



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA
CELULAR

ERIKA VANESSA OLIVEIRA JORGE

**PESQUISA DE HANSENÍASE EM DOADORES DE
SANGUE**

BELÉM - PA

2024

ERIKA VANESSA OLIVEIRA JORGE

**PESQUISA DE HANSENÍASE EM DOADORES DE
SANGUE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Claudio Guedes Salgado.

Co-orientador: Prof. MSc. Maurício Palmeira Koury

BELÉM - PA

2024

ERIKA VANESSA OLIVEIRA JORGE

PESQUISA DE HANSENÍASE EM DOADORES DE SANGUE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Data de aprovação: ___/___/___

Orientação:

Prof. Dr. Claudio Guedes Salgado

Laboratório de Dermato-Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Marituba, Brasil.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Moises Batista da Silva (membro externo)

Laboratório de Dermato-Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Marituba, Brasil.

Prof. Dr. Lacy Cardoso Brito Junior

Laboratório de Patologia Geral, Citologia e Imunopatologia, Instituto de Ciências Biológicas – UFPA

Prof. Dr. Pablo Diego do Carmo Pinto (membro externo)

Laboratório de Genética Humana e Médica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará e Núcleo de Pesquisas em Oncologia, Universidade Federal do Pará, Belém, Brasil.

BELÉM - PA

2024

AGRADECIMENTOS

Assim como a música tem suas notas e os instrumentos harmonizam os arranjos dando vida a uma letra conduzida pela filosofia de alguém, vejo o conhecimento como uma necessidade para compreensão dos fatos acompanhados e vividos da trajetória de alguém. E tudo no final faz parte da sua experiência da vida. E quando pensamos que já sabemos ou conhecemos na verdade somente estaremos terminando ou iniciando uma nova etapa de aprendizagem. Meus sinceros agradecimentos a você, meu “Querido Deus”, que é o autor da minha história.

Aos meus pais: João e Cirene que sempre me incentivaram, dentro de suas possibilidades. Aos meus filhos, Geovane e Débora que foram uma a razão de continuar. A minha amada irmã que dentro de suas habilidades pedagógicas me instruí. A minha tia socorro professora que encerrou a caminhada, mas sempre foi minha “irmã chata”. Ao professor e Claudio que acreditou neste trabalho desenvolvido no hemopa, desde o primeiro momento. Aos professores do LDI/UFPA: Moises, Josafá, Patrícia, Lacy e Pabro em suas respectivas contribuições. Aos alunos e funcionários do LDI/Hemopa/URE Marcello Candia: Mauricio, Raquel, Angelica, Giselle, Ana Cunha, Samela, Silvia, Renata e a todos os envolvidos diretamente e indiretamente.

Agradeço pelos doadores de sangue que participaram desse importante marco de pesquisa, em especial a Crisley. que foi inédita na região norte do Brasil.

Aos projetos de incentivos financeiros para a realização dos testes laboratoriais e logística de fluxos para a realização dos mesmos.

RESUMO

A hanseníase é uma doença infecciosa causada pelo *Mycobacterium leprae*, com transmissão ativa em áreas endêmicas como o Brasil, que registrou mais de 90% dos casos novos de hanseníase das américas no ano de 2021, e o segundo lugar na escala global. Clinicamente é caracterizada pelo aparecimento de lesões nervosas ou cutâneas com alteração de sensibilidade, que podem evoluir para deficiências. Sua transmissão ocorre principalmente pelas gotículas respiratórias de pessoas infectadas, que ainda não receberam tratamento. O diagnóstico da hanseníase é clínico com tratamento multidroga PQT (poliquimioterapia), sendo crucial para evitar a cadeia de transmissão da doença. O atendimento de casos suspeitos deve ser realizado por um profissional habilitado nas unidades básicas e especializadas de saúde, além de serviços de busca ativa. No processo de doação de sangue, embora cuidadosamente regulamentado, riscos imediatos ou tardios podem ocorrer. A hanseníase é considerada uma doença com inaptidão definitiva para doação de sangue. No entanto, a investigação ocorre apenas através de uma entrevista clínica, sem avaliação laboratorial. No Hemocentro do estado do Pará (HEMOPA) foram selecionados 500 doadores para a pesquisa e coletado sangue para investigação sorológica de anticorpos IgM anti-PGL-I. Dos doadores escolhidos, 4% (20/500) tiveram resultados sorológicos positivos maiores ou iguais a 0,750 DO por ELISA, e apenas oito aceitaram ser examinados clinicamente e realizaram outros exames laboratoriais complementares para o diagnóstico da doença, como baciloscopia e qPCR. Destes oito, cinco (62,5%) foram diagnosticados com hanseníase, um na forma clínica primariamente neural, três como borderline-tuberculóide e um virchowiano. No qPCR do sangue periférico foi comprovada a presença do DNA do bacilo em dois indivíduos, este fato pode ser uma possível via de transmissão da doença, ainda a ser esclarecida. Esses achados enfatizam a necessidade crítica de triagem cuidadosa em doadores de sangue, principalmente em regiões endêmicas para a hanseníase, dado o risco potencial de transmissão representado pela presença do *M. leprae* em sangue periférico, inferindo provável presença em bolsas de sangue.

Palavras-chaves: Hanseníase; *Mycobacterium leprae*; Hemocentro; Doadores de sangue; Triagem laboratorial.

ABSTRACT

Hansen's disease (HD) is an infectious disease with active transmission in endemic areas such as Brazil, which accounted for over 90% of the new HD in the Americas in 2021, and the second highest in the global scale. Clinically is characterized by the appearance of nerve or skin lesions with altered sensitivity, that in advanced cases, can cause deformities and physical disabilities. Its transmission occurs mainly through *Mycobacterium leprae*, through respiratory droplets of sick people, and has a prolonged incubation period. The diagnosis of leprosy is clinical, with multidrug treatment PQT (polychemotherapy) being crucial to avoid the chain of disease transmission. Suspected cases should be attended by a qualified professional in basic health units or active case finding campaigns. Although leprosy patient is considered definitively unfit for blood donation process, according to Consolidation regulation nº 5, of October 3, 2017, leprosy investigation occurs only through a clinical interview, without laboratory evaluation. At Hemocenter from Pará, 500 donors were selected for the study and blood was collected for serological investigation of anti-PGL-I antibodies. Of the selected donors, 4% (20/500) had positive serological results greater than or equal to 0,750 optical density among only eight agreed to be clinically examined and underwent other laboratory tests: bacilloscopy and qPCR. Among donors with clinical evaluation, more than half were diagnosed with leprosy, 62.5% (5/8), with the following cases: one individual with the primarily neural clinical form, three with borderline-tuberculoid, one lepromatous. of peripheral blood, the presence of the bacillus in two individuals was confirmed, suggesting a possible route of transmission of the disease. We emphasize that the prevalence of subclinical leprosy infection due to its etiological agent among the study population is very high, but compatible with the hidden prevalence already recorded in the state of Pará.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma do projeto	16
Figura 2 - Etapas do protocolo do ELISA para detecção de anticorpo anti-PGL-I em amostra de plasma sanguíneo	18
Figura 3 - Protocolo para determinação de leitura de Baciloscopia através da coloração de Ziehl-Nielsen (à frio) – (A e B)	19
Figura 4 - Detecção de casos novos entre os doadores inaptos que apresentaram titulação de IgM elevada	22
Figura 5 - Soroprevalência de anticorpos anti-PGL-I entre doadores de sangue	23
Figura 6 - Perfil de produção dos anticorpos anti-PGL-I em doadores	24
Figura 7 - Perfil de produção dos anticorpos anti-PGL-I em contatos intradomiciliares	25

LISTA DE SIGLAS

BAAR: bacilo álcool ácido resistente
BSA: albumina de soro bovino
BB: boderline-boderline
DO: densidade óptica
BT: boderline -tuberculóide
BV: boderline -virchowiano
HPN: hanseníase primariamente neural
IgM: imunoglobulina M
OMS: organização mundial da saúde
PB: Paucibacilar
PBS: tampão fosfato-salino
PBS + T: tampão fosfato-salino com Tween 20
PGL-I: Glicolípido Fenólico – I
SB: solução de bloqueio
SINAN: sistema de informação de agravos de notificação
SL: Solução de lavagem
TA: temperatura ambiente
T: tuberculóide
URE: unidade de referência especializada
V: virchowiano

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	16
3.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO	16
3.3 ENSAIO DE IMUNOABSORÇÃO ENZIMÁTICA (ELISA) PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgM ANTI-PGL-I	18
3.4 IDENTIFICAÇÃO DO <i>Mycobacterium leprae</i>	19
3.4.1 BACIOSCOPIA	19
3.4.2 DETECÇÃO MOLECULAR DA REGIÃO RLEP POR qPCR.....	21
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	21
4. RESULTADOS	21
4.1 CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO DO ESTUDO	21
4.2 SOROPREVALÊNCIA DE ANTICORPOS IgM ANTI-PGL-I.....	23
4.3 IDENTIFICAÇÃO DO <i>Mycobacterium leprae</i>.....	26
5. DISCUSSÃO	27
6. CONCLUSÕES.....	32
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
ANEXO I	38

1. INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença negligenciada e de notificação compulsória e possui uma epidemiologia importante, que vem se mantendo presente na população. É uma doença milenar com características clínicas sistêmicas com ação principalmente em nervos periféricos e pele. O principal agente etiológico é o *Mycobacterium leprae* que é uma bactéria intracelular com estrutura de bacilos retos ou ligeiramente curvado com dimensões que variam de 1-8 µm de comprimento por 0,2-0,5 µm de largura. Sua característica de bacilo álcool ácido resistente (BAAR) é devido sua composição da parede celular espessa em camadas de ácidos micólicos e grande quantidade de lipídios (60 a 70%) (Scollard *et al.*, 2006; Singh e Cole, 2011).

