



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

**O PAPEL DA BIOLOGIA MOLECULAR NO DIAGNÓSTICO,
EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR E PERFIL DE SENSIBILIDADE DE
CEPAS DE *M. leprae* EM REGIÃO ENDÊMICA DA AMAZÔNIA
BRASILEIRA**

RAQUEL CARVALHO BOUTH

Belém -Pa

2023

RAQUEL CARVALHO BOUTH

**O PAPEL DA BIOLOGIA MOLECULAR NO DIAGNÓSTICO,
EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR E PERFIL DE SENSIBILIDADE DE
CEPAS DE *M. leprae* EM REGIÃO ENDÊMICA DA AMAZÔNIA
BRASILEIRA**

Tese apresentada como requisito para a
obtenção do grau de Doutora em
Neurociências e Biologia Celular do
Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade Federal do Pará.

Área de Concentração: Biologia celular.

Orientador: Prof. Dr. Claudio Guedes
Salgado

Coorientador: Prof. Dr. Moises Batista
da Silva

Belém -Pa

2023

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

C331p Carvalho Bouth, Raquel.
O papel da biologia molecular no diagnóstico, epidemiologia molecular e perfil de sensibilidade de cepas de *M. leprae* em região endêmica da Amazônia brasileira / Raquel Carvalho Bouth. — 2023.
105 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Claudio Guedes Salgado
Coorientador(a): Prof. Dr. Moises Batista da Silva
Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia, Belém, 2023.

1. Hanseníase. 2. *Mycobacterium leprae*. 3. qPCR RLEP.
4. genotipagem. 5. resistência microbiana a antibióticos . I.
Título.

CDD 614.09811

RAQUEL CARVALHO BOUTH

**O PAPEL DA BIOLOGIA MOLECULAR NO DIAGNÓSTICO,
EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR E PERFIL DE SENSIBILIDADE DE CEPAS
DE *M. leprae* EM REGIÃO ENDÊMICA DA AMAZÔNIA BRASILEIRA**

Tese apresentada como requisito para a
obtenção do grau de Doutora em Neurociências
e Biologia Celular do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade Federal do Pará.
Área de Concentração: Biologia celular.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Claudio Guedes Salgado
Universidade Federal do Pará -Pa (Orientador)

Prof. Dr. John Stewart Spencer
Colarado University, Fort Collins, CO -USA

Prof. Dr. Josafá Gonçalves Barreto
Universidade Federal do Pará - Pa

Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva
Universidade Federal do Pará - Pa

Profª DRª. Patrícia Fagundes da Costa
Universidade Federal do Pará - Pa (Suplente)

Belém -Pa

2023

Às mãos, pés, e corações que os tornaram esta tese possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, sem a qual não seria possível a realização desta tese. Minha mãe Fátima, meu pai Jorge, minhas tias Graça, Jesus (tia Dadá), e Belém que foram incansáveis na dedicação para minha criação e formação como pessoa e cidadã, me dando suporte familiar e financeiro para que eu pudesse me dedicar aos estudos, pois só quem já precisou trabalhar muito na vida sabe o quanto a educação é transformadora e necessária. Minha irmã Isis que me proporciona acolhimento, companhia e deliciosas receitas, e pelo maior presente que alguém poderia me proporcionar, ser tia da Helena. Uma menina doce, carinhosa e cheia de vitalidade e que a presença faz lembrar como é boa a vida e que as melhores coisas são efêmeras e cada momento é importante. Ao meu irmão, Heitorzinho, que já nem é tão pequeno assim, e mesmo distante, é lembrado com amor e carinho.

Agradeço ao meu orientador, Dr. Claudio Salgado, que foi meu professor na graduação, e me fez ir pela primeira vez em um hospital lá em Marituba, fazer uma coisa muito diferente do que fazíamos normalmente dentro do curso de graduação em biomedicina. Ver, olhar, enxergar, uma pessoa que naquele momento precisavam de um suporte médico e laboratorial, um paciente. Deixei de trabalhar com amostras para trabalhar com pessoas. Naquele momento, eu não sabia, mas tinha nascido a vontade de explorar essa vivência. E no fim do meu mestrado veio esta oportunidade através do Professor Doutor Moises Silva, que deixo aqui registrado meu muito obrigada pelo convite de trabalhar na URE Dr, Marcello Candia, por proporcionar esta oportunidade, e por toda sua ajuda nesta caminhada, como coorientador e direcionador dentro das atividades do laboratório e da vida acadêmica. Ao meu orientador e coorientador, muito obrigada por acreditarem e confiarem em meu trabalho.

Às minhas companheiras do LDI, que se tornaram amigas pessoais, que foram fundamentais para a construção e conclusão desta tese. Muitos momentos de trabalho, conversas científicas, conversas e momentos pessoais dentro e fora do laboratório foram fortalecedores diários desta parcela importante que tese tem em minha vida. Angélica Gobbo, Aline Barral, Sâmela Miranda, Naila Cruz, Ana Messias, Erika Jorge, Gisele Ribeiro, e muitas outras pessoas que passaram pelo laboratório, muito obrigada. A presença de vocês nessa jornada foi muito importante.

Aos professores e colaboradores do LDI, Dr. John Spencer, da Universidade do Colorado, importante pesquisador internacional, pessoa com uma grande bagagem científica, e que carrega consigo a humanidade, olhar ao próximo muitas das vezes esquecido dentro da ciência,

para com seus colaboradores. Dr. Josafá Barreto, professor e pesquisador que provoca e instiga o pensamento científico. Dra Patrícia Fagundes, que não se cansa nem se acomoda diante das injustiças sociais. Dr Marco Andrey, um ser humano incrível, que pelo amor ao próximo exerce sua função de médico e pesquisador de forma admirável, mudando a vida de centenas de pessoas. Muito obrigada, me inspiro em suas qualidades.

Agradeço à Dra Charlotte Avanzi por proporcionar a realização e análise do sequenciamento do genoma completo das cepas obtidas no estudo. Ao departamento de anatomia patológica do instituto Lauro de Sousa Lima, nas pessoas do Dr. Jaison Barreto e Andreia Belone e sua equipe pelo treinamento do processamento e coloração das peças de biópsia. À Dra Maraya Bittencourt pelas análises histopatológicas. À Dra Renata Novaes, Dr. Apolônio, e Dra Fátima que estiveram à frente da URE DR. Marcello Candia no período do estudo, a todos os funcionários da URE, em especial às meninas do laboratório (Regina, Izabel, D. Altemira, Jucilene, Raquel de Jesus, Nalva e Leide), a Conce da sala de biópsia, a Bethânia do PQT, aos funcionários do agendamento que muito ajudaram no contato com os pacientes. E aos servidores da URE lotados no LDI, Erika, Gisele, Marcos e André.

Agradeço à UFPA, pelos cursos de graduação, mestrado e doutorado. Muito obrigada às agências de fomento, que deram suporte financeiro para as viagens aos municípios, pelo recurso para a realização dos exames, pelo financiamento de minha bolsa, pelo suporte financeiro para apresentar os dados da tese em dois congressos internacionais.

Agradeço também à pessoas que passaram por minha vida e que me deram muito apoio em um momento de muita fragilidade. Obrigada ao Thiago e sua família: D. Lizete, Sr. Marcos, Mayla, a Larissa, Anderson e meus sobrinhos queridos, Camila e Davi.

Aos meus amigos pessoais que me apoiam, compartilham os bons momentos e momentos difíceis: Leticia, Leticia, Joana, Alana, Flávia, Karina, Paola, Césa, Jaime, Leo, Deyvisson e meus amigos Marcos e Breno *in memoriam*.

E por último, mas não menos importante, à minha espiritualidade, aos meus guias que venho descobrindo, aprendendo a cuidar e entendendo como eles cuidam da minha vida. Ao meu babalorixá, Sr. Elivaldo de Oliveira, o Pai Elivaldo, que abriu as portas da sua casa para que esta se tornasse minha também.

. Resumo

A hanseníase é uma doença crônica, incapacitante e de difícil diagnóstico, principalmente nas formas clínicas não clássicas. O objetivo deste estudo foi identificar o marcador laboratorial que apresente maior sensibilidade e especificidade para o diagnóstico, conhecer geneticamente as cepas de *M. leprae* circulantes no Estado do Pará e avaliar a realidade da droga-resistência na região. Para isso, uma equipe multiprofissional avaliou 833 indivíduos em diferentes estratégias na URE Dr. Marcello Candia, e em 14 municípios do Pará. Todos os indivíduos foram avaliados clinicamente, e coletadas amostras biológicas para análise comparativa dos resultados de baciloscopia de raspado intradérmico, detecção molecular do bacilo pela pesquisa da região RLEP por qPCR em lóbulos auriculares, titulação de anticorpos IgM Anti-PGL-I, e biópsia de pele em quem tinha lesão para exame histopatológico, detecção de RLEP, e sequenciamento do genoma completo do *M. leprae*. Foram clinicamente diagnosticados 351 casos, divididos nos grupos com manifestação clínica clássica e não clássica, e casos assintomáticos e 482 contatos saudáveis. A análise comparativa dos resultados demonstrou que a detecção molecular de RLEP em lóbulo auricular apresentou maior sensibilidade e especificidade e concordância com o diagnóstico clínico (72,5, 70,4 e Kappa= 0,42 respectivamente), seguida da detecção em biópsia de pele (sensibilidade= 65,8%), sorologia Anti-PGL-I com 61,2% (52,2 de especificidade), baciloscopia (41,7%) e histopatologia (25,0%). Na associação do RLEP com a sorologia, houve o aumento da correlação com a clínica (Kappa= 0,55). Na avaliação do perfil de cepas circulantes, o perfil mais frequente foi o perfil 4N (52/66- 78,8%), seguido do subtipo 4P (4/66- 6,1%), 3I (9/66- 13,6%), e 1D (1/66- 1,5%). Na análise das regiões de droga-resistência, obtivemos 3/101 (3%) de mutação conferindo droga-resistência a dapsona, gene *folP1*. 1/40 (2,5%) conferindo resistência às quinolonas, em *gyrB*. A cepa resistente em *gyrB*, apresentava também mutação em *folP1*, e nos genes *fadD9*, *ribD*, *pks4* e *nth*, considerada hipermutante. Nossos achados direcionam o exame de detecção molecular de RLEP por qPCR associado à sorologia Anti-PGL-I como boas ferramentas para diagnóstico laboratorial da hanseníase, e que as cepas do tipo 4, originárias da África, são o tipo mais frequentes na Amazônia e que existem cepas circulantes com resistência às medicações do esquema de poliquimioterapia atual e às drogas alternativas.

Palavras-chave: Hanseníase, *Mycobacterium leprae*, qPCR RLEP, genotipagem, resistência microbiana a antibióticos

Abstract

Leprosy is a chronic disease, disabling and difficult to diagnose in all its clinical manifestations. The aims of this study were to identify the laboratory marker that presents greater sensitivity and specificity for diagnosis, to genetically understand the strains of *M. leprae* circulating in the Pará State and to evaluate the region drug resistance reality. A multidisciplinary team evaluated 833 individuals using different strategies at URE Dr. Marcello Candia, and in 14 municipalities in Pará. All individuals were clinically evaluated, and biological samples were collected for comparative analysis of the results of slit skin smear microscopy, molecular detection of the bacillus by qPCR RLEP in ear lobes, IgM Anti-PGL-I antibodies titration, and histopathological lesion skin biopsy, lesion qPCR RLEP, and *M. leprae* whole genome sequence. 351 cases were clinically diagnosed, divided into groups: individuals with classic and non-classic clinical manifestations, asymptomatic cases and 482 healthy contacts. The comparative analysis of the results demonstrated that ear lobe RLEP detection presented greater sensitivity, specificity and agreement with the clinical diagnosis (72.5, 70.4 and Kappa = 0.42 respectively), followed by skin biopsy (sensitivity= 65.8%), Anti-PGL-I serology with 61.2% (52.2 specificity), slit smears skin (41.7%) and histopathology (25.0%). The RLEP association to serology, showed an increased in laboratorial correlation with the clinic diagnosis (Kappa= 0.55). The circulant streains evaluation, we detected that the most frequent profile was profile 4N (52/66- 78.8%), followed by 4P subtype (4/66- 6.1%), 3I (9/66 -13, 6%), and 1D (1/66- 1.5%). In the drug resistance analysis, we obtained 3/101 (3%) mutation in *folP1* gene, conferring dapson resistance. 1/40 (2.5%) *gyrB* mutations, conferring quinolones resistance. The *gyrB* resistant strain also had mutation in *folP1*, and in the *fadD9*, *ribD*, *pks4* and *nth* genes, considered a hypermutant strain. Our findings showed that qPCR RLEP molecular test associated with Anti-PGL-I serology were a good tool for leprosy laboratorial diagnosis, and that type 4 strains, originating in Africa, are the most frequent type in the Amazon. And we find drug-resistant strains, and a hypermuted strain circling in the region. The strains were resistant to the current polychemotherapy regimen and the alternative drug regimen.

