(1):408–18.
61. Limeira OM, Gomes CM, Morais OO De, Cesetti MV, Alvarez RRA. Active search for leprosy cases in Midwestern Brazil: a serological evaluation of asymptomatic household contacts before and after prophylaxis with bacillus Calmette-Guérin. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* [Internet]. 2013 May [cited 2022 Apr 18];55(3):173–7. Available from: <http://www.scielo.br/j/rimtsp/a/sbvPmVzmHCVbCGQ67TCmpMm/abstract/?lang=en>
62. Goette DK. Transepidermal elimination of actinically damaged connective tissue. *Int J Dermatol*. 1984;23:669–72.
63. Seo VH, Cho W, Choi HY, Hah YM, Cho SN. Mycobacterium leprae in the epidermis: ultrastructural study I. [Internet]. Vol. 63, *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases*. 1995 [cited 2021 Mar 25]. p. 101–4. Available from: <https://europepmc.org/article/med/7730705>
64. Satapathy J, Kar B. Presence of Mycobacterium leprae in epidermal cells of lepromatous skin and its significance. Article in *Indian Journal of Dermatology Venereology and Leprology* [Internet]. 2005 [cited 2021 Mar 25]; Available from: <https://www.researchgate.net/publication/7377960>

ANEXO 1



ANEXO 2

Section & Topic	No	Item	Reported on page #
TITLE OR ABSTRACT			
	1	Identification as a study of diagnostic accuracy using at least one measure of accuracy (such as sensitivity, specificity, predictive values, or AUC)	✓
ABSTRACT			
	2	Structured summary of study design, methods, results, and conclusions (for specific guidance, see STARD for Abstracts)	✓
INTRODUCTION			
	3	Scientific and clinical background, including the intended use and clinical role of the index test	✓
	4	Study objectives and hypotheses	✓
METHODS			
<i>Study design</i>	5	Whether data collection was planned before the index test and reference standard were performed (prospective study) or after (retrospective study)	✓
<i>Participants</i>	6	Eligibility criteria	✓
	7	On what basis potentially eligible participants were identified (such as symptoms, results from previous tests, inclusion in registry)	✓
	8	Where and when potentially eligible participants were identified (setting, location and dates)	✓
	9	Whether participants formed a consecutive, random or convenience series	✓
<i>Test methods</i>	10a	Index test, in sufficient detail to allow replication	✓
	10b	Reference standard, in sufficient detail to allow replication	✓
	11	Rationale for choosing the reference standard (if alternatives exist)	✓
	12a	Definition of and rationale for test positivity cut-offs or result categories of the index test, distinguishing pre-specified from exploratory	✓
	12b	Definition of and rationale for test positivity cut-offs or result categories of the reference standard, distinguishing pre-specified from exploratory	✓
	13a	Whether clinical information and reference standard results were available to the performers/readers of the index test	✓
	13b	Whether clinical information and index test results were available to the assessors of the reference standard	✓
<i>Analysis</i>	14	Methods for estimating or comparing measures of diagnostic accuracy	✓
	15	How indeterminate index test or reference standard results were handled	✓
	16	How missing data on the index test and reference standard were handled	✓
	17	Any analyses of variability in diagnostic accuracy, distinguishing pre-specified from exploratory	✓
	18	Intended sample size and how it was determined	✓
RESULTS			

<i>Participants</i>	19	Flow of participants, using a diagram	✓
	20	Baseline demographic and clinical characteristics of participants	✓
	21a	Distribution of severity of disease in those with the target condition	✓
	21b	Distribution of alternative diagnoses in those without the target condition	✓
	22	Time interval and any clinical interventions between index test and reference standard	✓
<i>Test results</i>	23	Cross tabulation of the index test results (or their distribution) by the results of the reference standard	✓
	24	Estimates of diagnostic accuracy and their precision (such as 95% confidence intervals)	✓
	25	Any adverse events from performing the index test or the reference standard	✓
DISCUSSION			
	26	Study limitations, including sources of potential bias, statistical uncertainty, and generalisability	✓
	27	Implications for practice, including the intended use and clinical role of the index test	✓
OTHER INFORMATION			
	28	Registration number and name of registry	✓
	29	Where the full study protocol can be accessed	✓
	30	Sources of funding and other support; role of funders	✓

STARD 2015

AIM

STARD stands for “Standards for Reporting Diagnostic accuracy studies”. This list of items was developed to contribute to the completeness and transparency of reporting of diagnostic accuracy studies. Authors can use the list to write informative study reports. Editors and peer-reviewers can use it to evaluate whether the information has been included in manuscripts submitted for publication.