O *M. leprae* pode estar presente em diversos tipos celulares, porém possui predileção por células de Schwann e macrófagos, devido a fatores genéticos e epítomos de ligação que determinam a infectividade do patógeno. Após a entrada da bactéria nas células nervosas, inicia-se um processo inflamatório que, se não cessado, pode resultar em danos decorrentes da resposta imunológica presente no local, podendo evoluir para desmielinização e, conseqüentemente, comprometimento da transmissão dos impulsos nervosos que clinicamente se caracteriza por alteração de sensibilidade tátil, térmica e dolorosa (Brennan e Vissa, 2001; Chavarro-Portillo, Soto e Guerrero, 2019; Singh e Cole, 2011).

A classificação clínica para a doença depende dos sintomas e sinais clínicos apresentados pelo paciente. Alguns indivíduos, classificados como primariamente neural, podem apresentar sintomas iniciais da doença, com a presença da alteração de sensibilidade tátil, térmica e/ou dolorosa em uma região. Mas, dermatologicamente, a maioria dos casos de hanseníase, se caracterizam por apresentar manchas hipocrômicas, eritematosas ou nódulos infiltrados observados na pele. Em 1953, em um congresso em Madri, na Espanha, foi apresentado um modelo de classificação que utilizava os aspectos clínicos, bacteriológicos e de resposta imunológica à reação de Mitsuda para definir a doença em polos tuberculóide e virchowiano, além de formas clínicas intermediárias denominadas borderline (Fernández, 1954).

Os pesquisadores Ridley e Jopling, em 1966, propuseram uma classificação para a doença utilizando parâmetros histopatológicos, bacteriológicos e da resposta imune, dividindo as formas clínicas em polos tuberculóide (T) e virchowiano (V) como formas

clínicas estáveis e polares, em contrapartida o borderline-tuberculóide (BT), borderline-boderline (BB) e borderline-virchowiano (BV) são formas intermediárias e imunologicamente instáveis (Ridley e Jopling, 1966). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), para fins operacionais e facilitar o tratamento, estabeleceu-se a classificação dos indivíduos baseada na presença ou ausência de BAAR no raspado intradérmico, número de lesões e nervos acometidos, subdividindo os pacientes em: paucibacilares que são indivíduos com poucos bacilos e menos de 5 lesões de pele e indivíduos multibacilares que são aqueles que possuem lesões disseminadas pelo corpo devido a presença de muitos bacilos no organismo (Ministério da Saúde, 2016). O tratamento medicamentoso para a doença é caracterizado por esquemas de poliquimioterapia, sendo padronizado que pacientes paucibacilares devam utilizar os antibióticos dapsona 100mg diariamente e rifampicina 600 mg uma vez ao mês por um período de 6 meses. Já os multibacilares devem tratar por 12 meses com dapsona 100 mg e clofazimina 50 mg diariamente, adicionado de uma dose mensal de rifampicina 600 mg e clofazimina 300 mg (“Guidelines for the diagnosis, treatment and prevention of leprosy”, 2018).

Os indivíduos infectados com a doença expõem bacilos pelas vias aéreas superiores, podendo transmitir para outras pessoas susceptíveis, sendo essa a principal via de transmissão da hanseníase. No entanto, fatores associados com a imunidade, genética e nutrição, além da taxa de exposição ao patógeno, são determinantes para a suscetibilidade e/ou resistência do hospedeiro quanto a evolução da patogênese da doença (Pinheiro *et al.*, 2011). Estudos sugerem a possibilidade de transmissão do *M. leprae* também via sanguínea, uma vez que indivíduos sem hanseníase (cl clinicamente diagnosticável) após transplante coração e em outro indivíduo transplante de rim, apresentaram sintomas clínicos para a doença (Bhat e Prakash, 2012; Launius *et al.*, 2004; Shih *et al.*, 2005).

Em 2019, a hanseníase foi reportada em 118 países, sendo 79,01% dos casos notificados concentrados na Índia, no Brasil e na Indonésia (WHO, 2023). Na região das Américas, o Brasil concentra 92,4% (18,314) dos casos notificados, ocupando o segundo lugar entre os países com maior número de casos no mundo. A distribuição da hanseníase no Brasil, ocorre de forma heterogênea, concentrando maior número de casos nos estados: Mato grosso, Maranhão e Pará. A taxa de detecção no estado do Pará em 2019 foi de 29,82/100.000 habitantes, considerada hiperendêmica, indicando a

necessidade de atuação dos serviços de saúde na identificação de novos casos (Ministério da Saúde, 2023). Dados epidemiológicos mais atuais apresentam uma diminuição no número de casos ocasionado pelo impacto nos serviços de saúde em decorrência da pandemia pela covid-19 (Ministério da Saúde, 2023).

Apesar de estratégias e campanhas governamentais serem implantadas para o controle da hanseníase no mundo, existem trabalhos que demonstram indicativos que o número estimado de casos ocultos de hanseníase pode chegar a ser 5 vezes maior que os dados oficialmente registrados, indicando uma alta incidência da doença dispersa de forma oculta na sociedade (Barreto *et al.*, 2011). Ações de busca ativa realizadas no estado do Pará identificaram uma alta endemia oculta após avaliar crianças em escolas. A estratégia se baseou na avaliação neurodermatológica de crianças utilizando-as como um parâmetro direcionador para a identificação de novos casos entre contatos intradomiciliares. Sendo assim, escolares casos tinham em seguida a avaliação dos demais indivíduos que possuíam contato frequente e prolongado com os casos diagnosticados, denominados contatos intradomiciliares ou comunicantes, dos casos de hanseníase (Barreto *et al.*, 2014). A partir dessas ações foi possível fortalecer a hipótese de alto quantitativo de casos de hanseníase dispersos ocultamente na comunidade, fortalecendo a necessidade de se implementar ações de vigilância em saúde em regiões endêmicas para a doença (WHO, 2021).

O diagnóstico precoce da hanseníase enfrenta desafios, especialmente em indivíduos que apresentam poucos sintomas, conhecidos como "oligossintomáticos". Isso pode levar à confusão com outras doenças, como artrose e fibromialgia, contribuindo para o diagnóstico tardio. Assim, os sintomas clássicos só se tornam evidentes mais tarde, sendo a identificação da doença muitas vezes feita através de exames clínicos dermatológicos e neurológicos, focados em encontrar alterações de sensibilidade e/ou comprometimento de nervos periféricos, e também lesões ou áreas de pele com aspectos iniciais da doença, tornando o diagnóstico essencialmente clínico. (Nery *et al.*, 2013).

Laboratorialmente, o diagnóstico da hanseníase, segundo o manual do ministério da saúde, baseia-se na identificação do *M. leprae* em amostras de raspado intradérmico através da baciloscopia ou através do exame de histopatológico de fragmentos de biópsia de pele ou nervo. Apesar das limitações técnicas para a identificação de indivíduos com poucos bacilos, ambos os exames são considerados “padrão ouro”,

fortalecendo a necessidade de desenvolver ou implantar novas ferramentas laboratoriais que contribuam para a identificação de casos de hanseníase. Nesse sentido, outros exames complementares vêm sendo estudados a fim de identificar padrões sorológicos e moleculares entre as formas clínicas da hanseníase que possam ser utilizados para o diagnóstico da doença (Dijk, van *et al.*, 2021; Lima *et al.*, 2022; Silva *et al.*, 2021).

A utilização de testes sorológicos vem demonstrando importância no apoio diagnóstico, especialmente quando avaliamos a resposta contra o anticorpo específico IgM anti-PGL-I, no qual se verifica presença de anticorpos específicos contra o *M. leprae*. Apesar da molécula demonstrar uma alta sensibilidade na detecção de pacientes MB em decorrência da presença de uma grande quantidade de bacilos nas lesões e, conseqüentemente, resultar em altos títulos de anticorpos IgM anti-PGL-I, a identificação dos pacientes PB é muito mais limitada, estando presente somente em 20-40% dos casos, em razão da baixa concentração de bacilos no organismo, influenciando assim na baixa produção de anticorpos anti *M. leprae*. A positividade frente a esse marcador é um indicativo de exposição ao patógeno, podendo direcionar inclusive para a identificação de indivíduos com infecções subclínicas com risco aumentado para desenvolver a infecção. Os anticorpos IgM anti-PGL-I também podem ser detectáveis em uma parcela da população saudável residente de região endêmica mesmo que estes não venham a desenvolver futuramente a doença, limitando ainda mais o uso dessa ferramenta como triagem diagnóstica (Barreto *et al.*, 2014; Geluk, Duthie e Pencer, 2011; Misch *et al.*, 2010).

Além da sorologia, outros exames laboratoriais vêm sendo aplicados como as técnicas de biologia molecular em virtude de sua alta sensibilidade e especificidade. Para fins de pesquisa científica, sua utilização tem contribuído como importante ferramenta complementar ao diagnóstico da infecção pelo *M. leprae*. A reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) utilizando a região alvo RLEP com a identificação da sequência de nucleotídeos conhecida expressa em uma região do *Mycobacterium leprae* de amostras obtidas do raspado intradérmico e/ou sangue têm demonstrado uma positividade relevante, inclusive entre pacientes com baciloscopia negativa ou indivíduos antes de manifestarem os sintomas clínicos da doença (Costa *et al.*, 2023; Turankar *et al.*, 2015).