Keywords: Leprosy, *Mycobacterium leprae*, qPCR RLEP, genotyping, drug resistance

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição mundial de casos novos de hanseníase. (Adaptado de WHO, 2019)

Figura 2: Detecção de hanseníase no Brasil, em 2018. (Fonte: Brasil, 2020)

Figura 3: Hanseníase Indeterminada. Mácula hipocrômica.

Figura 4: Hanseníase Tuberculóide- Lesões em placas com bordas tuberosas na periferia da lesão

Figura 5 Hanseníase Virchowiana. A) Lesões nodulares; B) Lesões nodulares no lóbulo auricular com infiltração difusa.

Figura 6: Hanseníase Borderline. A) Hanseníase Borderline-Tuberculóide- Mácula hipocrômica com borda infiltrada; B) Hanseníase Bordeline-Bordeline- Mácula eritematosa com aspeto foveolar; Hanseníase Bordeline-Lepromatosa- Máculas eritematosas foveolares, nódulos e infiltração difusa

Figura 7: Forma clínica e Classificação operacional

Figura 8: Baciloscopia de raspado intradérmico com presença de BAAR. Índice baciloscópico imagem A: 4+; imagem B: 6+. Leitura no aumento: 100x.

Figura 9: Exame Histopatológico nas diferentes formas clínicas

Figura 10: Crianças menores de 15 anos com hanseníase multibacilar e/ou algum grau de incapacidade física

Figura 11: Distribuição geográfica das famílias visitadas pela equipe na busca ativa nos municípios de Belém- Ilha do Combu, Cametá, Castanhal, Curralinho, Jacundá, Limoeiro do Ajuru, Maracanã, Marapanim, Mocajuba, Nova Esperança do Piriá, Salvaterra, Santo Antônio do Tauá, São Caetano de Odivelas, São Miguel do Guamá

Figura 12: Exames neuro-dermatológico realizados em todos os indivíduos participantes do estudo

Figura 13: Fluxograma da avaliação e coleta de material biológico dos participantes do estudo.

Figura 14: Baciloscopia de casos clássicos, não clássicos e casos assintomáticos

Figura 15: Titulação de anticorpos IgM Anti-PGL-I dos Casos Clássicos, Casos não clássicos, assintomáticos e Contatos saudáveis e análise estatística pelo teste Mann-Whitney ($p \leq 0,005$).

Figura 16: Detecção de Anticorpos IgM anti-PGL-I dos casos clássicos, iniciais e assintomáticos segundo a forma clínica

Figura 17: Positividade do exame de detecção da região RLEP por qPCR em raspado intradérmico

Figura 18: Detecção e CT de amplificação da região RLEP em casos clássicos, não clássicos, assintomáticos e contatos clinicamente saudáveis

Figura 19: Detecção da amplificação da região RLEP segundo as formas clínicas, indivíduos assintomáticos e contatos saudáveis

Figura 20: Correlação entre índice Baciloscópico e CT de amplificação de RLEP por qPCR de indivíduos diagnosticados com hanseníase

Figura 21: Distribuição do CT de amplificação de RLEP de acordo com o índice baciloscópico de indivíduos diagnosticados com hanseníase

Figura 22: Correlação entre D.O do ELISA IgM Anti-PGL-I e C.T de detecção de RLEP em raspado intradérmico

Figura 23: Origem das amostras de biópsia de pele dos pacientes participantes do estudo

Figura 24: Forma clínica dos participantes do estudo, distribuídos em casos novos, recidiva, pacientes sem melhora clínica com tratamento e pacientes que insuficiência terapêutica

Figura 25: Genotipagem das cepas de *Mycobacterium leprae* causadoras de hanseníase em pacientes atendidos na Unidade de Referência Dr. Marcello Candia

Figura 26: Genótipo das cepas de *Mycobacterium leprae* associado às formas clínicas da hanseníase

Figura 27: Associação do genótipo de *Mycobacterium leprae* com a história clínica do paciente

Figura 28: Distribuição geográfica das cepas identificadas no Estudo.

Figura 29: Amplificação das regiões gênicas *rpoB*, *folP1*, *gyrA*, *gyrB*, e seu perfil de sensibilidade

Figura 30: Lesão nodular de paciente com recidiva de hanseníase e resistência a dapsona

Figura 31: Paciente com resistência à dapsona com insuficiência terapêutica. Apresenta lesões disseminadas pelo tegumento

Figura 32: Paciente com resistência primária, com lesões disseminadas pelo tegumento, com diagnóstico de hanseníase LL

Figura 33: Avaliação e exames laboratoriais do caso com resistência primária e seus contatos. Moradores da Casa A: o caso primariamente resistente (quadrado vermelho), a esposa (círculo verde), seu filho (quadrado roxo) e outros parentes. Os moradores da casa B, localizada próxima à casa A, são contatos de longa data. Parentes da esposa moram na casa C. São apresentados os resultados positivos para sorologia anti-PGL-I e detecção de RLEP para cada indivíduo

Figura 34: Esposa, com placa hipocrômicas em abdômen

Figura 35: Filho, com lesão hipocrômica e tubérculos no antebraço.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Escala logarítmica de Ridley para quantificação de bacilos álcool-ácidos resistentes em amostras de raspado intradérmicos em casos suspeitos de hanseníase
- Tabela 2: Positividade da baciloscopia de raspado intradérmico em casos clássicos, iniciais e assintomáticos.
- Tabela 3: Positividade da sorologia IgM anti-PGL-I de casos clássicos, iniciais e contatos saudáveis
- Tabela 4: Diagnóstico histopatológico de lesões de pele de indivíduos diagnosticados com hanseníase
- Tabela 5: Positividade de detecção de RLEP por qPCR nos grupos casos clássicos, não clássicos e contatos saudáveis.
- Tabela 6: Detecção de RLEP por qPCR em lesão de pele em pacientes com hanseníase
- Tabela 7: Detecção de RLEP por qPCR de acordo com a baciloscopia nas formas clínicas
- Tabela 08: Positividade de RLEP por qPCR de acordo com a detecção de anticorpos Anti-PGL-I segundo as formas clínicas
- Tabela 09: Positividade de RLEP em raspado intradérmico por qPCR de acordo com a detecção de RLEP em lesão de pele segundo as formas clínicas
- Tabela 10: Positividade do marcador molecular RLEP em raspado intradérmico e fragmento de lesão de pele
- Tabela 11: Percentual de positividade dos exames laboratoriais realizados nos indivíduos diagnosticados clinicamente com hanseníase e de contatos saudáveis
- Tabela 12: Determinação da sensibilidade e especificidade dos exames laboratoriais nos grupos do estudo
- Tabela 13: Avaliação da concordância dos exames laboratoriais com o diagnóstico clínico, através do teste Kappa
- Tabela 14: Sensibilidade, especificidade e avaliação de concordância com diagnóstico clínico da associação dos exames sorologia anti-PGL-I e detecção molecular da região RLEP
- Tabela 15: Distribuição dos genótipos nos municípios dos Estados do Pará e Maranhão.
- Tabela 16: Percentual de amostras amplificadas e sua caracterização fenotípica baseada na amplificação dos genes *rpoB*, *folP1*, *gyrA*, *gyrB*
- Tabela 17: Mutações detectadas nas regiões de determinação de droga-resistência
- Tabela 18: Modo de entrada de cada paciente no estudo e seu perfil de sensibilidade

LISTA DE ABREVIATURAS

BAAR	Bacilo álcool-ácido resistente
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
BB	Hanseníase dimorfo- dimorfo, ou hanseníase bordeline-bordeline
BL	Hanseníase dimorfa virchowiana, ou hanseníase bordeline-lepromatosa
BSA	Bovine serum albumin
BT	Hanseníase dimorfa tuberculóide, ou hanseníase bordeline-tuberculóide
Ct	Cycle threshold
DHPS	Enzima 6-hidroximetil-7,8-diidropteroato sintase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
DRDR	<i>Região de determinação de droga-resistência</i>
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid/ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
GIF0	Grau de incapacidade física 0
GIF1	Grau de incapacidade física 1
GIF2	Grau de incapacidade física 2
HE	Coloração de hematoxilina e eosina
I	Hanseníase indeterminada
IB	Índice baciloscópico
IgM	Imunoglobulina M
LL	Hanseníase virchowiana
MB	Hanseníase multibacilar
ND-O-HSA	Natural disaccharide-octyl human serum albumin
OMS	Organização mundial da saúde
OPD	Dicloridrato de o-fenilenodiamina
PB	Hanseníase paucibacilar
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Reação da cadeia da polimerase
PGL-I	Glicolípido fenólico-I
PNL	Hanseníase primariamente neural
PQT	Poliquimioterapia
qPCR	PCR em tempo real

RLEP	Região repetitiva espécie específica para <i>M. leprae</i>
RNA	Ácido ribonucleico
SNP	Polimorfismos de nucleotídeo único
TT	Hanseníase tuberculóide
	Unidade de Referência Especializada em Dermatologia Sanitária DR. Marcello
UREMC	Candia
WGS	Sequenciamento do genoma completo
WHO	World health organization

SUMÁRIO

Resumo	vii
Abstract	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
1 INTRODUÇÃO	17
1.1 EPIDEMIOLOGIA	18
1.2 O AGENTE INFECCIOSO	20
1.3 DIAGNÓSTICO E CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA	21
1.4 TRATAMENTO	24
1.5 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	25
1.6 EXAME BACILOSCÓPICO	25
1.7 EXAME ANATOMOPATOLÓGICO	27
1.8 EXAME SOROLÓGICO	29
1.9 DIAGNÓSTICO MOLECULAR	30
1.10 RESISTENCIA ANTIMICROBIANA	30
1.11 REGIÃO DE DETERMINAÇÃO DE DROGA-RESISTÊNCIA (DRDR)	31
1.12 OBJETIVO	33
1.12.1 Objetivo Geral	33
1.12.2 Objetivo Específico	33
2 METODOLOGIA	34
2.1 POPULAÇÃO AMOSTRAL	34
2.2 AVALIAÇÃO CLÍNICA	35
2.3 DEFINIÇÃO DOS GRUPOS	36
2.4 EXAMES LABORATORIAIS	36
2.4.1 Baciloscopia do raspado intradérmico	37
2.4.2 Detecção molecular da região RLEP do <i>Mycobacterium leprae</i> em raspado intradérmico	38
2.4.3 Sorologia Anti-PGL-I	38
2.4.4 Análise histopatológica	39
2.4.5 Detecção molecular da região RLEP do <i>Mycobacterium leprae</i> em lesão de pele	39
2.4.6 Coleta de material biológico para determinação do SNP e avaliação de Região de Droga-resistência	40
2.4.7 Extração e sequenciamento do genoma completo do <i>Mycobacterium leprae</i> (WGS)	40
2.4.8 Análise estatística	40
3 RESULTADOS	42
3.1 AVALIAÇÃO DE CONTATOS	44
3.2 BACILOSCOPIA DO RASPADO INTRADÉRMICO	44
3.3 SOROLOGIA IgM ANTI-PGL-I	46

3.4	EXAME HISTOPATOLÓGICO DE LESÃO DE PELE	48
3.5	DETECÇÃO DA REGIÃO RLEP DO <i>M. leprae</i> EM RASPADO INTRADÉRMICO	49
3.6	DETECÇÃO DA REGIÃO RLEP DO <i>M. leprae</i> EM BIÓPSIA DE PELE	52
3.7	CORRELAÇÃO DA DETECÇÃO DE RLEP POR qPCR E OS DEMAIS EXAMES LABORATORIAIAS	52
3.8	DETERMINAÇÃO DO PERFIL GENÉTICO DAS CEPAS DE <i>M. leprae</i> ISOLADAS	64
4	DISCUSSÃO	78
5	CONCLUSÃO	86
6	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	87

1. INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença granulomatosa, infectocontagiosa causada pelo agente infeccioso *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*). Trata-se de uma polineuropatia periférica que pode ser simétrica ou assimétrica (SABIN, 1971), acarretando a perda da sensibilidade térmica, tátil, dolorosa, podendo ocasionar deformidades e perda de função de mãos, pés, olhos e face (SPIERINGS et al., 2000a).

As alterações geram limitações na capacidade de execução das atividades diárias e tarefas relacionadas ao trabalho, o que culmina em impactos econômicos negativos para o portador da doença (VAN BRAKEL et al., 2012). Pode ocorrer também, a diminuição da participação social, pela própria limitação física, mas também pelo reflexo da segregação social, ao qual os pacientes sofreram da idade média até meados de 1950, que se reflete no estigma ainda sofrido pelos pacientes ainda hoje (LUSLI et al., 2015).

O diagnóstico da hanseníase é realizado a partir da detecção da manifestação clínica dos sinais e sintomas decorrentes da infecção pelo patógeno e interação com o sistema imune do indivíduo acometido. O curso da doença desde a infecção à percepção dos sintomas clínicos varia de 2 a 5 anos (GOULART; PENNA; CUNHA, 2002), havendo também registros de chimpanzés que apresentaram sintomas de hanseníase após 30 anos do provável contato com o patógeno (SUZUKI et al., 2010).