Explanation

A **diagnostic accuracy study** evaluates the ability of one or more medical tests to correctly classify study participants as having a **target condition**. This can be a disease, a disease stage, response or benefit from therapy, or an event or condition in the future. A medical test can be an imaging procedure, a laboratory test, elements from history and physical examination, a combination of these, or any other method for collecting information about the current health status of a patient.

The test whose accuracy is evaluated is called **index test**. A study can evaluate the accuracy of one or more index tests. Evaluating the ability of a medical test to correctly classify patients is typically done by comparing the distribution of the index test results with those of the **reference standard**. The reference standard is the best available method for establishing the presence or absence of the target condition. An accuracy study can rely on one or more reference standards.

If test results are categorized as either positive or negative, the cross tabulation of the index test results against those of the reference standard can be used to estimate the **sensitivity** of the index test (the proportion of participants *with* the target condition who have a positive index test), and its **specificity** (the proportion *without* the target condition who have a negative index test). From this cross tabulation (sometimes referred to

as the contingency or “2x2” table), several other accuracy statistics can be estimated, such as the positive and negative **predictive values** of the test. Confidence intervals around estimates of accuracy can then be calculated to quantify the statistical **precision** of the measurements.

If the index test results can take more than two values, categorization of test results as positive or negative requires a **test positivity cut-off**. When multiple such cut-offs can be defined, authors can report a receiver operating characteristic (ROC) curve which graphically represents the combination of sensitivity and specificity for each possible test positivity cut-off. The **area under the ROC curve** informs in a single numerical value about the overall diagnostic accuracy of the index test.

The **intended use** of a medical test can be diagnosis, screening, staging, monitoring, surveillance, prediction or prognosis. The **clinical role** of a test explains its position relative to existing tests in the clinical pathway. A replacement test, for example, replaces an existing test. A triage test is used before an existing test; an add-on test is used after an existing test.

Besides diagnostic accuracy, several other outcomes and statistics may be relevant in the evaluation of medical tests. Medical tests can also be used to classify patients for purposes other than diagnosis, such as staging or prognosis. The STARD list was not explicitly developed for these other outcomes, statistics, and study types, although most STARD items would still apply.

DEVELOPMENT

This STARD list was released in 2015. The 30 items were identified by an international expert group of methodologists, researchers, and editors. The guiding principle in the development of STARD was to select items that, when reported, would help readers to judge the potential for bias in the study, to appraise the applicability of the study findings and the validity of conclusions and recommendations. The list represents an update of the first version, which was published in 2003.

More information can be found on <http://www.equator-network.org/reporting-guidelines/stard>.

ANEXO 3

UNB - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE BRASÍLIA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Quantificação do DNA de *Mycobacterium leprae* em diferentes camadas da pele: Estudo sobre eliminação transepidérmica, progressão para cura e transmissão.

Pesquisador: Laís Sevilha dos Santos

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 93279318.9.0000.5558

Instituição Proponente: EMPRESA BRASILEIRA DE SERVICOS HOSPITALARES - EBSERH

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.000.480

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de doutorado com foco em hanseníase. A grande pergunta por trás do projeto é se a hanseníase pode ser transmitida por via transepidérmica. A estratégia experimental envolve coletar biópsias de lesões de pacientes com hanseníase para detecção molecular por PCR em tempo real de *Mycobacterium leprae* nos diferentes estratos da pele. Em paralelo, os pesquisadores também pretendem estudar a validade da estratégia de PCR para diagnóstico da doença.

Objetivo da Pesquisa:

Segundo os pesquisadores, o objetivo geral do projeto é:

"Relacionar a quantificação do *Mycobacterium leprae* nas diferentes camadas da pele com a transmissão e a eliminação transepidérmica da hanseníase."

Os objetivos específicos são:

"A. Quantificar o *Mycobacterium leprae* na porção epidérmica, dérmica (superior e inferior) e no subcutâneo de lesões de hanseníase;

B. Testar a acurácia diagnóstica, sensibilidade e especificidade dos testes de biologia molecular (PCR e qPCR) para o diagnóstico da doença;

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-1918 **E-mail:** ceptm@unb.br

Continuação do Parecer: 3.000.460

C. Relacionar a quantificação do bacilo com as características clínicas da hanseníase, período de incubação e resposta ao tratamento; D. Associar a quantificação do bacilo com a eliminação transepidérmica, transmissão e progressão para a cura."

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A pesquisa representa dois principais riscos para os pacientes: 1) riscos inerentes ao procedimento de biópsia e 2) risco de quebra de sigilo dos dados. Em resposta ao parecer anterior, os pesquisadores refizeram o TCLE e deixam claro que cuidarão da manutenção de sigilo. Os pesquisadores também deixaram mais claros e homogêneos os textos que descrevem os riscos relacionados ao procedimento cirúrgico da biópsia. Os pesquisadores também deixaram mais claro as justificativas para a realização da biópsia. Inclusive firmando no TCLE.