Os exames laboratoriais complementares são amplamente utilizados em ações de busca ativa (Bernardes Filho *et al.*, 2020; Geluk, Duthie e Pencer, 2011; Lincoln Silva *et al.*, 2021). Nesse sentido o uso dessas ferramentas na investigação de hanseníase em diferentes âmbitos clínicos, tal como no recrutamento de doadores de sangue, se faz necessário no diagnóstico de casos de hanseníase possivelmente presentes nessa amostragem.

A doação de sangue é um processo voluntário que presa pela segurança de pacientes e doadores. Para isso, antes da coleta sanguínea os doadores passam por uma entrevista clínica em que é realizada a investigação por anamnese para admissão de doadores. Nesse questionário, caso o indivíduo apresente alguma alteração temporária que possa interferir na qualidade do hemocomponente, o doador é considerado como inapto temporário ou definitivo. Entretanto, se o indivíduo apresentar ou tiver desenvolvido anteriormente patologias sistêmicas, tal como a hanseníase, este será considerado inapto definitivo, não podendo doar sangue em nenhum outro momento (ANEXO 1).

Após a coleta de sangue, essas amostras passam por um processo de testagens laboratoriais para algumas doenças (Ex.: HIV I/II, HTLV I/II, doença de chagas, hepatites e sífilis) antes da bolsa de sangue ser efetivamente liberada para transfusão sanguínea. Com isso, a investigação laboratorial da hanseníase em banco de sangue se faz necessária para a garantia da segurança transfusional. Estratégias de busca ativa em serviços de saúde como banco de sangue, pode contribuir também para a quebra da cadeia de transmissão da hanseníase (Foss, Callera e Alberto, 1993; Goulart *et al.*, 2015). Embora a hanseníase esteja listada na Portaria de Consolidação nº 5, de 28 de setembro de 2017, como uma das doenças que levam à inaptidão definitiva para doação de sangue, ela somente é investigada através da anamnese, não havendo investigação na triagem laboratorial e/ou clínica antes da doação de sangue (Goulart *et al.*, 2015).

Crianças menores de 15 anos, com sintomas clínicos de hanseníase são indicadores epidemiológicos utilizados para reconhecer a dispersão da hanseníase em uma localidade, pois a doença em pessoas em menores de 15 anos confirma a existência de focos ativos de transmissão do *M. leprae*, principalmente em parentes que compartilham um mesmo ambiente, chamado de contato intradomiciliar (Sales *et al.*, 2011). A busca ativa de casos novos, especialmente entre contatos intradomiciliares, é

uma estratégia para a detecção dos doentes no início das manifestações clínica e dos possíveis focos de transmissão da hanseníase (Barreto *et al.*, 2012).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Pesquisar casos de hanseníase em doadores de sangue inaptos do Hemocentro Coordenador do Estado do Pará (HEMOPA) de 2019 a 2022.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Testar amostras de sangue de doadores de sangue do HEMOPA para anticorpos IgM anti-PGL-I.
2. Avaliar clinicamente e com exames laboratoriais doadores de sangue que apresentem titulações altas para o anticorpo IgM anti-PGL-I.
3. Analisar a presença do bacilo pela detecção de bacilos álcool ácido resistentes (BAAR) no raspado intradérmico e pela amplificação da região RLEP do *M. leprae* em amostras de raspado intradérmico e no sangue de doadores selecionados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este trabalho obedeceu aos aspectos éticos preconizados pela declaração de Helsinque e legislação em vigor, sendo avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará, sob CAAE 34990920.5.0000.0018 e parecer número 4188123. Todos os participantes do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

3.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO

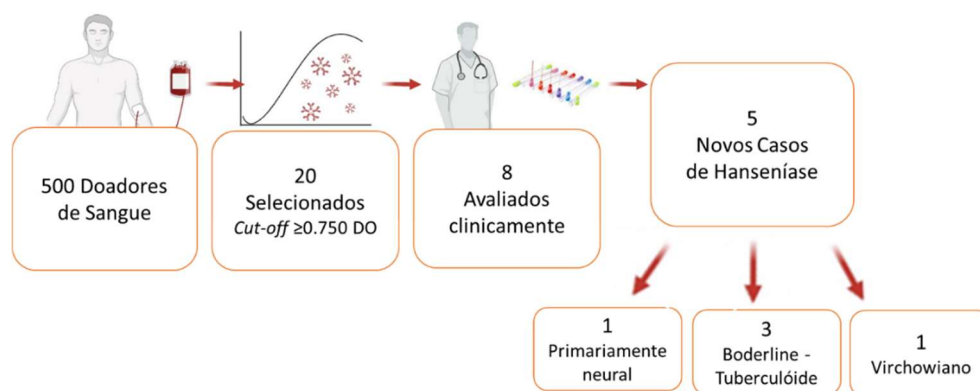
No período de 2019 a 2022 foram selecionados aleatoriamente 500 doadores de sangue no Hemocentro Coordenador do Estado do Pará (HEMOPA) durante o processo de convocação médica para investigação de doenças infecciosas (AIDS, Sífilis, doenças de chagas, Hepatite B e C, HTLV I/II). Os indivíduos considerados inaptos temporários para doação de sangue foram em um segundo momento, convidados para participação

do projeto de investigação de hanseníase, sendo aplicado o TCLE para aqueles que aceitaram participar do estudo.

Após explicação da pesquisa, os participantes do estudo seguiram para uma coleta de sangue periférico para avaliação da titulação de anticorpos IgM anti-PGL-I, sendo que os indivíduos selecionados para o estudo foram direcionados para uma avaliação clínica neuro dermatológica e laboratorial com uma equipe multiprofissional para investigação mais detalhada de hanseníase.

As avaliações clínicas e laboratoriais foram realizadas na Unidade de Referência (URE) em Dermatologia Sanitária do Estado do Pará “Dr. Marcello Candia” onde foram coletados material de raspado intradérmico de ambos os lóbulos auriculares para exames de biologia molecular e ambos os lóbulos auriculares e ambos os cotovelos e/ou lesão suspeita para exame de baciloscopia. A **figura 1** apresenta o fluxograma do trabalho, que consistiu nas seguintes etapas: os doadores de sangue identificados como inaptos temporários foram convidados para participação do estudo, onde foi aplicado o termo de consentimento livre e esclarecido e em seguida foi coletado o sangue periférico para a triagem sorológica anti-PGL-I, no qual todos com sorologia igual ou maior que 0,750 de densidade óptica foram selecionados para avaliação clínica neurodermatológica e testes laboratoriais de identificação do *M. leprae*. Os doadores confirmados como casos novos de hanseníase foram notificados no SINAN e tratados de acordo com o protocolo do Ministério da Saúde. Foram excluídos os indivíduos que se recusaram a participar da pesquisa e aqueles cujas amostras encontraram-se hemolisadas após o processo de centrifugação.

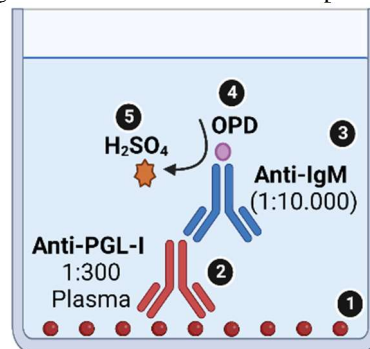
Figura 2 - Fluxograma do projeto: Doadores de sangue inaptos (N=500 doadores), seleção sorológica considerando o *cut-off* de 0,750 DO (N=20 doadores), avaliação clínica (N=8 doadores) e diagnóstico de caso novo de hanseníase (N=5 doadores). Casos de doadores com hanseníase: 1 neural pura, 3 borderline-tuberculóide e 1 virchowiano.



3.3 ENSAIO DE IMUNOABSORÇÃO ENZIMÁTICA (ELISA) PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgM ANTI-PGL-I

O ensaio foi realizado conforme previamente estabelecido (Gobbo *et al.*, 2022). Resumidamente, foram coletadas amostras de sangue em E.D.T.A. (K3) e realizado o método ELISA *in house* utilizando microplacas com fundo “L” de 96 poços (Immulon®, USA) que foram sensibilizadas com 50ng/50µL de solução de carbonato/bicarbonato de sódio com o antígeno sintético ND-O-BSA para cada poço sensibilizado. Nesta etapa de sensibilização foi utilizado duplicata para cada indivíduo para garantir a reprodutibilidade do teste e aplicada de 12-24 horas antes do teste. Após três etapas de lavagens com a solução de lavagem (SL) = PBS 1X + 0,05% Tween-20, foram bloqueados todos os poços com solução de bloqueio (SB) = solução salina tamponada (PBS - pH 7.2) com 1% de albumina de soro humano (BSA) e 0,05% de Tween-20 (T) e incubado por 1h a temperatura ambiente (TA). Em seguida, as amostras de plasma foram diluídas 1:300 em SB no poço sem sensibilização, chamado de branco, e transferido 100µL essa diluição para as duplicatas sensibilizadas por um período de incubação de 2h. O anticorpo secundário anti-humano IgM conjugado com a peroxidase foi utilizado após 3 etapas de lavagens, para a detecção dos anticorpos anti-ND-O-BSA na concentração de 1:10.000 diluído em SL e incubado por 1h e 30 min. Após 3 etapas de lavagens, foi adicionado o substrato colorimétrico (o-phenylenediaminedihydrochloride SIGMA FASTTM OPD, Sigma-Aldrich P9187, USA) diluído em água ultrapura e pipetado em todos os poços por 15 min. Por fim, foram adicionados 50µl de solução de parada (H2SO4 4N) em todos os poços, que neutraliza a reação. Em síntese, a **figura 2** resume as seguintes etapas: **(1)** Sensibilização do antígeno ND-O-BSA fixando-se na placa, **(2)** Adição de amostra e ligação específica de anticorpos anti-PGL-I presente no plasma sanguíneo, **(3)** Adição do anticorpo secundário ligado com a enzima peroxidase, **(4)** Reação ao cromógeno OPD com a enzima alterando a cor da solução **(5)**. Finalização, com a adição da solução de ácido sulfúrico 4N.