Apesar de já ter sido detectado na natureza animais de vida livre com a doença, como tatus (DA SILVA et al., 2018; DEPS et al., 2008; TRUMAN, 2005), esquilos (SCHILLING et al., 2019), e até mesmos protozoários de vida livre, como amebas (LAHIRI; KRAHENBUHL, 2008), a principal fonte de transmissão da hanseníase aceita é o contato com aerossóis provenientes de fala, tosse e espirros contendo bacilos (PLOEMACHER et al., 2020). Dessa forma, o contato íntimo e prolongado com pessoas bacilíferas, e sem tratamento, favorece aos contatos intradomiciliares, e pessoas de convívio diário com pacientes um elevado risco de contrair a doença (GOULART et al., 2008)

E mediante a necessidade de controle da doença, é fundamental o melhor conhecimento do microrganismo, desenvolvimento de estratégias com exames dermatoneurológico e laboratoriais para o diagnóstico em estágios iniciais, correta classificação da doença, para o correto tratamento, assim como, necessário reforçar a vigilância sobre cepas com resistência antimicrobiana, com a finalidade de quebrar o ciclo de transmissão da doença e prevenir as incapacidades físicas (WHO, 2017).

1.1. EPIDEMIOLOGIA

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 2019), relatam que foram diagnosticados 208.641 casos novos mundialmente. Os países: Índia (120.334), Brasil (28.660) e Indonésia (17.017) são responsáveis por 79,6% das notificações (Figura 01). Considerando a taxa de detecção, o Brasil ocupa o primeiro lugar do ranking (13,7 casos novos/100.000 habitantes), seguido da Índia (8,9 casos novos/100.000 habitantes) e Indonésia (6,4 casos novos/100.000 habitantes).

Por se tratar de uma doença crônica, com longo período de incubação e que pode gerar incapacidade física, além do parâmetro que nos permitam entender a proporção de pessoas que adoeceram (taxa de detecção de casos novos), é importante também avaliar indicadores que sugerem a presença do agente infeccioso ativamente circulante, a ponto de causar adoecimento em indivíduos jovens (taxa de detecção em menores de 15 anos de idade), e o grau do acometimento daqueles indivíduos diagnosticados tardiamente, através da taxa de detecção de casos novos com Grau de Incapacidade Física 2 (GIF2).

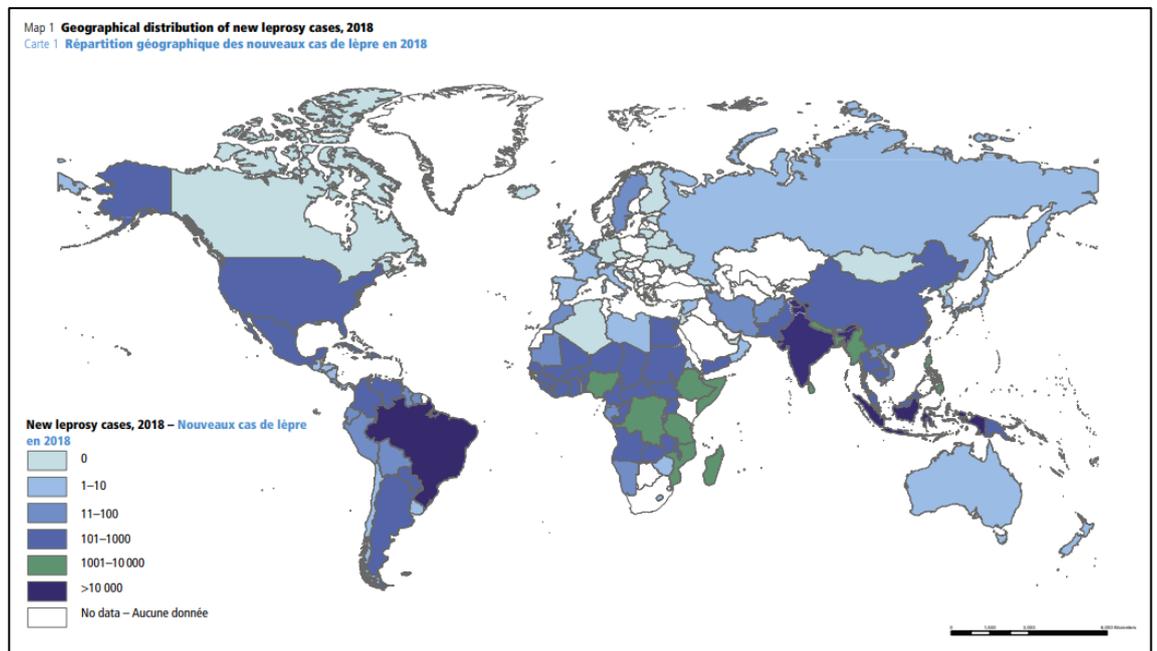


Figura 1: Distribuição mundial de casos novos de hanseníase. (Adaptado de WHO, 2019)

Os registros de casos novos com GI2 apresentou um gradual declínio no cenário mundial nos últimos anos, passando de 14.099 em 2014 para 11.323 em 2018. No entanto, 4 países não

acompanharam esta tendência de declínio e apresentaram maior número de GIF2 no diagnóstico, dentre eles, destacam-se Angola, Brasil, Moçambique, e Nepal (WHO, 2019).

Uma das metas para o controle da doença, segundo a *Global Leprosy Strategy* (“WHO, 2017), era que não fossem mais diagnosticadas crianças com GIF2 até o ano de 2020. Em 2018, foram reportados 16 013 casos de crianças com GIF, um declínio de 1.104 do ano de 2017 para o ano de 2018 (WHO, 2019).

O Brasil apresenta-se sempre em destaque dentre os indicadores associados à números de casos e relativos a diagnóstico tardio. Dados referentes às notificações dos anos de 2014 a 2018, apontaram 140.578 casos novos de hanseníase. Sendo 28.660 diagnosticados no Brasil em 2018. A detecção de hanseníase no ano de 2018 foi predominante na Região Centro-Oeste (41,29/100 mil hab.), seguido da Região Norte (31,95/100 mil hab.), Nordeste (20,36/100 mil hab.), Sudeste (4,22/100 mil hab.), e Sul (2,67/100 mil hab.), representados na figura 02. Os Estados com maiores taxas de detecção foram: Mato grosso (138,3/100 mil hab.), Tocantins (109,32/100 mil hab.), Maranhão (44, 94/100 mil hab.) (BRASIL, 2020).

Foram diagnosticados neste período 1.705 jovens até 15 anos de idade. A taxa de detecção foi maior na Região Norte (9,67/100 mil hab.), seguido da Região Centro-Oeste (7,14/100 mil hab.), Nordeste (5,73/100 mil hab.), Sudeste (0,88/100 mil hab.), e Sul (0,19/100 mil hab.). Os Estados do Tocantins (30,4/100 mil hab.), Mato Grosso (24,56/100 mil hab.) e Maranhão (15,21/100 mil hab.) (BRASIL, 2020).

Quanto ao Grau 2 de incapacidade Física, foram detectados 470 casos novos, representando 25,88/100 mil hab. A região com maior taxa de detecção foi a região Norte (25,88/100 mil hab.), seguido da região Centro-oeste (21,63/100 mil hab.), Nordeste (13,84/100 mil hab.), Sudeste (4,42/100 mil hab.) e Sul (3,59/100 mil hab.). O Estado do Tocantins (84,87/100 mil hab.) foi o que apresentou maior taxa de detecção dentre os Estados da federação, seguido do Mato Grosso (62,08/100 mil hab.), e Rondônia (36,19/100 mil hab.) (BRASIL, 2020).

A OMS traça estratégias de controle e eliminação da hanseníase (WHO, 2017, 2021), no entanto pouco se considera os diagnósticos represados da doença por falta de estratégias de diagnóstico e falta de capacitação das equipes de saúde. Esta realidade vem sendo apontada em trabalhos publicados pelo nosso grupo de pesquisa, como trabalho que evidencia a situação da ilha de mosqueiro, em Belém, aonde foram diagnosticados 110 casos novos em mil indivíduos avaliados em uma semana de trabalho, com uma equipe de especialistas,

contrariando a taxa de detecção local, que eram de 14,01 por 100.000 habitantes, no ano de 2013 (GUEDES SALGADO et al., 2016).

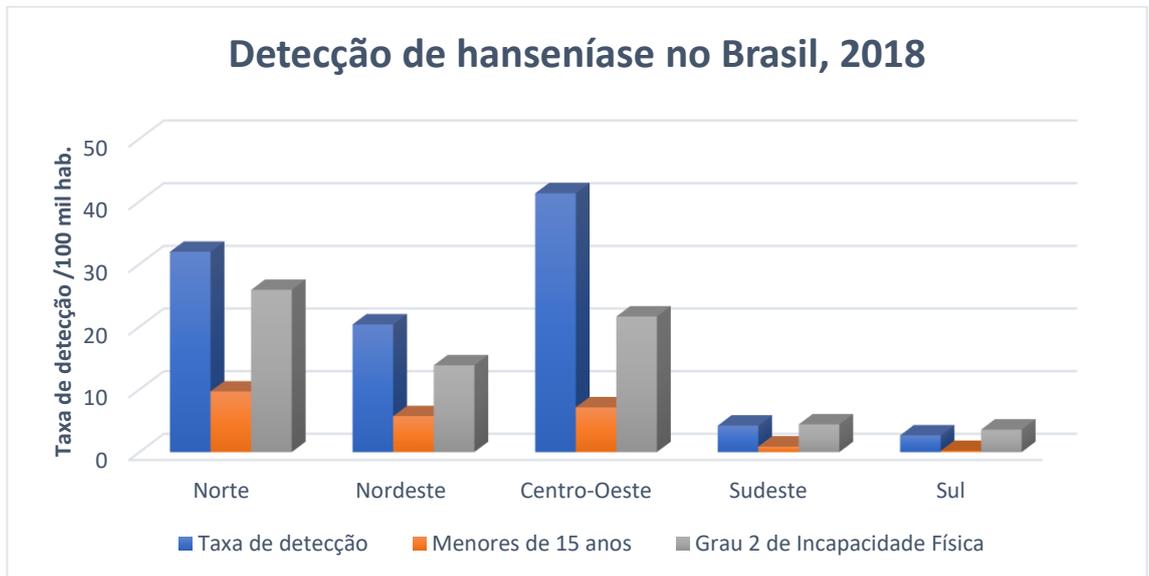


Figura 2: Detecção de hanseníase no Brasil, em 2018. (Fonte: Brasil, 2020)

1.2. O AGENTE INFECCIOSO

O patógeno responsável por causar a hanseníase, foi a primeira bactéria associada à doença infecciosa em humanos, descrita primeiramente em 1854 pelo médico dermatologista e bacteriologista norueguês Gerhard-Henrik Armauer Hansen (GHOSH; CHAUDHURI, 2015). Esta bactéria pertence ao domínio Bactéria, ordem *Actinomycetales*, subordem *Corynebacterineae* e família *Mycobacteriaceae*, gênero *Mycobacterium*. Atualmente, conhecemos duas espécies responsáveis por causar a doença: o *Mycobacterium leprae*, e mais recentemente, o *Mycobacterium lepromatosis* (HAN et al., 2008).

É uma bactéria com formato de bastonete reto ou levemente encurvado, de extremidades arredondada, medindo de 1 a 8 micras de comprimento por 0,3 a 05 micras de espessura, que pode ser encontrada isolada ou unidas formando globias (MINELLI, 1983). Apresenta a característica tintorial de se corar em vermelho por fuccina fenicada e não se decorar na presença do álcool-ácido. É portanto, um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR)(MARIA et al., 2002).

São organismos não cultiváveis em meio de cultura artificial e apresentam a característica de serem intracelulares obrigatórios, com tropismo por células de Schwann em nervos periféricos, além de macrófagos (FOSS, 1999). Esta micobactéria tem predileção por

células fagocitárias, como os macrófagos, preferencialmente aqueles que se situam próximos de vasos sanguíneos da microcirculação da pele e de nervos periféricos.

A comparação do genoma completo de cepas de *M. leprae* isoladas em diferentes regiões do mundo demonstrou homologia de mais de 99% entre os genomas, diferindo em algumas regiões. A análise dessas regiões permitiu o agrupamento dessas cepas em apenas dezesseis subtipos baseados em polimorfismos de nucleotídeo único (SNP), que demonstraram forte correlação com o padrão de migração humana nos primórdios da construção histórica das civilizações atuais, traçando rotas de dispersão das cepas (MONOT et al., 2009a).

1.3. DIAGNÓSTICO E CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA

O diagnóstico da hanseníase é baseado na detecção de alterações nos nervos periféricos como espessamento, dor e choque ao toque, e alterações cutâneas, que variam desde a alteração da sensibilidade térmica, tátil e dolorosa, ao achado de lesões cutâneas com alteração de sensibilidade, regiões com alopecia, xerodermia, e detecção de máculas hipocrômicas ou infiltradas (TRINDADE et al., 2009a).