Invasivos como a baciloscopia de raspado intradérmico estão disponíveis.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Foram levantadas no parecer anterior três pendências:

- 1 - Refazer o TCLE : o TCLE foi refeito inclusive acrescentando e esclarecendo o objetivo da biópsia.
- 2 - o TCLE explicitou quais serão os motivos e em que momento as biópsias incisionais serão feitas;
- 3 - As análises de risco ficaram mais claras. em todos documentos apresentados.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Após as correções e atendimento das pendências o TCLE, os critérios de inclusão e exclusão, os riscos e benefícios estão adequados e de acordo com as resoluções do sistema CEP/Conep.

Recomendações:

Após análise das respostas às pendências, considera-se que as mesmas foram contempladas e portanto, salvo melhor juízo do colegiado, o parecer é pela aprovação do projeto.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O parecer é pela aprovação do projeto.

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto apreciado na 8ª Reunião Ordinária do CEP-FM-UnB-2018. Após apresentação do parecer do (a) Relator (a), aberta a discussão para os membros do Colegiado. O projeto foi Aprovado.

De acordo com a Resolução 466/2012-CONEP/CNS, itens X.1. - 3.b. e XI. -2.d, este Comitê chama

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina
Bairro: Asa Norte CEP: 70.910-900
UF: DF Município: BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-1918 E-mail: cepfm@unb.br

**UNB - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE BRASÍLIA**



Continuação do Parecer: 3.000.480

a atenção da obrigatoriedade de envio do relatório parcial semestral e final do projeto de pesquisa para o CEP-FM, através de Notificações submetidas pela Plataforma Brasil, contados a partir da data de aprovação do protocolo de pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1121976.pdf	01/10/2018 10:56:10		Aceito
Outros	AOCOMITEDEETICA.pdf	01/10/2018 10:54:34	Laís Sevilha dos Santos	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoDoutoradoV3.pdf	26/09/2018 13:43:20	Laís Sevilha dos Santos	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEv3.pdf	26/09/2018 13:41:36	Laís Sevilha dos Santos	Aceito
Outros	declaracaoresponsabilidade.pdf	09/07/2018 11:28:38	Laís Sevilha dos Santos	Aceito
Outros	cartadeencaminhamento.pdf	09/07/2018 11:27:46	Laís Sevilha dos Santos	Aceito
Outros	LattesVivianeMedeirosSilva.pdf	03/07/2018 11:13:39	Laís Sevilha dos Santos	Aceito
Outros	LattesRaimundaNonataRibeiroSampaio.pdf	03/07/2018 11:12:08	Laís Sevilha dos Santos	Aceito
Outros	LattesCiroMartinsGomes.pdf	03/07/2018 11:11:24	Laís Sevilha dos Santos	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRosto.pdf	03/07/2018 09:51:45	Laís Sevilha dos Santos	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	03/07/2018 09:50:46	Laís Sevilha dos Santos	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	03/07/2018 09:48:11	Laís Sevilha dos Santos	Aceito
Outros	TermodeCencialInstitucional.pdf	03/07/2018 09:44:50	Laís Sevilha dos Santos	Aceito
Outros	TermodeConcordancia.pdf	03/07/2018 09:44:13	Laís Sevilha dos Santos	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina
 Balço: Asa Norte CEP: 70.910-900
 UF: DF Município: BRASÍLIA
 Telefone: (61)3107-1918 E-mail: cepfm@unb.br

UNB - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE BRASÍLIA



Continuação do Parecer: 3.000.480

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BRASÍLIA, 05 de Novembro de 2018

Assinado por:

**Antônio Carlos Rodrigues da Cunha
(Coordenador(a))**

APÊNDICE 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O Sr. (ª) está sendo convidado(a) a participar do projeto de doutorado: **QUANTIFICAÇÃO DO DNA DE *Mycobacterium leprae* EM DIFERENTES CAMADAS DA PELE: ESTUDO SOBRE ELIMINAÇÃO TRANSEPIDÉRMICA, PROGRESSÃO PARA CURA E TRANSMISSÃO**, que será realizado num período estimado de quatro anos na Universidade de Brasília - UNB. O principal objetivo do presente estudo consiste na quantificação relativa do *Mycobacterium leprae* (bacilo de hansen) em lesões de hanseníase nas diferentes camadas da pele do Sr.(ª) com a finalidade de comparar a quantidade de bacilos causadores da hanseníase nas diferentes camadas da pele, com o risco de transmissão da doença. As amostras serão coletadas através de uma biópsia de 0,5 x 0,5cm. Os exames para análise da biópsia serão solicitados ao senhor em duas situações possíveis (o pesquisador indicará ao (à) Sr.(ª), nos quadros abaixo, em qual situação se encontra):