Figura 2 - Etapas do protocolo do ELISA para detecção de Anticorpo IgM anti-PGL-I em amostra de plasma sanguíneo.



Fonte: LDI-UFPA.

Foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 490 nm, o resultado foi obtido através do cálculo da média das duplicatas das densidades ópticas (DO) menos o valor do branco da amostra. Conforme previamente publicado (Gobbo *et al.*, 2022), são consideradas positivas as amostras com $DO \geq 0,295$, entretanto, com o objetivo de melhor selecionar indivíduos com risco aumentado de desenvolver a doença, o presente trabalho utilizou como triagem sorológica um *cut-off* arbitrário de 0,750 que representa cerca de 2,5 vezes a mais que o *cut-off* padrão (0,295), estabelecido a partir de resultados identificados em ações de busca ativa no município de mosqueiro, no qual entre os indivíduos que foram casos e seus respectivos resultados sorológico anti-PGLI.

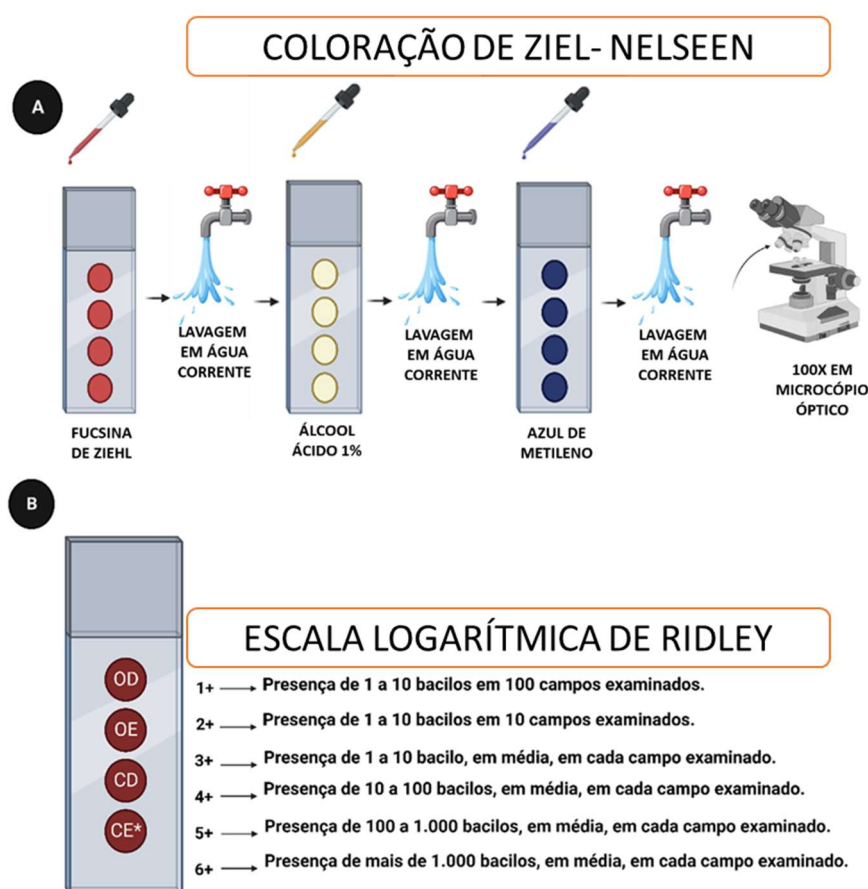
3.4 IDENTIFICAÇÃO DO *Mycobacterium leprae*

3.4.1 BACILOSCOPIA

Para a detecção do *M. leprae* foi realizada a técnica de baciloscopia, no qual é realizada a partir da leitura microscopia óptico, campo claro com lente de aumento de 100 vezes. O material utilizado é o raspado intradérmico de ambos os lóbulos auriculares, cotovelo direito, cotovelo esquerdo ou lesão alvo (se houver), fixado em lâmina de microscopia seguida por coloração de Ziehl-Nielsen à frio, conforme preconizado pelo Ministério da Saúde. A técnica baseia-se na adição do corante de fucsina de Ziehl que, após incubação, deve passar por etapas de lavagens até a retirada do excesso de corante. Em seguida, descoloração utilizando o álcool ácido a 1%, posteriormente aplicando o azul de metileno para fins de corante de fundo para que resíduos celulares que não o *M. leprae* fiquem corados em azul. A **figura 3A** demonstra

essa etapa: a adição da solução fucsina, após o tempo de incubação etapas de lavagens e em seguida descoloração com álcool ácido 1% e por último aplicado o azul de metileno como corante contraste. Ao final dessa coloração verifica-se o bacilo da hanseníase, álcool ácido resistente (BAAR), permanecem corados em vermelho “fúcsia”. Para a leitura da lâmina é realizada em microscopia óptica, com objetiva em aumento de 100 vezes, e a determinação da quantificação da baciloscopia é determinada através da escala logarítmica de Ridley. A **figura 3B** apresenta a escala logarítmica de Ridley. Parâmetro utilizado para a quantificação dos bacilos de *M. leprae* por microscopia nas áreas da orelha direita (OD), orelha esquerda (OE), cotovelo direito (CD) e cotovelo esquerdo (CE) ou lesão suspeita solicitada pelo médico (*).

Figura 3 - Protocolo para determinação de leitura de Baciloscopia através da coloração de Ziehl-Nielsen (à frio) – (A e B)



Fonte: LDI-UFPA.

3.4.2 DETECÇÃO MOLECULAR DA REGIÃO RLEP POR qPCR

A extração do DNA total das amostras de raspado intradérmico e sangue total seguiu as recomendações do kit Qiagen Blood & Tissue DNA (Qiagen – Alemanha). Em resumo, a amostra do raspado dérmico foi obtida de cada um dos lóbulos auriculares e colocada em um único tubo eppendorf de 1,5 ml com álcool a 70°, seguida por uma etapa de incubação em tampão por 12 horas para melhor obtenção do material genômico. Foi realizada a PCR em tempo real para amplificação da região RLEP do genoma de *M. leprae*, que é específica para a bactéria, utilizando os pares de primers LP1 (5'-TGCATGTCATGGCCTTGAGG -3') e LP2 (5'-CACCGATAACCAGCGGCAGAA-3') já descrita previamente (Lima *et al.*, 2022; Silva *et al.*, 2021). Foi estabelecido como resultados positivos as amostras que amplificarem até 45 ciclos de *Ct* (cycle threshold), tendo sido utilizando a marcador fluorescente SyBr green.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Aplicamos inicialmente a estatística descritiva para caracterizar a amostra estudada, identificando as medidas de tendência central (média e mediana) e dispersão (desvio padrão, além da amplitude, máximo e mínimo).

Em seguida, aplicamos o teste de Shapiro-Wilk para avaliar a normalidade da distribuição dos títulos de anticorpos IgM anti-PGL-I e do *Ct* da qPCR para o gene RLEP. Após a confirmação de que estes resultados seguem uma tendência não-gaussiana (não normal), o teste U de Mann-Whitney foi utilizado para analisar a dispersão dos anticorpos anti-PGL-I, sendo considerado significativamente estatístico quando $p < 0,05$. Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando-se o software GraphPad Prism 6.0.

4. RESULTADOS

4.1 CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO DO ESTUDO

Para avaliar a presença de anticorpos IgM anti-PGL-I em doadores de sangue, foram testados sorologicamente 500 indivíduos que tiveram suas bolsas de sangue descartadas em virtude da presença de algum fator de inaptidão temporária nos testes de laboratório realizados na fundação HEMOPA. Este número corresponde a aproximadamente 18% do total de indivíduos inaptos por ano na captação de doador de

sangue. Em 2019, de 94.445 bolsas coletadas, 2.842 (3,01%) foram descartadas em razão de alguma inaptidão sorológica. Estes números se mantiveram estáveis nos anos seguintes, chegando em 2023 a 2.742 bolsas descartadas (2,75%), de um total de 99.756 bolsas coletadas no estado do Pará.

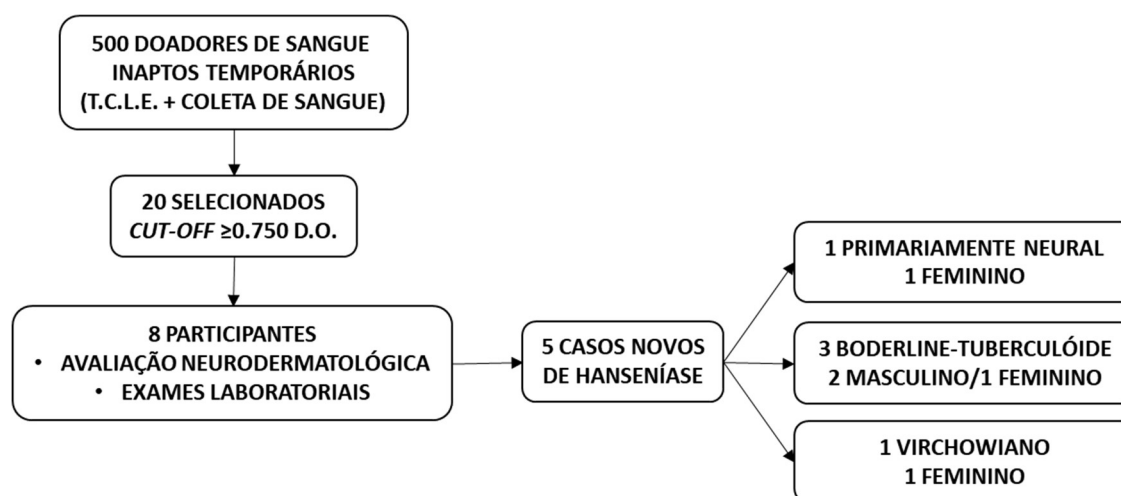
Das 500 pessoas que participaram do estudo, 251 (50,2%) eram do sexo masculino, e 171 (34,2%) do sexo feminino, e 78 (15,6%) estavam sem a informação. A média de idade foi de 38 anos, com o máximo de 68 e o mínimo de 18. Quanto ao endereço, 297 (59,4%) informaram morar em Belém, 80 (16,0%) em Ananindeua, 21 (4,2%) em Marituba, 19 (3,8%) em outros municípios, e 83 (16,6%) estavam sem o endereço do doador na planilha do estudo.