O dano neural é decorrente da ação do sistema imune na tentativa de conter a proliferação do *M. leprae* em macrófagos e células de schwann, este dano pode progredir para danos irreversíveis no nervo periférico (SPIERINGS et al., 2000b). As manifestações iniciam pelo acometimento dos nervos periféricos, para posteriormente serem percebidas as manifestações cutâneas, com a polarização da resposta imune e reconhecimento como estágio clássico da doença.

As manifestações clínicas iniciais, ou não clássicas, da hanseníase se apresentam com discretas alterações neurológicas, podendo ou não apresentar lesões de pele o que torna o diagnóstico clínico dificultado. Para as lesões neurais e de pele bem caracterizadas, pode ser aplicada a classificação proposta por Ridley e Joplin (1966), que possui classificação espectral baseada em aspectos clínicos clássicos, histopatológicos, imunológicos, através do teste da lepromina, e do índice baciloscópico (IB). Dessa forma, a hanseníase pode ser classificada como: Primariamente Neural (PNL), Indeterminada (I), após evolução, pode se apresentar como um dos polos estáveis e bem definidos: Tuberculóide (TT) e Virchowiano (LL) e três intermediários e instáveis: Dimorfa Tuberculóide, ou Bordeline-Tuberculóide (BT), Dimorfo-Dimorfo, ou Bordeline-Bordeline (BB), Dimorfa Virchowiana, ou Bordeline-Lepromatosa (BL), (RIDLEY, 1966).

A hanseníase primariamente neural, é caracterizada pela ausência de lesão de pele, com espessamento neural, e alteração de sensibilidade no local suspeito (GARBINO et al., 2013). A

hanseníase Indeterminada é caracterizada por ser uma manifestação puramente macular, hipopigmentada, com sutil alteração de sensibilidade. Os achados histopatológicos da área de lesão pouco podem auxiliar na diferenciação de um caso de hanseníase e dermatite crônica, com pouco ou nenhum *M. leprae* no corte histológico (Figura 3).



Figura 33: Hanseníase Indeterminada. Mácula hipocrômica.

placa eritematosa com bordas externas elevadas com superfície áspera, e ausência de pelos, e predominantemente anestésica. O nervo afetado normalmente encontra-se espessado, evoluindo para quadros de anestesia, hiperalgesia, fraqueza muscular, e hipotrofia (RIDLEY, 1966) (Figura 02).



Figura 4: Hanseníase Tuberculóide- Lesões em placas com bordas tuberosas na periferia da lesão

O polo Virchoviano (LL), apresentando lesões maculares ou papulares, distribuídas de forma bilateral e simétrica, eritematosas. As máculas apresentam superfície lisa e brilhante, normalmente não são anestésicas. Nenhum nervo periférico espessado pode ser apalpado e a na evolução natural da doença pode ocorrer um espessamento difuso facial, levando o

aprofundamento das linhas da face, espessamento do nariz e orelhas, conhecida como face leonina, em alguns casos pode ocorrer deformidades no septo nasal, ceratite hansênica e irite, perda de dentes incisivos centrais superiores e alterações ósseas nas mãos e pés. Os nervos periféricos podem sofrer degenerações ou fibrose levando à anestesia e perda de massa muscular nas mãos e pés (RIDLEY, 1966) (Figura 03).

A forma Bordeline-Tuberculóide se caracteriza por máculas numerosas, acompanhado por espessamento de múltiplos nervos afetados e que eventualmente apresentam lesões satélites na periferia das lesões. A forma Bordeline-Bordeline, com as lesões *foveolares*, de aparência típica de “perfuração”, caracterizam-se como lesões ovaladas, de centro hipopigmentado e bordas internas bem delimitadas, tornando-se elevada e eritematosa na porção exterior com grau moderado de anestesia, e a forma Bordeline-Lepromatosa, com numerosas lesões (máculas, placas e nódulos), algumas tendem a ser grandes e com anestesia (RIDLEY, 1966) (Figura 04).



Figura 5 Hanseníase Virchowiana. A) Lesões nodulares; B) Lesões nodulares no lóbulo auricular com infiltração difusa.



Figura 6: Hanseníase Borderline. A) Hanseníase Borderline-Tuberculoide- Mácula hipocrômica com borda infiltrada; B) Hanseníase Bordeline-Bordeline- Mácula eritematosa com aspeto foveolar; Hanseníase Bordeline-Lepromatosa- Máculas eritematosas foveolares, nódulos e infiltração difusa.

afetadas e índice baciloscópico. Nesta classificação, o indivíduo pode apresentar-se como hanseníase paucibacilar (PB), onde se enquadram as formas Indeterminadas e TT, e hanseníase multibacilar, onde se enquadram as formas BT, BB, BL e LL, e pacientes com baciloscopia positiva, independente das características da lesão de pele. A forma clínica PNL pode ser classificada como PB, se houver um nervo afetado, ou hanseníase multibacilar (MB) se houver mais de um ramo nervoso afetado (“WHO | Classification of leprosy”, 2016) (Figura 05).

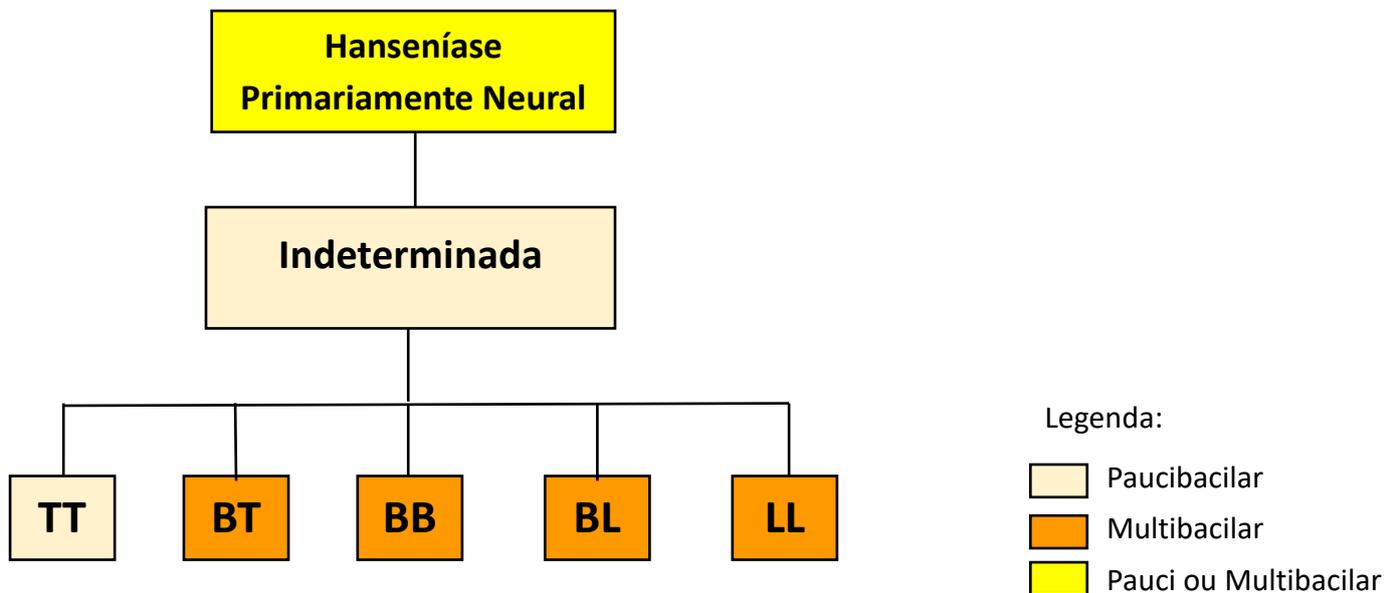


Figura 7: Forma clínica e Classificação operacional

1.4. TRATAMENTO

O tratamento da hanseníase, como a associação de drogas que conhecemos hoje, foi preconizado em 1982 pela OMS (WHO, 1982). em resposta à tentativa de minimizar o surgimento de cepas de *M. leprae* resistentes às monoterapias por sulfonas (PETTIT; REES, 1964b), e rifampicina (JACOBSON; HASTINGS, 1976). A partir de então, a OMS estabeleceu um esquema terapêutico baseado na associação das drogas dapsona, rifampicina e clofazimina, esquema conhecido como Poliquimioterapia (PQT) (WHO, 1982). Para o correto tratamento com a PQT, é necessária a correta classificação operacional, pois pacientes paucibacilares e multibacilares diferem na associação de medicamentos e no tempo de tratamento.

Para pacientes paucibacilares, é administrada uma dose mensal supervisionada pelo profissional de saúde de rifampicina (600mg) juntamente com 100 mg de dapsona, e diariamente o paciente ingere uma dose autoadministrada de dapsona de 100mg, pelo período de 6 meses, podendo se estender por até 9 meses. Para os pacientes multibacilares, é adicionado ao esquema a droga clofazimina na dose supervisionada (300mg), e na dose diária autoadministrada (50 mg), pelo período de 12 meses podendo se estender por até 18 meses. Para crianças, as doses são ajustadas conforme o peso (BRASIL., 2002).

Quando há necessidade de troca de qualquer medicamento da PQT, seja por resistência, ou efeitos colaterais como anemia hemolítica, meta-hemoglobinemia, erupções cutâneas, neuropatias, agranulocitose, hepatites tóxicas, síndrome da sulfona, decorrentes das medicações, principalmente à dapsona (GOULART et al., 2002; MARQUES et al., 2012), existe a possibilidade de utilizar o esquema alternativo, substituindo a referida medicação por ofloxacina na dose mensal de 400mg supervisionada e diária autoadministrada, ou substituir por minociclina com dose mensal de 10mg nas doses supervisionadas e na dose diária autoadministrada (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

1.5. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Apesar de ainda não existir um teste diagnóstico que seja capaz de detectar a doença em todas as suas formas clínicas, as ferramentas laboratoriais são importantes para auxiliar o diagnóstico, correta classificação, acompanhamento da evolução dos casos de hanseníase, e confirmação de recidiva. A utilização de métodos diagnósticos como baciloscopia do raspado intradérmico, exame histopatológico de lesão, exames sorológicos e mais recentemente, técnicas de biologia molecular estão sendo aprimorados para implementação do diagnóstico, principalmente de pacientes paucibacilares e em quadros iniciais da doença, onde os sinais clínicos são mais discretos do que as formas clássicas(DOCKRELL, 2011).

1.6. EXAME BACILOSCÓPICO

A baciloscopia do raspado intradérmico constitui-se ainda como um dos principais exames laboratoriais que auxilia no diagnóstico, direciona o tratamento, e auxilia no monitoramento da evolução clínica do paciente. Baseada na visualização do BAAR, em amostras de pontos de coleta específicos e pré-estabelecidos lóbulo auricular direito, lóbulo auricular esquerdo, cotovelo direito, cotovelo esquerdo ou lesão (HANSENÍASE; BACILOSCOPIA, 2010), possibilitando a mensuração da densidade de bacilos presente na infecção a partir de uma escala logarítmica estabelecida por Ridley e Hilson (RIDLEY, D .S;

HILSON, 1967), baseada na contagem dos bacilos por campo, após a leitura de 100 campos de cada ponto de coleta, como representado na tabela 1.

Para a identificação do BAAR, utiliza-se a técnica de coloração desenvolvida por Ziehl-Neelsen, considerada a melhor metodologia para identificação (SIQUEIRA; ALMEIDA; BELDA, 1983). Nesta metodologia se utiliza: fucsina fenicada, álcool-ácido 1%, e azul de metileno (HANSENÍASE; BACILOSCOPIA, 2010), deixando os bacilos corados em vermelho, e em azul a coloração de fundo, como visto na figura 08.

Tabela 1: Escala logarítmica de Ridley para quantificação de bacilos álcool-ácidos resistentes em amostras de raspado intradérmicos em casos suspeitos de hanseníase.

Escala logarítmica de Ridley	
0	Ausência de bacilos em 100 campos
1+	1 a 10 bacilos em 100 campos
2+	10 a 100 em 100 campos
3+	1 a 10 bacilos por campo
4+	10 a 100 bacilos por campo
5+	100 a 1.000 por campo
6+	Mais de 1.000 bacilos por campo

(Adaptado de: Ridley & Hilson, 1967)

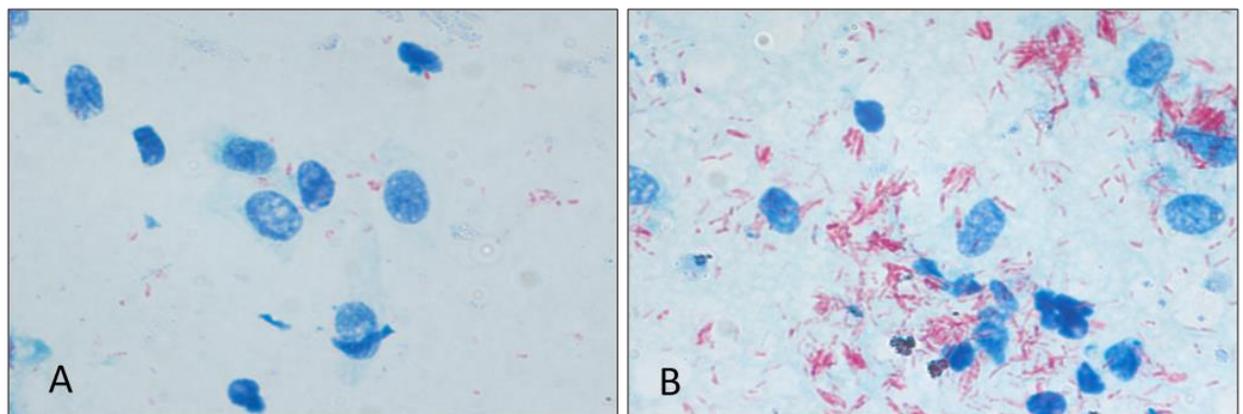


Figura 8: Baciloscopia de raspado intradérmico com presença de BAAR (com coloração vermelha). Índice baciloscópico imagem A: 4+; imagem B: 6+. Leitura no aumento: 100x.