1. No primeiro caso a biópsia já foi indicada por um dos médicos do serviço de dermatologia do Hospital Universitário de Brasília - HUB coletados na rotina laboratorial. Neste caso solicitamos autorização apenas para também processar a amostra de pele coletada nos objetivos desta pesquisa. Separar as camadas da pele e avaliar a quantidade de bacilos. **Informamos que neste caso, a pessoa que indicar a biópsia não poderá ser um médico envolvido nesta pesquisa (lista de pesquisadores abaixo)**. Garantimos aqui que, caso o (à) Sr.(ª) não concorde em ceder parte da amostra para estudo, não haverá prejuízo ao exame indicado ou ao tratamento da doença. Estes seguirão normalmente conforme seu médico indicou.

2. No segundo caso o (a) Sr.(ª) já foi diagnosticado com hanseníase, não necessita de biópsia de pele para o tratamento, mas pode consentir voluntariamente em coletar biópsia somente para o projeto de pesquisa. Garantimos que esta biópsia não é obrigatória e não atrapalhará o tratamento da doença caso o (à) Sr.(ª) não concorde em participar.

Os possíveis benefícios do projeto estão em relacionar a quantidade do bacilo com a gravidade da doença e resposta ao tratamento. Nesta pesquisa todas as amostras passarão pela pesquisa do DNA do bacilo, melhorando ainda a chance de diagnóstico da doença. Sobre os riscos da pesquisa, informamos que a biópsia é um procedimento simples realizado com anestesia local e com duração de alguns minutos, em que um pequeno pedaço da pele é retirado para exame com microscópio. Os riscos inerentes à biópsia não são elevados pela realização da pesquisa nos casos em que o paciente já tem indicação de biópsia e somente vai ceder fragmento para exame (situação 1 descrita acima). Após a realização do exame podem ocorrer pequenos sangramentos, infecção e dor local. Tais eventos são raros e evitáveis pelo acompanhamento médico já realizado. Anafilaxia (alergia medicamentosa grave) é raramente descrita com uso de anestésicos locais. Solicitamos que avise seu médico caso seja portador de alergia à anestesia local. O procedimento será realizado no HUB, hospital com estrutura adequada para reconhecimento e manejo de qualquer complicação. O risco adicional à participação do estudo consiste nos problemas relacionados ao manuseio de amostras laboratoriais como perdas, trocas de exames e erros de processamento. Garantimos que o participante da pesquisa receberá uma via deste termo. Solicitamos ainda a autorização para utilização de todos os resultados de exames já feitos para avaliação em nosso estudo. **Esclarecemos que a participação neste estudo é VOLUNTÁRIA e que este consentimento poderá ser retirado a qualquer momento, sem prejuízos à continuidade do atendimento médico.**

Todos os dados e materiais obtidos serão de responsabilidade da equipe de pesquisa e serão armazenados no laboratório de Dermatômica da Faculdade de Medicina - UNB. Garantimos que não será revelado nome de qualquer participante. Eventuais dúvidas poderão ser sanadas, no telefone 2028-5415 (serviço de Dermatologia) através de contato direto com a equipe de pesquisa. Ao fim da pesquisa, os resultados serão disponibilizados no documento da tese de doutorado da pesquisadora responsável. Os pesquisadores apresentarão o termo somente aos pacientes que comparecerem à sala de biópsia do serviço de dermatologia, não sendo previsto gasto com transporte. Garantimos ainda o cumprimento da indenização cabível diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.

Dados de identificação

Título do projeto: QUANTIFICAÇÃO DO DNA DE *Mycobacterium leprae* EM DIFERENTES CAMADAS DA PELE: ESTUDO SOBRE ELIMINAÇÃO TRANSEPIDÉRMICA, PROGRESSÃO PARA CURA E TRANSMISSÃO.

Lista de pesquisadores envolvidos: Professor Ciro Martins Gomes, Professora Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio, Laís Sevilha Santos

Telefones para contato: (61) 3448-5415.

Endereço: SGAN avenida L2 norte, quadra 605. **Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília -**

CEP/FM-UnB

Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina Faculdade de Ciências Médicas, Campus Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília, Brasília - DF - Brasil. CEP: 70.904-970/ Telefone: (61) 31071947/ email: cepfm@unb.br

Eu, _____, RG nº _____ fui informado e concordo em participar, como voluntário, do projeto de pesquisa acima descrito.

Laís Sevilha dos Santos
RG: 3086405-DF

Brasília, _____ de _____ de _____