Em relação à inaptidão sorológica, a principal causa foi a presença de soro lipêmico, afetando 116 (23,2%) indivíduos. Em seguida, 93 (18,6%) apresentaram resultado positivo para VDRL, 76 (15,2%) para hepatite B, 46 (9,2%) para HIV, 32 (6,4%) para hepatite C, 20 (4,0%) para HTLV, 10 (2,0%) para doença de Chagas e 7 (1,4%) para anemia. Além disso, 12 pessoas foram consideradas inaptas por apresentarem mais de um destes testes com resultado positivo, enquanto em 88 (17,6%) não continham informações sobre a razão da inaptidão sorológica.

Os indivíduos que apresentaram resultado de IgM anti-PGL-I com DO acima ou igual a 0,750 ($n = 20$) foram convidados para a realização de um exame neurodermatológico com a equipe multiprofissional de hanseníase. Aqueles diagnosticados como casos de hanseníase foram classificados como sendo multibacilares, correspondendo às formas clínicas primariamente neural (1) BT (3) e V (1).

Na **figura 4** é possível ver as etapas para a detecção desses casos novos entre os doadores inaptos que apresentaram titulação de IgM anti-PGL-I elevada. Do total de 500 doadores de sangue inaptos temporariamente, 20/500 (4,0%) indivíduos apresentaram sorologia maior ou igual a 0,750 de densidade óptica, oito concordaram em participar da avaliação neurodermatológica, e 5 indivíduos foram diagnosticados como novo caso de hanseníase, dois do sexo masculino e 3 do sexo feminino, todos residentes do município de Ananindeua, no estado do Pará. Em relação à deficiência ocasionada pela hanseníase, dois pacientes BT e um com hanseníase primariamente neural não apresentaram deficiências, enquanto os demais, BT e V, foram classificados como grau 1.

Figura 4 - Detecção de casos novos entre os doadores inaptos que apresentaram titulação de IgM elevada.



Fonte: autoria própria

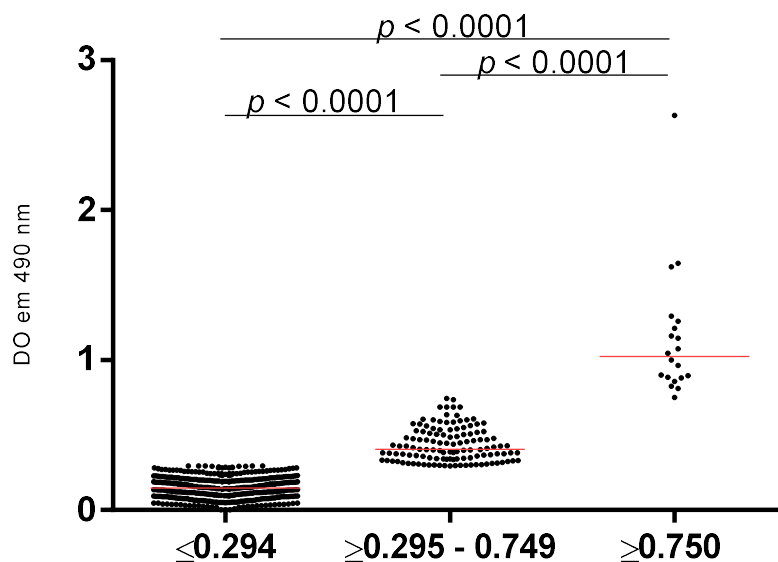
4.2 SOROPREVALÊNCIA DE ANTICORPOS IgM ANTI-PGL-I

Para analisar a soroprevalência da hanseníase, baseado na capacidade da resposta imune humoral dos doadores de sangue participantes do projeto, foram quantificados os anticorpos IgM anti-PGL-I das 500 amostras de plasma coletadas. Foi verificada uma soroprevalência elevada entre os indivíduos estudados considerados saudáveis para doação de sangue, permitindo que estes posteriormente se tornassem aptos à doação novamente. Do total de amostras analisadas 28,2% (141/500) foram soropositivas para o IgM anti-PGL-I, utilizando o *cut-off* padrão de 0,295 de DO. Com a finalidade de melhor conduzir para uma avaliação clínica, foi considerado o *cut-off* arbitrário de 0,750 de DO, revelando 4% (20/500) de soropositivos com alta titulação de anticorpos.

Avaliando a população do estudo, houve diferença estatística entre os grupos de soronegativos (<0,295 DO), soropositivos (≥0,295-0.749) e soropositivos altos (≥0,750 DO), fortalecendo a hipótese de que os indivíduos soropositivos altos apresentam uma maior exposição ao *M. leprae* e, por isso, torna importante a avaliação clínica neurodermatológica. A **figura 5** apresenta o quadro de soroprevalência de IgM anti-PGL-I entre doadores de sangue. Soronegativos com resultados menores ou iguais a

0,294 DO; soropositivos com valores maior ou igual a 0,295 DO e soropositivos altos com valores maiores que 0,750 DO

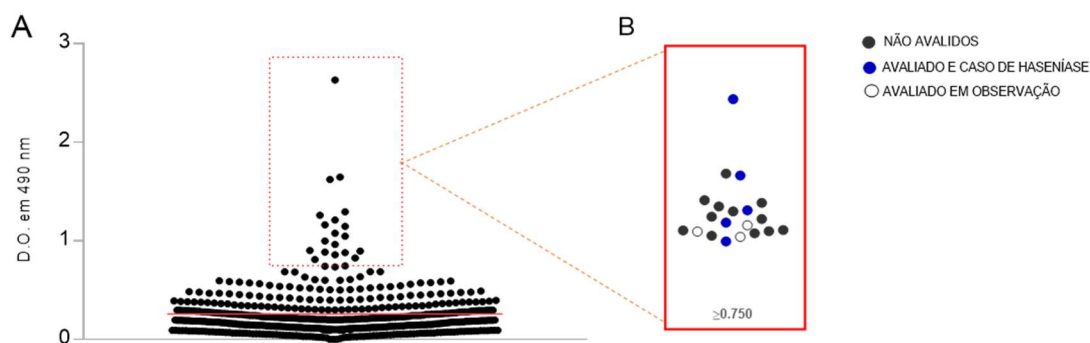
Figura 5. Soroprevalência de anticorpos IgM anti-PGL-I entre doadores de sangue.



Fonte: autoria própria

Entre a população de doadores, os indivíduos com altos níveis sorológicos ($\text{cut-off} \geq 0,750$ DO) se diferenciam da maioria devido ao perfil de produção de anticorpos anti-PGL-I, indicando maior exposição ao *M. leprae*. Com base nesse cut-off , esses valores sorológicos podem auxiliar na triagem para a detecção precoce de novos casos, já que os indivíduos identificados não buscavam tratamento para hanseníase e eram considerados como não portadores da doença. A figura 6 apresenta a dispersão de anticorpos anti-PGL-I da população geral do estudo ($n=500$) (A) e destacando o perfil de dispersão dos soropositivos altos cut-off maior que 0,750 DO em (B), classificando de forma individual entre indivíduos não avaliados, (círculo preto) e avaliados classificados como casos de hanseníase (círculo azul), em observação (círculo branco).

Figura 6 - Perfil de produção dos anticorpos anti-PGL-I em doadores de sangue.



Fonte: autoria própria

Do total de soropositivos com alta titulação de anticorpos IgM anti-PGL-I avaliados clinicamente ($n = 8$), foi solicitado que os indivíduos que residissem na mesma casa também realizassem a avaliação neurodermatológica com a equipe multiprofissional do projeto, com isso, foram avaliados 22 indivíduos dentre os contatos intradomiciliares de doadores de sangue, e 63,6% (14/22) foram diagnosticados como casos novos de hanseníase. A maioria (13/14) dos contatos intradomiciliares diagnosticados também foram classificados como multibacilares, na forma clínica BT, sendo um único caso novo pertencente a forma clínica indeterminada. Outros 4 contatos intradomiciliares ficaram em observação por apresentarem sinais e sintomas inconclusivos e 4 contatos intradomiciliares não apresentaram sinais de atividade da doença (**Tabela 1**).

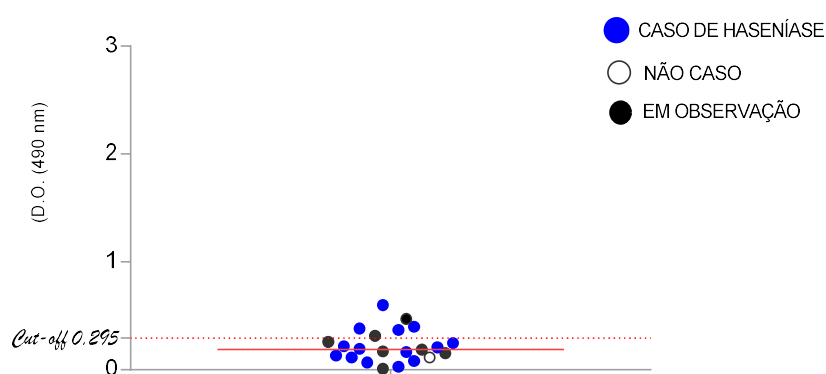
Tabela 1- Avaliação de contato de doadores de sangue caso e não caso de hanseníase. Quantitativo de contatos avaliados por doador e classificação da forma clínica apresentada pelos contatos intradomiciliares diagnosticados como casos novos de hanseníase.