Este método apresenta grande aplicabilidade na confirmação do diagnóstico de hanseníase multibacilar, possibilita a avaliação da eficácia do tratamento no acompanhamento dos pacientes, e pode auxiliar no diagnóstico de recidiva (WATERS, 2002)

1.7. EXAME ANATOMOPATOLÓGICO

Além da baciloscopia do raspado intradérmico, em alguns casos faz-se necessária a utilização do exame histopatológico da lesão. Além de permitir o diagnóstico e correta classificação (RIDLEY, 1966), este exame pode demonstrar se ainda há atividade na lesão mesmo depois do término do tratamento (JOSHI, 2011).

Assim como a manifestação clínica, a caracterização histopatológica da doença depende das características imunológicas do indivíduo (RIDLEY, 1974). No exame histopatológico é analisado um fragmento de lesão, obtidos através de biópsia, nele é possível observar a disposição das células da epiderme e derme, formação de granulomas e verificação das estruturas nervosa no fragmento de tecido. É possível observar também a presença e distribuição de BAAR, e que por se tratar de amostra com maior representatividade do que a baciloscopia de raspado intradérmico, apresenta maior percentual de positividade (SRINIVAS; SUNEETHA; RAO, 2002).

No polo tuberculóide, os pacientes da forma clínica clássica TT, apresentam no tecido granuloma de células epitelióides, com número importante de células linfocitárias, danos nos nervos da derme, ou aumento maciço de um feixe nervoso, presença de células gigantes de qualquer tipo, com BAAR variando de 0,0 a 1,0+ (Figura 09). Na forma clínica BT, há a presença de granuloma de células epitelióides com células gigantes, um número moderado de linfócitos, as estruturas nervosas periféricas podem estar moderadamente aumentadas. O índice baciloscópico desta peça varia de 0,0 a 2,5+ (Figura 09) (RIDLEY, 1974).

O polo intermediário BB apresenta também granuloma de células epitelióides, sem células gigantes, e poucos linfócitos espalhados difusamente, os nervos podem parecer de tamanho normal, podendo demonstrar a laminação do perineuro (ausente nas formas clínicas do polo tuberculóide) com infiltração de células epitelióides. O polo BB apresenta índice baciloscópico de 3,0 a 4,5+ (Figura 09) (RIDLEY, 1974).

Nas formas clínicas do polo lepromatoso, temos: caracterização do polo BL com granulomas de macrófagos com numerosos linfócitos compactados. Pode apresentar também pequeno aglomerado de células epitelióides. É possível observar a região de perineuro nos nervos com aspecto de camadas, como casca de cebola. A baciloscopia desta amostra varia entre 4,0 e 5,5+. No polo LL, é possível observar granuloma de macrófagos sem células epitelióides e sem muitos linfócitos, presença de macrófagos espumosos, nervos com perineuro

com pouca ou nenhuma infiltração. O índice baciloscópico da forma clínica varia de 5,5 a 6,0+ (Figura 09) (RIDLEY, 1974).

Nas lesões das manifestações clínicas mais iniciais os achados histológicos também são inespecíficos. Podem demonstrar infiltrados neurais inespecíficos, sem infiltrado neural suficiente para diagnóstico e classificação. Os bacilos na amostra podem ser raros ou ausentes. Nestes casos, o diagnóstico de hanseníase só deve ser dado se houver evidências suficiente (como o envolvimento nervoso e presença de bacilos álcool-ácido resistentes), pois os achados são inespecíficos trazendo a possibilidade de um diagnóstico equivocado (SCOLLARD et al., 2006).

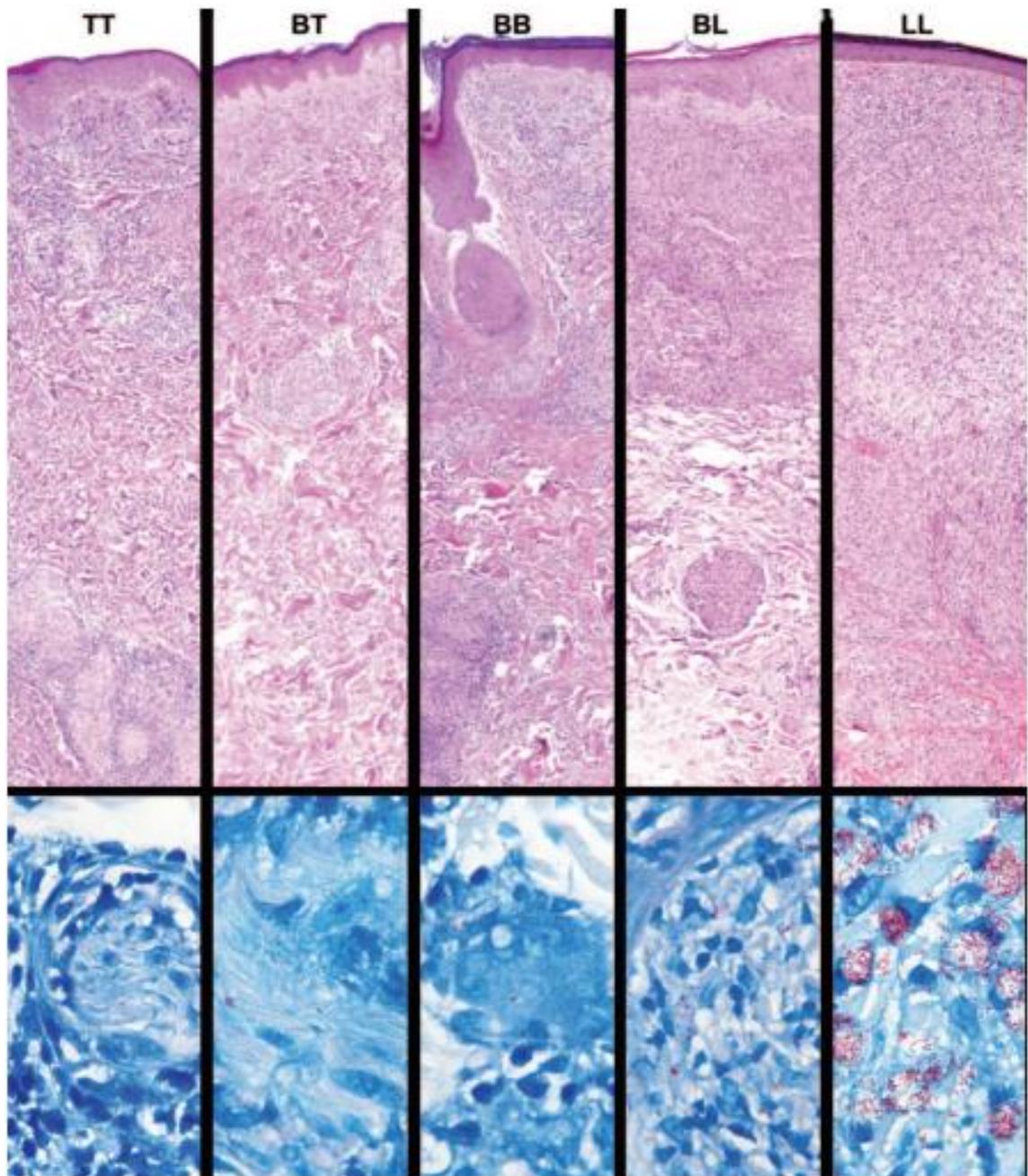


Figura 9: Exame Histopatológico nas diferentes formas clínicas. Fonte:(SCOLLARD et al., 2006)

1.8. EXAME SOROLÓGICO

A sorologia é outra importante ferramenta laboratorial para diagnóstico, monitoramento de eficácia de terapia, risco de recidiva da doença e na seleção dos contatos com maior risco de adoecer (MOURA et al., 2008). Essa metodologia apresenta a capacidade de detectar a resposta imune humoral do indivíduo frente ao *M. leprae*, apesar desta não ser uma resposta protetora (BARBOSA DE LIMA FONSECA et al., 2017). Dentre as moléculas estudadas, destaca-se o papel do Glicolipídio fenólico-I (PGL-I), antígeno de superfície, espécie-específico do *M.*

leprae que apresenta papel fundamental na patogenia da doença (SPENCER; BRENNAN, 2011).

Estudos sugerem que a titulação dos anticorpos Anti-PGL-I auxiliam na classificação dos pacientes em paucibacilar e multibacilar, por haver correlação com o índice baciloscópico (SCHURING et al., 2006), acompanhamento da eficácia da terapêutica (DOUGLAS et al., 1988), acompanhamento de contatos e detecção de hanseníase em estágios iniciais da doença, além de estudos de acompanhamento de populações, importantes principalmente em áreas endêmicas para a doença (BARRETO et al., 2015).

1.9. DIAGNÓSTICO MOLECULAR

As técnicas de identificação de material genético de microrganismos para diagnóstico são amplamente utilizadas nas doenças infecciosas (ACHARYA et al., 2020; TANG; OU, 2012; VALERO; MARTÍN-GÓMEZ; BUITRAGO, 2022). Para a hanseníase, o reconhecimento da região repetitiva espécie específica para *M. leprae* (RLEP), com 37 cópias no genoma (COLE; SUPPLY; HONORÉ, 2001), permitiu estudos avaliando esta região espécie específica do *M. leprae* através da técnica de reação da cadeia da polimerase (PCR), apontado como potencial marcador para o diagnóstico de hanseníase (YOON et al., 1993). Variações da PCR são amplamente estudadas, com a PCR em tempo real (qPCR), onde já foi demonstrado ser capaz de detectar até 10fg de DNA de *M. leprae* purificado, o equivalente à aproximadamente 300 bactérias no tecido analisado (YOON et al., 1993).

A biologia molecular também pode ser utilizada como ferramenta para o estudo da biologia do patógeno, já que este é um microrganismo não cultivável. Assim como também permite a pesquisa de mutações pontuais em genes específicos dentro do genoma. Por isso, através de técnicas de PCR, Sequenciamento de genes específicos, ou mesmo do genoma completo, permitem a análise de mutações em região de determinação de droga-resistência (DRDR) (WILLIAMS; GILLIS, 2012). Mutações em pontos específicos podem levar à resistência aos fármacos utilizados no tratamento, o que antes só era possível a partir da observação *in vivo*, com inoculação da cepa em pata de camundongo (PETTIT; REES, 1964a) a partir da suspeita clínica naqueles pacientes com quadros de recidiva da doença.

1.10. RESISTENCIA ANTIMICROBIANA

A resistência às drogas é atribuída a mutações que podem ocorrer nos genes codificantes de regiões alvo dos fármacos, e a partir da administração inadequada da medicação, as cepas sensíveis são eliminadas e as resistentes são selecionadas, desenvolvendo a partir de então uma

infecção por cepa resistente. Este processo é denominado de resistência secundária. Há também a possibilidade deste indivíduo transmitir esta cepa a outras pessoas, que podem desenvolver a doença a partir da cepa resistente, o que chamamos de resistência primária(WILLIAMS; GILLIS, 2012).

Segundo dados da OMS, do ano de 2010 a 2015, foram detectados 5,2% de resistência secundária e 2,1% de resistência primária(“WHO | A guide for surveillance of antimicrobial resistance in leprosy: 2017 update”, 2017). A dificuldade de obtenção e manutenção do *M. leprae* e os elevados custos dificultam a mensuração desta realidade. Os primeiros casos de resistência foram detectados e comprovados laboratorialmente no início da década de 1960, com resistência às sulfonas (PETTIT; REES, 1964b), e posteriormente à rifampicina(JACOBSON; HASTINGS, 1976), como já descrito anteriormente.

Apesar dos esforços, cepas multidroga-resistentes começaram a ser selecionadas(CAMBAU et al., 1997), e causar resistência primária (WILLIAMS et al., 2013). Este fato chama a atenção para a emergência de um novo problema associado à hanseníase, e alerta a necessidade do monitoramento destas cepas(NAKATA; KAI; MAKINO, 2012)

1.11. REGIÃO DE DETERMINAÇÃO DE DROGA-RESISTÊNCIA (DRDR)

A resistência bacteriana está associada a mutações em regiões específicas, conhecida como região de determinação de droga-resistência (DRDR), que abrange os genes *folP1*, *rpoB*, *gyrA* e *gyrB*, onde mutações nestes genes estão relacionadas com resistência à dapsona, rifampicina e às quinolonas respectivamente(WILLIAMS; GILLIS, 2012).

A dapsona atua como antagonista da enzima 6-hidroximetil-7,8-diidropteroato sintase (DHPS), responsável pela produção de folato interrompendo a produção de purinas, componentes das bases nitrogenadas Adenina e Guanina do DNA, interferindo assim, na divisão celular(OLIVEIRA et al., 2014). Mutações no códon 55 e 53 do gene *folP1* foram descritas como responsáveis por causar resistência contra dapsona(MATSUOKA, 2010).

A rifampicina atua na subunidade beta da RNA polimerase, que é codificada por *rpoB* no *M. leprae*, mutações no gene levam à mudança estrutural da RNA polimerase, o que impede a atuação do fármaco(WILLIAMS; GILLIS, 2012). Já foram descritas mutações nos códons 407, 409, 410, 420, 425, e 427 (MATSUOKA, 2010), no entanto, a mutação no códon 456 (WILLIAMS; GILLIS, 2012) se mostrou mais frequente nas cepas resistentes.

Nos casos em que há intolerância ou impossibilidade de utilizar as drogas da PQT, é necessário a utilização de um esquema substitutivo utilizando drogas de segunda linha, como fluoroquinolonas (ofloxacina), que interagem com as subunidades A e B da DNA girase, inibindo a atividade enzimática. Mutações que conferem resistência às fluoroquinolonas foram relatadas em *gyrA* (BELTRÁN-ALZATE et al., 2016; CAMBAU et al., 1997; YOKOYAMA et al., 2012a) e *gyrB* (DA SILVA ROCHA et al., 2012; TAKIFF et al., 1994; YOKOYAMA et al., 2012b).

1.12. OBJETIVO

1.12.1. Objetivo geral

Identificar o marcador laboratorial que apresenta maior sensibilidade e especificidade para o diagnóstico em casos iniciais de hanseníase, assim como conhecer geneticamente as cepas circulantes no Estado do Pará e avaliar a realidade da droga resistência na região

1.12.2. Objetivo Específico

- a) Correlacionar achados clínicos e laboratoriais de casos clássicos e não clássicos de hanseníase;
- b) Avaliar a biologia molecular como marcador laboratorial para diagnóstico de casos de hanseníase;
- c) Descrever perfil genotípico e de sensibilidade de cepas de *M. leprae* circulantes no Estado.
- d) Avaliar a dispersão de uma cepa multidroga resistente em um município do Estado do Pará.

2. METODOLOGIA

2.1. POPULAÇÃO AMOSTRAL

Foram avaliados pacientes que buscaram atendimento na Unidade de Referência Especializada em Dermatologia Sanitária DR. Marcello Candia (UREMC) entre os anos de 2015 e 2019, e aceitaram participar do projeto com assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Estes pacientes passaram por avaliação dermato-neurológica e coleta de amostra biológica. Após a confirmação do diagnóstico de hanseníase, seus contatos intradomiciliares foram convidados a comparecer à UREMC para avaliação neuro-dermatológica e laboratorial. Pacientes que apresentaram particularidades (Figura 10) foram selecionados como alvos de ações de busca ativa pela equipe multiprofissional, com a finalidade de exame de contatos. Os critérios de inclusão formam:

- i) Casos menores de 15 anos com hanseníase multibacilar e/ou algum grau de incapacidade;
- ii) Idosos portadores de hanseníase multibacilar, com dificuldade de locomoção e/ou muito contatos intradomiciliares para avaliação;
- iii) Pacientes com sucessivos quadros de reação/recidiva e/ou mais de um tratamento anterior; e
- iv) pacientes com suspeita ou confirmação laboratorial de resistência medicamentosa.



Figura 10: Crianças menores de 15 anos com hanseníase multibacilar e/ou algum grau de incapacidade física;

A partir destes critérios, foram visitadas residências nos municípios de Belém- Ilha do Combu, Cametá, Castanhal, Curralinho, Jacundá, Limoeiro do Ajuru, Maracanã, Marapanin,

Mocajuba, Nova Esperança do Piriá, Salvaterra, Santo Antônio do Tauá, São Caetano de Odivelas, São Miguel do Guamá (Figura 11).

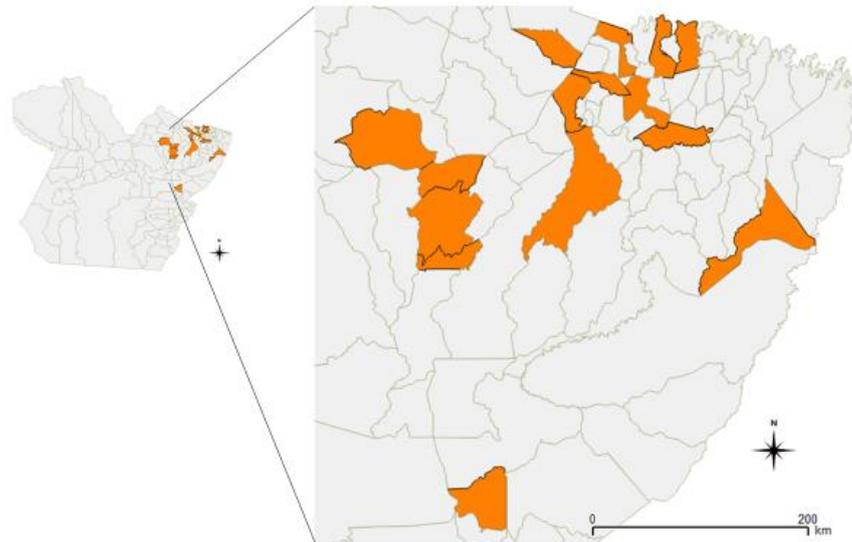


Figura 11: Distribuição geográfica das famílias visitadas pela equipe na busca ativa nos municípios de Belém- Ilha do Combu, Cametá, Castanhal, Curalinho, Jacundá, Limoeiro do Ajuru, Maracanã, Marapanim, Mocajuba, Nova Esperança do Piriá, Salvaterra, Santo Antônio do Tauá, São Caetano de Odivelas, São Miguel do Guamá

2.2. AVALIAÇÃO CLÍNICA

A avaliação clínica seguiu os critérios definidos no manual de diagnóstico da hanseníase do Ministério da Saúde (BRASIL MINISTÉRIO DA SAÚDE; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2018) e consistiu na busca por sinais e sintomas característicos da hanseníase, tais como máculas hipocrômicas ou eritematosas, infiltração e nódulos com alteração de sensibilidade, além da avaliação do grau de acometimento dos nervos periféricos. Todos os participantes passaram por avaliação dermatológica, onde o médico hansenologista analisou cuidadosamente a pele e nervos de cada indivíduo. Ao detectar a presença de lesões foi realizado o teste de verificação de alteração de sensibilidade utilizando o estesiômetro (VAN BRAKEL et al., 2003). Além do exame dermatológico, foi realizada a avaliação neurológica dos nervos trigêmeo, facial e auricular na face, nervo radial, radial cutâneo, mediano e ulnar nos membros superiores; nervo fibular, fibular superficial, tibial posterior e tibial nos membros inferiores (LEHMAN et al., 1997), como visto na figura 12.



Figura 12: Exames neuro-dermatológico realizados em todos os indivíduos participantes do estudo

2.3. DEFINIÇÃO DOS GRUPOS

Os indivíduos atendidos neste projeto foram divididos em quatro grupos: casos clássicos (n= 106), casos não clássicos, ou iniciais (n= 213), casos assintomáticos (n= 32) e contatos saudáveis (n= 482). Aqueles indivíduos que perceberam os sinais e sintomas clínicos da hanseníase, buscaram diagnóstico na UREMC, e na avaliação clínica apresentavam manifestações clínicas clássicas descritas por Ridley e Jopling (RIDLEY, 1966) foram denominados “casos clássicos”. O grupo de casos não clássicos ou iniciais foi composto por: i) casos diagnosticados na UREMC e que não apresentavam lesões de pele característicos das formas clássicas, ou as apresentavam nas formas iniciais; ii) contatos que apresentavam os sinais e sintomas clínicos, mas em suas formas iniciais, com ausência ou poucas queixas clínicas; iii) e indivíduos diagnosticados em ações de buscas ativas nos municípios de Castanhal e Acará. O grupo de casos assintomáticos é composto por indivíduos que conviviam com os casos e não apresentaram sinais e sintomas clínicos de hanseníase e que apresentaram baciloscopia de raspado intradérmico positiva. e o grupo “contatos saudáveis” é composto por contatos sem manifestações clínicas e com resultado de baciloscopia negativa

2.4. EXAMES LABORATORIAIS

Após a avaliação clínica, foi realizada a coleta de amostras biológicas dos participantes. Foram coletadas amostras de raspado intradérmico para baciloscopia e detecção molecular da região RLEP, sangue periférico para quantificação de anticorpos IgM Anti-PGL-I, e naqueles indivíduos que apresentavam lesões dermatológicas, foi realizada biópsia de pele para análise histopatológica, e para realização do sequenciamento do genoma completo para identificação

do perfil genotípico (SNP) e análise das regiões de determinação de droga resistência a antimicrobianos das cepas de *M. leprae* (Figura 13).

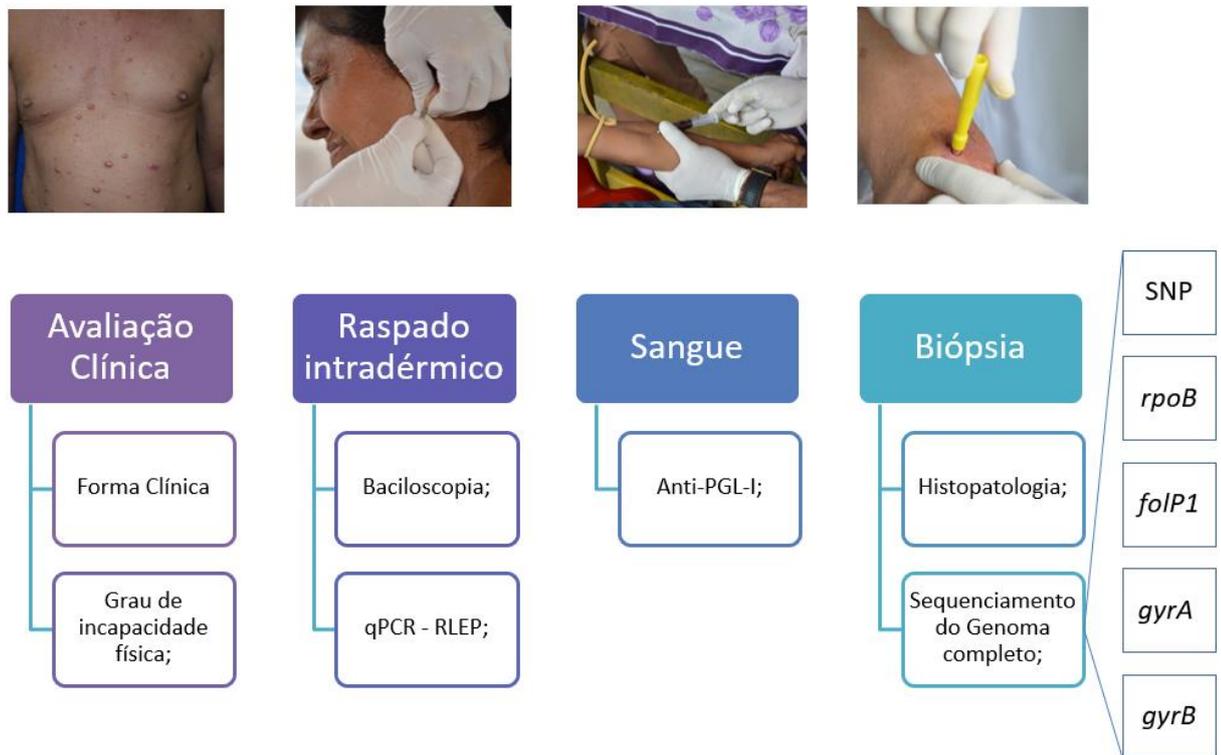


Figura 13: Fluxograma da avaliação e coleta de material biológico dos participantes do estudo.

2.4.1. Baciloscopia do raspado intradérmico

O exame baciloscópico do raspado intradérmico foi realizado em quatro pontos de coleta: os lóbulos auriculares direito e esquerdo, cotovelo direito e cotovelo esquerdo ou lesão de pele, se apresentasse lesão suspeita de lesão por hanseníase. A coleta foi realizada a partir de incisão na pele, após realização da isquemia local, com bisturi de aço de 5 mm de extensão e 3 mm de profundidade com lâmina de bisturi em aço carbono (n15) estéril. Após incisão, com o bisturi, foi realizado o movimento de raspagem da região intradérmica e obtenção do material biológico.