	DOADORES DE SANGUE	CONTATOS DOS DOADORES AVALIADOS	Nº DE CASOS DE HANSENÍASE	FORMA CLÍNICA
CASOS NOVOS DE HANSENÍASE	1	5	4	4BT
	2	5	3	3BT
	3	9	5	4BT/1I
	4	0	0	-
	5	0	0	-
NÃO CASOS	6	0	0	-
	7	3	2	3BT
	8	0	0	-
TOTAL DE CONTATOS		22	14	-

Foi observado que a maioria dos contatos de doadores avaliados tiveram sorologia para anticorpos IgM anti-PGL-I compatível com os resultados sorológicos

encontrado na população em geral, com mediana de 0,210 e DO máxima de 0,602, apresentando uma soropositividade de 27,3% (6/22) para o *cut-off* de 0,295 de DO. Tal como observamos para os casos advindos dos doadores, os contatos intradomiciliares também exibiram perfil sorológico semelhante entre casos e não casos ($p=0.3191$), fortalecendo que o diagnóstico nessa população também ocorreu ainda no início das manifestações clínicas da doença. Na **figura 7** demonstra-se o Perfil de produção dos anticorpos anti-PGL-I em contatos intradomiciliares e a dispersão de anticorpos anti-PGL-I da população dos contatos intradomiciliares de doadores de sangue em relação a avaliação clínica (n=22).

Figura 7 - Perfil de produção dos anticorpos anti-PGL-I em contatos intradomiciliares



Fonte: autoria própria

4.3 IDENTIFICAÇÃO DO *Mycobacterium leprae*

A fim de fazermos a avaliação do perfil de detecção do *M. leprae* na população do estudo, nós realizamos os testes de baciloscopia e qPCR para o gene RLEP. Foi realizada a baciloscopia em todos os doadores de sangue avaliados clinicamente (n=8), uma vez que é considerado o teste laboratorial mais utilizado pelos serviços de saúde, no diagnóstico da hanseníase. Apenas 25,0% (2/8) dos doadores avaliados clinicamente obtiveram positividade na baciloscopia, com índices bacilares de 0.5 e 5.0 e nos contatos intradomiciliares de doadores somente 2 indivíduos (9,1%) tiveram resultado positivo na baciloscopia entre os 22 avaliados.

Tabela 2. Características clínicas da população dos doadores casos de hanseníase. Variáveis de sexo, tipos de forma clínica, baciloscopia e grau de incapacidade física.

Abreviações: Hanseníase primariamente neural (HPN); borderline-tuberculóide (BT); Virchowiano (V) e Índice bacilar (IB).

DOADOR CASO DE HANSENÍASE	SEXO	FORMA CLÍNICA	BACILOSCOPIA	IB	GRAU DE INCAPACIDADE FÍSICA
1	FEMININO	BT	NEGATIVA	N/A	1
2	MASCULINO	BT	POSITIVO	0,5	1
3	FEMININO	V	POSITIVO	5	1
4	MASCULINO	BT	NEGATIVO	N/A	0
5	FEMININO	HPN	NEGATIVO	N/A	0

Para a detecção molecular do *M. leprae* foi realizada a qPCR das amostras de sangue e raspado intradérmico, onde 37% (3/8) dos doadores avaliados clinicamente apresentaram positividade nas amostras de raspado intradérmico e 25% (2/8) foram positivos no sangue periférico, sendo que o duplo positivo foi de uma doadora que estava em observação clínica, ou seja, oligossintomática para o diagnóstico clínico da hanseníase no momento da consulta médica. Avaliando especificamente os doadores que se tornaram casos novos, 66,6% (2/3) foi positiva para a qPCR RLEP das amostras de raspado intradérmico. Conforme **Tabela 3**.

Tabela 3. Resultados de PCR e respectivos CT nos doadores de sangue casos de hanseníase.

Doadores de sangue	Amostras de sangue		Amostras de raspado intradérmico	
	Resultado	Ct	Resultado	Ct
1	Negativo	0	Negativo	0
2	Negativo	0	Não realizado	-
3	Positivo	39,71	Positivo	32
4	Negativo	0	Positivo	32,18
5	Positivo	42,16	Positivo	40,95

5. DISCUSSÃO

Apesar da prática de seleção para doação de sangue ser realizada de forma criteriosa e segura, toda transfusão de sangue pode trazer riscos para o paciente. Estes riscos podem ser imediatos e tardios de acordo com critérios de classificação da portaria vigente (Goulart *et al.*, 2015; Martins *et al.*, 2013; Taira *et al.*, 2013). Durante o

processamento do sangue são realizadas investigações laboratoriais para algumas doenças infecciosas que podem ser transmissíveis pelo sangue como: HIV, HTLV, sífilis e hepatites. No entanto, a hanseníase não está entre essas doenças investigadas laboratorialmente, sendo realizado somente um questionário de triagem de doenças inaptas definitivas para doação, no qual a hanseníase está inserida entre elas.

Caso o doador se autodeclare estar fazendo ou ter feito tratamento para hanseníase, ele será excluído definitivamente para doação. Neste contexto, indivíduos com hanseníase que nunca fizeram tratamento e oligo ou assintomáticos para a doença podem realizar doação de sangue. Alguns relatos de outras doenças infecciosas transmitidas pelo sangue já foram comprovadas em pacientes que adquiriram após a transfusão sanguínea, reforçando a necessidade garantir a qualidade do sangue e a segurança transfusional, investigando outras doenças, principalmente em áreas endêmicas para a doença de interesse (Bihl *et al.*, 2007; Taira *et al.*, 2013).

Trabalhos de pesquisa em hanseníase já foram realizados em outros bancos de sangue. Em 2015, o Hemocentro de Minas Gerais- HEMOMINAS utilizou como ferramentas laboratoriais a sorologia anti-PGL-I e a biologia molecular, no qual encontrou 3,8% (38/1007) e 0,3% (3/1007) respectivamente de positividade para esses parâmetros, além de ainda identificarem 5 casos novos de hanseníase entre os doadores de sangue. Em outro estudo anterior, em 1993, em Ribeirão Preto, já utilizando também a sorologia anti-PGL-I, verificou-se uma soropositividade para o *M. leprae* de 3% (10/324), contudo, não foram diagnosticados casos novos de hanseníase entre os doadores de sangue (Foss, Callera e Alberto, 1993). A intenção de pesquisar hanseníase entre doadores de sangue, vem reforçando a hipótese de que a infecção assintomática entre doadores de sangue pode ser também um modo de transmissão da hanseníase por transfusão sanguínea, uma vez que foi encontrado no teste molecular a presença do DNA do bacilo no sangue e no raspado intradérmico em nossos dados, e anteriormente, na pesquisa realizada no HEMOMINAS (Goulart *et al.*, 2015).

Nesse trabalho, participaram 500 doadores de sangue, no qual foi utilizado a sorologia anti-PGL-I, pelo qual foi aplicado o *cut-off* arbitrário com objetivo de direcionar possíveis doadores com hanseníase. Nesses foram encontrados: 5 novos casos de hanseníase, equivalente à 62,5% (5/8) entre os doadores avaliados clinicamente. Um dado preocupante é o fato de que faltaram ser avaliados 60% (12/20) dos indivíduos

com sorologia anti-PGL-I alta, os quais não compareceram ou se recusaram a consulta médica para avaliação clínica. Considerando a alta prevalência de casos entre os indivíduos com sorologia alta avaliados clinicamente ($n = 5/8$), acreditamos que esse grupo pode ainda estar habilitado para doação de sangue e possivelmente os seus produtos sanguíneos coletados para doação podem estar com a presença do *M. leprae*.

O anticorpo IgM anti-PGL-I é marcador de infecção específico para hanseníase. Em indivíduos com alta positividade sorológica, o risco de adoecimento é maior, sua utilização pode direcionar pessoas com maior disposição de adoecimento ou já doentes (Barreto *et al.*, 2011). Considerando isso, este teste laboratorial vem sendo utilizado mundialmente nos serviços de saúde e em trabalhos de pesquisas. No Pará, é realizado no Laboratório de Dermato-Imunologia da Universidade Federal do Pará, principalmente para as pessoas atingidas pela hanseníase que são atendidas na Unidade de Referência Especializada em Dermatologia Sanitária “Dr. Marcello Candia”, única referência do estado do Pará para a hanseníase, com finalidade de acompanhar o tratamento e complementar o diagnóstico dos casos de hanseníase, bem como seus contatos intradomiciliares.

A probabilidade de adoecimento entre os positivos sorológicos é de 2,5 vezes maior se comparado com pessoas com sorologia negativas (Barreto *et al.*, 2015). Em áreas endêmicas, a utilização da sorologia em associação com parâmetros moleculares, podem ser de grande utilidade para o diagnóstico de casos iniciais da hanseníase, auxiliando no entendimento da prevalência oculta da hanseníase, além de auxiliar na interrupção da cadeia de transmissão da doença.