Este material biológico obtido foi distendido em lâmina de vidro, com movimento circulares obedecendo a ordem dos pontos de coleta. Após coleta, o material biológico foi corado com coloração de Ziehl-Nelsen à frio, e lido em microscópio óptico com objetiva de 100x.

Na leitura, foram lidos 100 campos de cada ponto de coleta. Os BAARs detectados foram contabilizados para determinação do IB, e o resultado foi emitido em cruces, obedecendo a escala logarítmica de Ridley (Tabela 1).

2.4.2. Detecção molecular da região RLEP do *Mycobacterium leprae* em raspado intradérmico

Simultaneamente à coleta do raspado intradérmico para baciloscopia, uma alíquota do raspado dos lóbulos auriculares foi coletada e fixada contendo etanol 70%. No laboratório, foi retirado o álcool, e a amostra foi reidratada com *phosphate buffered saline* (PBS) 1X, a partir de então, a extração do DNA foi realizada no raspado intradérmico de lóbulos auriculares usando o Kit *QIAGEN Tissue & Blood* (Cat. N° 69504), seguindo as recomendações do fabricante. A reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR), foi realizada com realizada utilizando os primers RLEP do *M. leprae* (LP1 (5'-GTGAGGGTAGTTGTT-3') e LP2 (5'-GGTGCGAATAGTT-3') (DONOGHUE; HOLTON; SPIGELMAN, 2001).

A qPCR foi realizada com a utilização do reagente SYBR green fluorescent, em um sistema de PCR em tempo real Applied Biosystems® 7500. A reação ocorreu com as seguintes especificações: 2 minutos a 95 ° C, mais 45 ciclos de 95 ° C por 15 segundos para desnaturação, 58 ° C por 15 segundos para recozimento e 72 ° C por 1 minuto para extinção. Uma curva de amplificação padrão foi preparada a partir do DNA purificado de *M. leprae* extraído após o processamento de coxim plantar de camundongos nude (seis meses após a inoculação). A curva padrão foi composta por cinco pontos e foi realizada por diluição em série (1:100 a 1:5000). Para garantir a especificidade da reação, foi utilizada a curva de melting de cada reação. Os resultados foram obtidos de acordo com o primeiro sinal de detecção no limiar do cycle threshold (Ct), criando um limiar automático de 0,2. Foram consideradas positivas as amostras com Ct menor ou igual a 45. A curva padrão foi realizada em cada placa e três amostras negativas foram adicionadas em cada experimento.

2.4.3. Sorologia Anti-PGL-I

Foi realizada a titulação de anticorpos IgM anti-PGL-I dos indivíduos através de um ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). Para isso, uma amostra de sangue periférico foi coletada em tubo com EDTA, e centrifugada para obtenção do plasma (GONÇALVES BARRETO et al., 2011). Para a realização do ensaio, foi utilizado 0,5 mg / poço de ND-O-HSA em 50 µl de solução de revestimento (NaHCO₃-8,4 mg / ml e Na₂CO₃-10,6 mg / ml, pH 9,6) em placas de 96 poços foram armazenados durante a noite em 4 °C. As placas foram bloqueadas por uma hora usando 300 µl / poço de PBS, pH 7,2, contendo albumina de soro bovino a 1% (BSA, Sigma-Aldrich A7906, St. Louis, MO, EUA). Um microlitro de amostra foi diluído (1:300) e foi adicionada aos poços em duplicado e incubada por 2 horas à temperatura ambiente. Após a incubação foi lavada com PBS-TWEEN 20 (0,5 µl / ml) e incubada com anticorpo IgM

anti-humano secundário conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich A0420, St. Louis, MO, EUA) a 1: 10.000. Após incubação e lavagem foram adicionados 100 µL de substrato de dicloridrato de o-fenilenodiamina (SIGMAFASTe OPD, Sigma-Aldrich P9187, St. Louis, MO, EUA). A reação foi parada com 50 µL de solução de ácido sulfúrico (4 N) e a absorvância foi lida a 490 nm, utilizando um leitor de microplacas MRX Revelation 4.25 (Dynex Technologies, Chantilly, VA, EUA). Uma amostra de plasma positiva com um paciente com hanseníase virchowiana de alto IB e uma amostra negativa de uma pessoa saudável nascida nos EUA, região de baixa endemia da doença, foram usadas como controle positivo e negativo. O ponto de corte para resultados positivos foi estabelecido a uma densidade óptica (DO) de 0,295.

2.4.4. Análise histopatológica

Para realização do exame histopatológico, foi realizada biópsia de lesões características de hanseníase. Com o auxílio de *punch* de 8mm, foi coletado um fragmento de pele da borda das lesões, quando planas, ou do centro, quando lesões nodulares. Após coleta, o fragmento de tecido foi armazenado em formol tamponado 10%, e armazenado a temperatura ambiente por no mínimo 24h, a amostra foi submetida ao processamento histopatológico, passando por etapas de desidratação, diafanização e inclusão, após o processo, os blocos foram montados, e cortados em micrótomo com espessura de 0,5 µm para montagem das lâminas.

Foram selecionadas duas lâminas provenientes de cada amostra. A primeira, foi realizada a coloração de hematoxilina e eosina (HE), para observação da disposição celular e tecidual da pele, e a coloração de Fite-Faraco (FARACO, 1938) avaliação da presença e quantificação de BAAR. As lâminas foram lidas e tiveram laudo emitido por médicos patologistas. A quantificação do BAAR se deu a partir da leitura de toda a peça histológica, e o resultado foi obtido com a contagem de BAAR e sua estimativa segundo a escala logarítmica de Ridley (Tabela 1) (RIDLEY, D .S; HILSON, 1967).

2.4.5. Detecção molecular da região RLEP do *Mycobacterium leprae* em lesão de pele

Para a detecção molecular da região RLEP do *Mycobacterium leprae* em lesão de pele, foi realizada biópsia de lesão com características de hanseníase. Com o auxílio de *punch* de 8mm, foi coletado um fragmento de pele da borda das lesões, quando planas, ou do centro, quando lesões nodulares. Após coleta, o fragmento de tecido foi armazenado em álcool 70%, em temperatura ambiente até serem enviadas para processamento no *École polytechnique fédérale de Lausanne*. Para extração do DNA do fragmento de biópsia foi utilizado o kit Tissue & Blood (QIAGEN). A presença de *M. leprae* foi avaliada por qPCR usando iniciadores RLEP do *M. leprae* LP1 (5'-GTGAGGGTAGTTGTT-3') e LP2 (5'-GGTGCGAATAGTT-3')

(DONOGHUE; HOLTON; SPIGELMAN, 2001), pela metodologia de PCR em tempo real, descrita anteriormente. Foram consideradas positivas as amostras com Ct menor ou igual a 40.

2.4.6. Coleta de material biológico para determinação do SNP e avaliação de Região de Droga-resistência

Foi selecionada uma lesão de pele, e dela realizada biópsia com punch de 8mm. A coleta foi realizada da borda das lesões, quando as lesões eram planas, ou do centro, quando as lesões eram nodulares. As amostras foram armazenadas em álcool 70%, em temperatura ambiente até serem enviadas para processamento no École polytechnique fédérale de Lausann.

2.4.7. Extração e sequenciamento do genoma completo do *Mycobacterium leprae* (WGS)

Para extração do DNA do fragmento de biópsia foi utilizado o kit Tissue & Blood (QIAGEN). A presença de *M. leprae* foi avaliada por qPCR usando iniciadores RLEP do *M. leprae* LP1 (5'-GTGAGGGTAGTTGTT-3') e LP2 (5'-GGTGCGAATAGTT-3') (DONOGHUE; HOLTON; SPIGELMAN, 2001), antes da preparação da biblioteca.

As bibliotecas foram preparadas a partir do DNA extraído foram usadas diretamente para sequenciamento. A qualidade da extração do DNA de *M. leprae* foi avaliada a partir da porcentagem de DNA de *M. leprae* presente na biblioteca inferida pelo alinhamento com a sequência do genoma de referência, com um limiar mínimo definido em 1%. Esse limite foi escolhido porque produz uma cobertura média do genoma de pelo menos 5 × por amostra em uma execução multiplexada de 10 amostras em uma pista HiSeq 2500 (produzindo cerca de 20 milhões de leituras por amostra e 100 bases por leitura) (BENJAK et al., 2018).

A partir dos genomas completos foram analisadas as sequências de caracterização de Polimorfismo de Nucleotídeo Único (SNP) para a tipagem molecular das cepas circulantes, além de permitir a análise das sequências dos genes relacionados a perfil de resistência já reconhecidos em *M. leprae* (MATSUOKA, 2010).

2.4.8. Análise estatística

Para a comparação das medianas dos resultados de cada teste foi realizado o teste Mann-Whitney, quando comparadas duas amostras não paramétricas independentes. E para avaliação da quantificação do teste laboratorial dentro dos grupos analisados, foi realizado o teste Kruskal-Wallis. Ambos os testes estatísticos e plotagem dos resultados em gráficos foram realizados no programa GraphPad prism® (versão 6.1).

A análise da concordância da capacidade de detecção dos testes laboratoriais em comparação ao exame clínica, foi avaliado pelo teste Kappa, utilizando o programa BioEstat

(versão 5.4). O coeficiente Kappa, determina o nível de concordância. Sendo Kappa <0: Não existe concordância; 0-0,20 concordância fraca; 0,21-0,4- concordância boa; 0,41- 0,60 concordância moderada; 0,61-0,80- concordância substancial; 0,81- 1,0 – concordância excelente. Para todas as análises, foi utilizado o nível de significância de 0,5 ($p \geq 0.005$).

3. RESULTADOS

No período de agosto de 2014 a outubro de 2018, foram avaliados 833 indivíduos, e 351 (33,8%) foram diagnosticados com hanseníase pela equipe, sendo 106/351 (30,2%) com manifestação clínica clássica, 245/351 (69,8%) casos com as manifestações clínicas não clássicas (Figura 12). 316 participaram da avaliação clínica simplificada, e 173/316 (54,7%) indivíduos apresentaram GI0, 100/316 (3,2%) apresentaram GI1 e 43/316 (13,6%) apresentaram GI2.

Dos 106 pacientes que apresentavam manifestação clínica clássica, 4/106 (3,8%) foram classificados nas formas paucibacilares, e 102/106 (95,3%) como multibacilares. Estes pacientes foram classificados em hanseníase TT = 4/106 (3,8%); BT = 31/106 (29,2%); BB = 7/106 (6,6%); BL = 32/106 (30,2%); LL = 31/106 (29,2%); e PNL = 2/106 (1,9%) (Figura 11B). Todos os pacientes das formas clínicas não clássicas foram considerados multibacilares, segundo a classificação de Madrid. A avaliação neurológica simplificada demonstrou que 36/106 (34,0%) apresentaram GI0; 44/106 (41,5%) GI1; e 27/106 (25,5%) GI2 (Figura 11C), nas formas clínicas não clássicas, o acometimento neurológico no diagnóstico foi de 136/210 (64,8%) indivíduos com GI0; 57/210 (27,1%) pacientes com GI1, e 17/210 (8,1%) pacientes com GI2 (Figura 13).