Apesar da transmissão da hanseníase ocorrer pelas vias aéreas superiores, estudos demonstram a existência do bacilo na natureza como em solo, cistos amebianos presentes na água e em animais silvestres, estes achados sugerem outra possível via de transmissão da doença da hanseníase (Reis *et al.*, 2014; Silva, da *et al.*, 2018). Além disso, foram comprovados casos de transmissão da hanseníase por transplantes de órgãos em indivíduos submetidos a enxertos cardíaco e renal (Launius *et al.*, 2004; Shih *et al.*, 2005).

A disseminação do *M. leprae* é potencializada entre indivíduos multibacilares que mantem contato íntimo e prolongado com pessoas do seu convívio diário, chamado

de contatos intradomiciliares, e a alta carga bacilar está associada com soropositividade da titulação de anticorpos anti-PGL-I (Barreto *et al.*, 2011). Este exame é uma importante ferramenta para direcionar as avaliações em busca de novos casos da doença. Foi verificado nos contatos de doadores de sangue examinados para hanseníase a circulação do *M. leprae* entre as pessoas deste convívio, mesmo que não tivessem uma alta sorologia, e 63% (14/22) foram novos casos diagnosticados. Mesmo em um doador com altos títulos sorológicos para a IgM anti-PGL-I, que não foi diagnosticado como caso novo de hanseníase, foram encontrados casos novos entre seus contatos. Este fato ressalta que a utilização de exames sorológicos, como a detecção e quantificação de IgM anti-PGL-I, constituem importantes ferramentas laboratoriais para investigar ou direcionar possíveis novos casos na comunidade. Conforme a **figura 6**, verificamos que a alta soropositividade entre os doadores avaliados, sinaliza um grupo de indivíduos clinicamente doentes em fase inicial dos sinais e sintomas da hanseníase, ou mesmo contatos de casos de hanseníase ainda não diagnosticados.

Estudos sugerem a transmissão pelo sangue. Há registros de hanseníase em gêmeos após uma transfusão de sangue de um paciente LL na década de 1960 (Terencio de las Aguas, 1967). O *M. leprae* foi isolado do sangue de pacientes com hanseníase na década de 1970, mostrando-se viável e capaz de crescer em camundongos no coxim plantar (Drutz, O'Neill e Levy, 1974; Manja *et al.*, 1972). É importante enfatizar que 2/5 (40,0%) testaram positivo na qPCR para amostras de sangue, sendo, portanto, potencialmente capazes de transmissão pelo sangue, como observado no caso dos gêmeos infectados após a transfusão na década de 1960, e é uma das hipóteses para pacientes diagnosticados com hanseníase após transplantes (Ardalan *et al.*, 2011; Gasink *et al.*, 2006; Launius *et al.*, 2004; Pieroni *et al.*, 2007; Shih *et al.*, 2005; Trindade *et al.*, 2011), facilitada pela imunossupressão.

As aplicações de medidas estratégicas objetivam maior segurança transfusional e o controle da hanseníase, fortalecendo maior atuação do governo e de vínculos com parcerias estatais e não estatais, assegurando compromisso político e recursos para implantação de programas de combate a hanseníase, colaborando para uma maior cobertura de assistência à saúde de doadores oligo ou assintomáticos para a doença, principalmente em áreas de maior incidência da hanseníase, como no estado do Pará (Barreto *et al.*, 2011).

Considerando a alta endemicidade de casos de hanseníase no estado do Pará, torna-se necessária uma melhor investigação clínica e laboratorial durante a triagem no processo de doação. No melhor do nosso conhecimento, até onde pudemos verificar, este é primeiro trabalho realizado em amostras de doadores de sangue no estado do Pará, classificado como hiperendêmico (> 40 casos / 100.000 habitantes), com análise de amostras de sangue de doadores assintomáticos e aptos na triagem clínica do HEMOPA, apesar de inaptos na triagem laboratorial, em razão de outros parâmetros laboratoriais não relacionados à hanseníase.

Mesmo considerando outros estudos nacionais e/ou internacionais com hanseníase em banco de sangue, o número de trabalhos é muito pequeno. A realização de triagem sorológica utilizando um marcador de infecção específico para hanseníase direcionou a detecção de novos casos de hanseníase em pessoas que compareceram ao HEMOPA para doar sangue. Este achado destaca a importância de investigação em novos em serviços de saúde, principalmente em regiões endêmicas para a doença como o estado do Pará.

A detecção do gene RLEP presente no DNA do bacilo, realizado pela técnica de biologia molecular pode contribuir para diagnósticos precoces (Gobbo *et al.*, 2022; Silva *et al.*, 2021; Yan *et al.*, 2014), principalmente se for direcionado por uma sorologia previamente realizada, como a pesquisa em questão, pois trata-se de uma técnica precisa e sensível, que complementa a avaliação médica para o diagnóstico de novos casos de hanseníase.

Ferramentas laboratoriais para diagnóstico da hanseníase não tem detecção eficaz para todas as formas clínicas da doença. O diagnóstico da hanseníase ainda depende da avaliação clínica por uma equipe médica experiente, pois a identificação do *M. leprae* em amostras de raspado dérmico através de baciloscopia para BAAR ou através de exame histopatológico possui limitações significativas e baixa sensibilidade, especialmente em casos de hanseníase precoce, oligosintomática ou latente (Chen *et al.*, 2022; Silva *et al.*, 2021).

Testes sorológicos, qPCR e outros exames laboratoriais podem colaborar para detecção precoce do diagnóstico da hanseníase. Os achados deste trabalho revelaram a presença do *M. leprae* nas amostras de raspado e de sangue para o teste de biologia

molecular em percentuais significativos de doadores de sangue. Este fato ressalta a importância da investigação em outros serviços de saúde, como os bancos de sangue espalhados por todo o país, principalmente aqueles em regiões endêmicas para a hanseníase.

A detecção do DNA do bacilo pode significar a presença do bacilo em amostra de sangue periférico, bem como podem estar presentes nas bolsas dispensadas para receptores de sangue, e podem ser uma possível via de transmissão da doença ainda não esclarecida. Até o presente momento não há testes laboratoriais para hanseníase realizados em bolsa de sangue, devido o fluxo do processo de doação ser ressaltado pela portaria vigente, a qual não estabelece essa pesquisa, mas pontua que riscos tardios inerentes à doação de sangue podem ocorrer. O diagnóstico de novos casos de hanseníase em doadores de sangue tem importante aplicação nas medidas preventivas de investigação da doença, uma vez que a alta infectividade da hanseníase possibilita fácil dispensação e propagação do bacilo entre indivíduos que convivem no mesmo domicílio por períodos prolongados.

6. CONCLUSÕES

- 6.1. O percentual de 28,2% de doadores de sangue com resultado positivo, DO $0.295 \leq x < 0.750$, para a IgM anti-PGL-I indica uma alta circulação do *M. leprae* nesta população, e corrobora estudos anteriores realizados no estado do Pará, indicando alta circulação bacilar.
- 6.2. A detecção de 5 casos novos (62,5%) em 8 pessoas avaliadas com titulação de IgM anti-PGL-I $\geq 0,750$ indicam que este *cut-off* pode funcionar bem para o diagnóstico de novos casos de hanseníase na população de doadores de sangue.
- 6.3. O percentual de 4% de doadores nesta faixa com resultado de DO maior ou igual a 0,750 ao ELISA, indica um altíssimo número de casos de hanseníase sem diagnóstico nesta população.
- 6.4. Com a média anual de 2.762 inaptos nos últimos 5 anos, considerando 4% de positivos altos, teríamos aproximadamente 110 pessoas a serem examinadas anualmente, e 68 casos novos.

- 6.5. Dois dos 5 casos novos diagnosticados foram positivos pelo qPCR RLEP para o *M. leprae* no sangue, indicando a possibilidade de transmissão por via sanguínea.
- 6.6. Diante do cenário apresentado, parece necessário realizar capacitação para a equipe de triagem do HEMOPA, e ampliar os dados obtidos, com a finalidade de propor o uso das ferramentas aqui descritas nos hemocentros de áreas endêmicas para a hanseníase.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARDALAN, M. *et al.* Lepromatous leprosy in a kidney transplant recipient: a case report. **Experimental and clinical transplantation : official journal of the Middle East Society for Organ Transplantation**, v. 9, n. 3, p. 203–206, jun. 2011.

BARRETO, J. G. *et al.* Anti-PGL-I seroepidemiology in leprosy cases: household contacts and school children from a hyperendemic municipality of the Brazilian Amazon. **Leprosy review**, v. 82, n. 4, p. 358–70, dez. 2011.

_____. High rates of undiagnosed leprosy and subclinical infection amongst school children in the Amazon Region. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, p. 60–67, 2012.

_____. Spatial Analysis Spotlighting Early Childhood Leprosy Transmission in a Hyperendemic Municipality of the Brazilian Amazon Region. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 2, 2014.

_____. Spatial epidemiology and serologic cohorts increase the early detection of leprosy. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, 2015.

BERNARDES FILHO, F. *et al.* Leprosy in a prison population: A new active search strategy and a prospective clinical analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 2, 2020.

BHAT, R. M.; PRAKASH, C. Leprosy: An Overview of Pathophysiology. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2012, p. 1–6, set. 2012.

BIHL, F. *et al.* Transfusion-transmitted infections. **Journal of translational medicine**, v. 5, 6 jun. 2007.

BRENNAN, P. J.; VISSA, V. D. Genomic evidence for the retention of the essential mycobacterial cell wall in the otherwise defective *Mycobacterium leprae*. **Leprosy Review**, v. 72, n. 4, 2001.

CHAVARRO-PORTILLO, B.; SOTO, C. Y.; GUERRERO, M. I. *Mycobacterium leprae*'s evolution and environmental adaptation. **Acta Tropica**, v. 197, p. 105041, 1 set. 2019.

CHEN, K. H. *et al.* Leprosy: A Review of Epidemiology, Clinical Diagnosis, and Management. **Journal of tropical medicine**, p. 1–14, 2022.

COSTA, I. L. V. *et al.* Leprosy among children in an area without primary health care coverage in Caratateua Island, Brazilian Amazon. **Frontiers in Medicine**, v. 10, 2023.

DIJK, J. H. M. VAN *et al.* Synthetic Phenolic Glycolipids for Application in Diagnostic Tests for Leprosy. **ChemBioChem**, v. 22, n. 8, 2021.

DRUTZ, D. J.; O'NEILL, S. M.; LEVY, L. Viability of blood-borne *Mycobacterium leprae*. **The Journal of infectious diseases**, v. 130, n. 3, p. 288–292, 1974.

FERNÁNDEZ, J. M. M. Sixth international congress of leprology. **A. M. A. Archives of Dermatology and Syphilology**, v. 69, n. 5, 1954.

FOSS, N. T.; CALLERA, F.; ALBERTO, F. L. Anti-PGL1 levels in leprosy patients and their contacts. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 26, n. 1, p. 43–51, 1993.

GASINK, L. B. *et al.* An uncommon presentation of an uncommon disease: leprosy in a heart transplant recipient. **The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation**, v. 25, n. 7, p. 854–856, jul. 2006.

GELUK, A.; DUTHIE, M. S.; PENCER, &JOHNS S. Postgenomic *Mycobacterium leprae* antigens for cellular and serological diagnosis of *M. leprae* exposure, infection and leprosy disease. **Leprosy Review**, v. 82, n. 4, p. 402–421, dez. 2011.

GOBBO, A. R. *et al.* NDO-BSA, LID-1, and NDO-LID Antibody Responses for Infection and RLEP by Quantitative PCR as a Confirmatory Test for Early Leprosy Diagnosis. **Frontiers in Tropical Diseases**, v. 3, n. 850886, p. 1–10, 22 mar. 2022.

GOULART, I. M. B. *et al.* Asymptomatic Leprosy Infection among Blood Donors May Predict Disease Development and Suggests a Potential Mode of Transmission. **Journal of clinical microbiology**, v. 53, n. 10, p. 3345–3348, 1 out. 2015.

Guidelines for the diagnosis, treatment and prevention of leprosy. World Health Organization, Regional Office for South-East Asia, , 2018.

LAUNIUS, B. K. *et al.* A case study in Hansen’s disease acquired after heart transplant. **Critical care nursing quarterly**, v. 27, n. 1, p. 87–91, 2004.

LIMA, F. R. *et al.* Bacilloscopy and polymerase chain reaction of slit-skin smears and anti-phenolic glycolipid-I serology for Hansen’s disease diagnosis. **Frontiers in Medicine**, v. 9, n. August, p. 1–10, 2022.

LINCOLN SILVA, C. M. *et al.* Innovative tracking, active search and followup strategies for new leprosy cases in the female prison population. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 8, 2021.

MANJA, K. S. *et al.* Demonstration of Mycobacterium leprae and its viability in the peripheral blood of leprosy patients. **Leprosy review**, v. 43, n. 4, p. 181–187, 1972.

MARTINS, P. R. J. *et al.* The importance of hemovigilance in the transmission of infectious diseases. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 35, n. 3, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Diretrizes para a vigilância, atenção e eliminação da Hanseníase como problema de saúde pública: manual técnico-operacional.** [s.l: s.n.].

____. **Boletim Epidemiológico Hanseníase 2023.** Brasília: [s.n.]. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/especiais/2023/boletim_hansenia-se-2023_internet_completo.pdf/view>. Acesso em: 19 mar. 2023.

MISCH, E. A. *et al.* Leprosy and the Human Genome. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 4, p. 589–620, dez. 2010.

NERY, J. A. DA C. *et al.* Understanding the type 1 reactional state for early diagnosis and treatment: a way to avoid disability in leprosy. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 88, n. 5, p. 787–92, 2013.

PIERONI, F. *et al.* Six cases of leprosy associated with allogeneic hematopoietic SCT. **Bone marrow transplantation**, v. 40, n. 9, p. 859–863, nov. 2007.

PINHEIRO, R. O. *et al.* Mycobacterium leprae-host-cell interactions and genetic determinants in leprosy: an overview. **Future microbiology**, v. 6, n. 2, p. 217–30, fev. 2011.

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

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

SALES, A. M. *et al.* Leprosy among patient contacts: A multilevel study of risk factors. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 3, 2011.

SCOLLARD, D. M. *et al.* The continuing challenges of leprosy. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 2, p. 338–381, abr. 2006.

SHIH, H. C. *et al.* Leprosy in a renal transplant recipient: a case report and literature review. **The Journal of dermatology**, v. 32, n. 8, p. 661–666, 2005.

SILVA, M. B. DA *et al.* Evidence of zoonotic leprosy in Pará, Brazilian Amazon, and risks associated with human contact or consumption of armadillos. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 6, 2018.

SILVA, M. B. DA *et al.* Latent leprosy infection identified by dual RLEP and anti-PGL-I positivity: Implications for new control strategies. **PLOS ONE**, v. 16, n. 5, p. e0251631, 1 maio 2021.

SINGH, P.; COLE, S. T. Mycobacterium leprae: Genes, pseudogenes and genetic diversity. **Future Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 57–71, 16 jan. 2011.

TAIRA, R. *et al.* Residual risk of transfusion-transmitted hepatitis B virus (HBV) infection caused by blood components derived from donors with occult HBV infection in Japan. **Transfusion**, v. 53, n. 7, 2013.

TERENCIO DE LAS AGUAS, J. Inoculación accidental de la lepra por transfusión sanguínea en gemelos univitelinos. **Rev. leprol. Fontilles**, v. 6, n. 7, p. 603–611, 1967.

TRINDADE, M. A. B. *et al.* Leprosy in transplant recipients: report of a case after liver transplantation and review of the literature. **Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society**, v. 13, n. 1, p. 63–69, 2011.

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

WHO. Towards zero leprosy Global Leprosy (Hansen's disease) Strategy 2021-2030. **World Health Organization**, p. 1–30, 2021.

_____. Global leprosy (Hansen disease) update, 2022: new paradigm – control to elimination. *Weekly epidemiological record: Relevé épidémiologique hebdomadaire*. v. 98, n. 37, p. 409–430, 2023.

YAN, W. *et al.* Application of RLEP real-time PCR for detection of *M. leprae* DNA in paraffin-embedded skin biopsy specimens for diagnosis of paucibacillary leprosy. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 90, n. 3, p. 524–9, mar. 2014.

ANEXO I

Tabela de Triagem Clínica de Doadores de Sangue – Doenças

(Origem: PRT MS/GM 158/2016, Anexo 1) ANEXO I TABELA DE TRIAGEM CLÍNICA DE DOADORES DE SANGUE – DOENÇAS

A - PRINCIPAIS CAUSAS DE INAPTIDÃO DEFINITIVA PARA DOAÇÃO DE SANGUE
Alcolismo crônico
Anafilaxia (choque anafilático)
Antecedentes de acidente vascular cerebral (AVC) Bronquite e asma (crises com intervalos de 3 meses ou menos, sem controle com medicamentos por via inalatória)
Babesiose
Blastomicose sistêmica
Câncer (inclusive leucemia). Antecedentes de carcinoma in situ de cérvix uterina e de carcinoma basocelular de pele não impedem a doação de sangue
Doença cardiovascular grave. Especial atenção para doença coronariana, angina, arritmia cardíaca grave, insuficiência cardíaca, doença valvular, aneurismas, má formações arteriovenosas, endocardite com sequela, miocardite com sequela, trombose arterial, trombose venosa recorrente e trombofilia
Diabetes tipo I, diabetes tipo II, insulino-dependente
Doenças autoimunes que comprometam mais de um órgão. Por exemplo: lúpus eritematoso sistêmico, tireoidites imunes, artrite reumatoide, etc
Doença pulmonar grave: especial atenção à enfisema, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), história de embolia pulmonar
Doenças endócrinas: hiperaldosteronismo, hiperfunção hipofisária, hiperlipoproteinemias essenciais, hipertireoidismo, hipopituitarismo, insuficiência suprarrenal, síndrome de Cushing
Doenças gastrointestinais: cirrose hepática, retocolite ulcerativa crônica, doença de Crohn, hepatopatia crônica de origem desconhecida, hipertensão porta, pancreatite crônica
Doenças neurológicas: esclerose em placa, esclerose lateral amiotrófica, esclerose múltipla, hematoma extra ou subdural com sequela, leucoencefalopatia multifocal progressiva, neurofibromatose forma maior, miastenia gravis Doença renal crônica
Doenças hemorrágicas congênicas ou adquiridas
Doença de Creutzfeldt Jakob (vaca louca) ou histórico familiar de encefalopatia espongiforme humana e suas variantes, transplante de córnea e implante a base de dura-máter
Elefantíase (filariose)
Esquistossomose hepatoesplênica
Feocromocitoma
Hanseníase
Hepatite viral após 11 anos de idade (exceto para caso de comprovação de hepatite A aguda com IgM reagente, a época do diagnóstico clínico) Infecção por HBV, HCV, HIV, HTLV I/II
Intoxicações por metais pesados
Leishmaniose visceral (Calazar)
Malária (Febre quartã - Plasmodium malarie)

Doença psiquiátrica que gere inimizabilidade jurídica (incapacidade)
Pênfigo foliáceo Psoríase extensa ou com outras manifestações associadas
Reação adversa grave em doação anterior
Tuberculose extrapulmonar