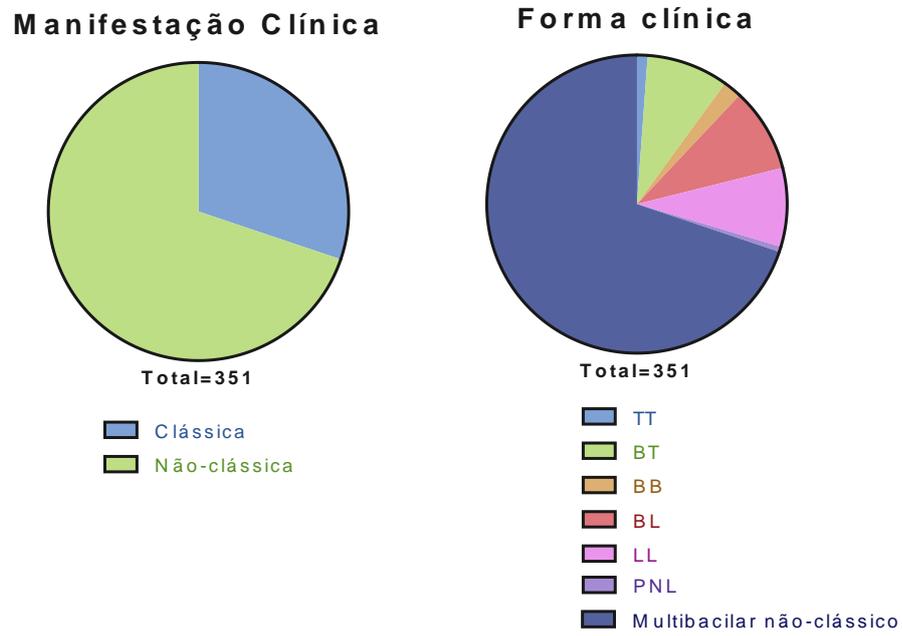


Figura 12: Manifestação clínica e forma clínica de pacientes diagnosticados com hanseníase

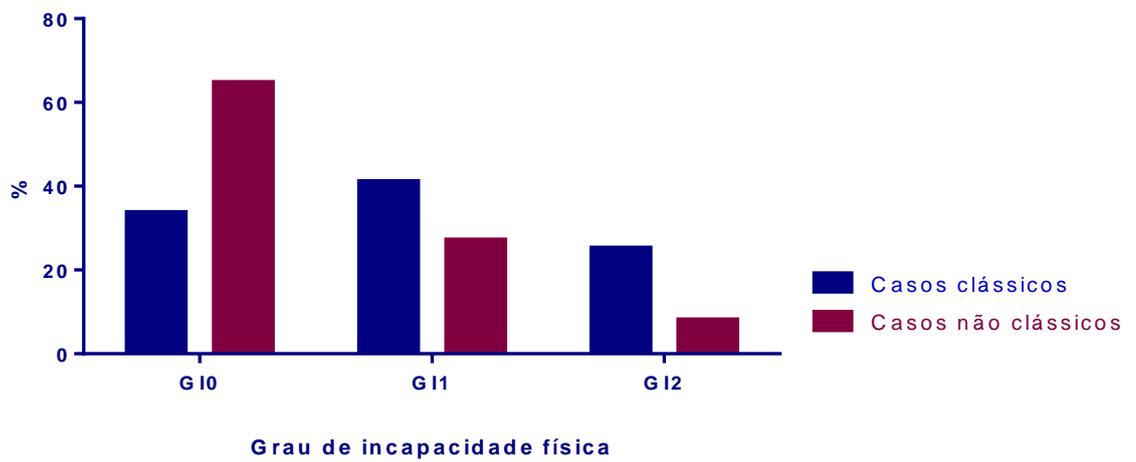


Figura 13: Grau de incapacidade física no diagnóstico de casos clássicos e não clássicos;

3.1. AVALIAÇÃO DE CONTATOS

Foram avaliados 688 contatos intradomiciliares e sociais dos pacientes avaliados na URE (n= 207), e contatos de pacientes que foram visitados em seus domicílios (n= 481). O percentual de detecção de casos de hanseníase na avaliação neuro-dermatológica foi de 172/688 (25%), correspondendo a igual percentual em cada uma das estratégias de avaliação de contatos, sendo 53/207 (25%) entre aqueles que se dirigiram à UREMC, e 119/481 (24,7%) entre o grupo de indivíduos que recebeu o grupo em seu respectivo domicílio.

Além dos indivíduos diagnosticados clinicamente, detectamos entre as pessoas expostas ao *M. leprae* aqueles sem manifestações clínicas, mas que apresentaram baciloscopia positiva (32/516; 6,2%). Esses indivíduos foram considerados indivíduos com hanseníase não clássica, e excluídos do grupo de contatos saudáveis, constituído então, por 484 pessoas.

3.2. BACILOSCOPIA DO RASPADO INTRADÉRMICO

O exame baciloscópico do raspado intradérmico foi realizado em 105/106 (99,0%) casos clássicos, e em 141/213 (66,2%) dos casos iniciais e a avaliação de contatos, permitiu a realização de 421/516 (81,6%) baciloscopias entres contatos intradomiciliares e sociais, tendo sido positivas 32/421 (7,6%) em indivíduos que não apresentaram nenhuma manifestação clínica sugestiva de hanseníase, sendo então definidos como casos assintomáticos de hanseníase. Os demais contatos 387/421 (91,9%) compuseram o grupo de contatos saudáveis na análise deste estudo.

A positividade da baciloscopia de raspado intradérmico nos casos foi de 41,7% (116/278), mas quando avaliamos separadamente os grupos de estudo, observamos percentuais diferentes. Sendo 68/105 (64,8%) em casos clássicos, e somente 11,3% (16/141) nos casos iniciais (Tabela 02), sendo os 32 casos assintomáticos definidos pela positividade na baciloscopia. O índice bacilar foi estatisticamente capaz de diferenciar casos clássicos tanto dos iniciais, e assintomáticos (Mann-Whitney, $p < 0,0001$) (Figura 14).

Tabela 2: Positividade da baciloscopia de raspado intradérmico em casos clássicos, iniciais e assintomáticos.

	Forma Clínica	Mediana (IB)	Positivo	%	Negativo	%	Total
Casos Clássicos	TT	0	0	0,0	4	100,0	4
	BT	0,75	3	10,0	27	90,0	30

	BB	1,25	6	85,7	1	14,3	7
	BL	3,75	31	96,9	1	3,1	32
	LL	4	28	93,3	2	6,7	30
	PNL	0	0	0,0	2	100,0	2
Total			68	64,8	37	35,2	105
Casos Não clássicos	I	0	0	0,0	4	100,0	4
	TT	0,5	1	50,0	1	50,0	2
	BT	0,5	7	6,7	97	93,3	104
	BB	1,6	2	40,0	3	60,0	5
	BL	0,75	3	100,0	0	0,0	3
	LL	3	2	66,7	1	33,3	3
	PNL	1	1	5,0	19	95,0	20
Total			16	11,3	125	88,7	141
Casos							
Assintomáticos		0,5	32	100	0	0	32

Legenda: I: hanseníase indeterminada; TT: hanseníase tuberculóide; BT: hanseníase bordeline-tuberculóide; BB: hanseníase bordeline-bordeline; BL: hanseníase bordeline-virchowiana; LL: hanseníase virchowiana; PNL: hanseníase primariamente neural;

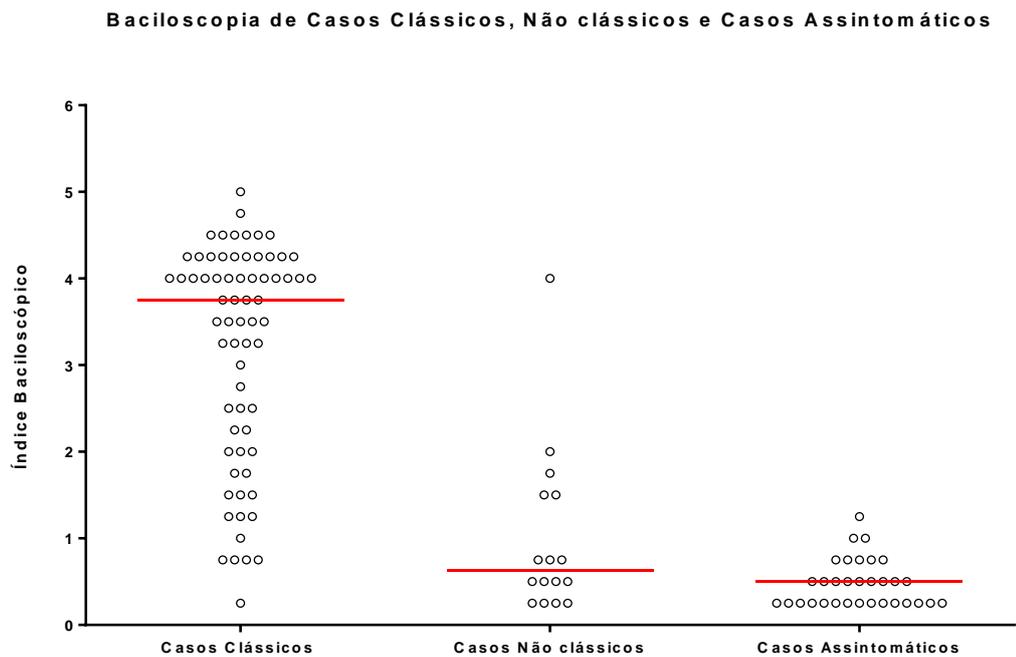


Figura 14: Baciloscopia de casos clássicos, não clássicos e casos assintomáticos.

3.3. SOROLOGIA IgM ANTI-PGL-I

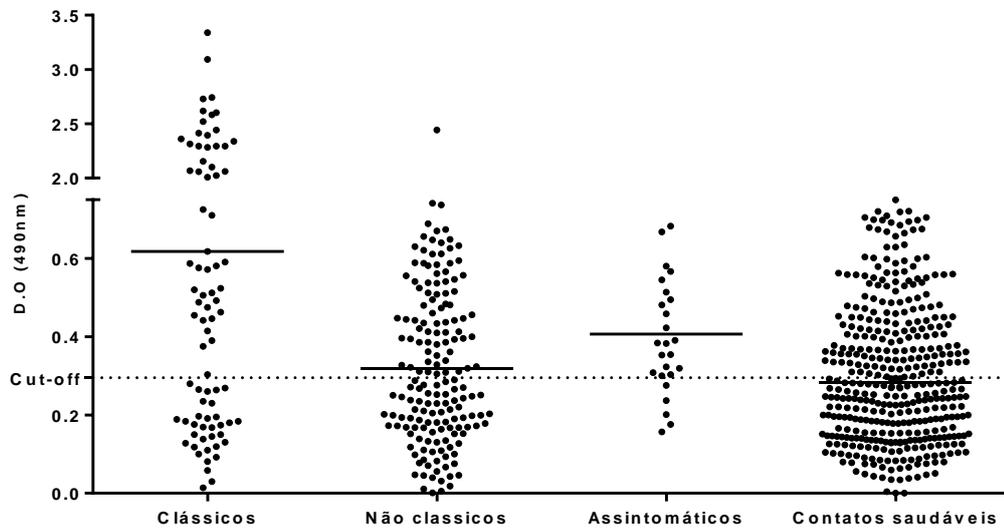
A positividade do anticorpo IgM Anti-PGL-I em indivíduos com hanseníase foi de 197/322 (60,8%), nos grupos de estudo o percentual foi de 74/107 (69,2%) em casos clássicos, com mediana de DO de 0,618. Nos casos não clássicos foi 98/185 (53%), com mediana de DO de 0,320, e naqueles sem manifestação clínica, os casos assintomáticos, o percentual foi de 25/30 (78,1%) e a mediana de DO foi de 0,407. O grupo de contatos saudáveis apresentou positividade em 119/416 (47,8%), com mediana de DO de 0,282 (Tabela 03). Na análise estatística pelo teste Mann-Whitney, foi possível observar diferença significativa na produção de anticorpos IgM anti-PGL-I dos casos clássicos quando comparados com casos iniciais ($p < 0,0001$), casos assintomáticos ($p = 0,046$), e com contatos saudáveis ($p < 0,0001$). Os casos assintomáticos apresentaram mediana de detecção significativamente do que os casos iniciais ($p = 0,0221$), e contatos saudáveis ($p = 0,0004$). O teste sorológico não foi capaz de distinguir casos iniciais de contatos saudáveis ($p = 0,1023$) (Figura 15).

Tabela 3: Positividade da sorologia IgM anti-PGL-I de casos clássicos, iniciais e contatos saudáveis

Sorologia Anti-PGL-I							
	Forma Clínica	Mediana (DO)	Positivo	%	Negativo	%	Total
Casos Clássicos	TT	0.184	1	25.0	3	75.0	4
	BT	0.189	13	41.9	18	58.1	31
	BB	0.506	5	71.4	2	28.6	7
	BL	1.507	26	81.3	6	18.8	32
	LL	1.145	28	90.3	3	9.7	31
	PNL	0.357	1	50.0	1	50.0	2
Total		0.618	74	69.2	33	30.8	107
Casos Não Clássicos		0.320	98	53.0	87	47.0	185
Casos Assintomáticos		0.407	25	78.1	5	16.7	30
Contatos saudáveis	Total	0.282	199	47.8	217	52.2	416

Legenda: I: hanseníase indeterminada; TT: hanseníase tuberculóide; BT: hanseníase bordeline-tuberculóide; BB: hanseníase bordeline-bordeline; BL: hanseníase bordeline-virchowiana; LL: hanseníase virchowiana; PNL: hanseníase primariamente neural;

Titulação de Anticorpos IgM Anti-PGL-I em Casos Clássicos, Não Clássicos e Contatos saudáveis



Teste Mann-Whitney	Casos		
	Clássicos	Não Clássicos	Assintomáticos
Casos Não clássicos (<i>p</i>)	< 0,0001		
Casos Assintomáticos (<i>p</i>)	0,046	0,0221	
Contatos Saudáveis (<i>p</i>)	< 0,0001	0,1023	0,0004

Figura 15: Titulação de anticorpos IgM Anti-PGL-I dos Casos Clássicos, Casos não clássicos, assintomáticos e Contatos saudáveis e análise estatística pelo teste Mann-Whitney ($p \leq 0,005$).

Na verificação da titulação dos casos segundo a forma clínica pelo teste Kruskal-Wallis, observamos que a mediana de detecção da forma clínica BL foi significativamente maior do que a titulação das formas clínicas I ($p= 0,0376$), BT ($p < 0,0001$), BB ($p < 0,0001$), PNL ($p < 0,0014$). E a mediana de detecção da forma clínica LL foi significativamente maior do que a titulação das formas clínicas I ($p= 0,0213$), TT ($p= 0,0470$), BT ($p < 0,0001$), BB ($p < 0,0001$), PNL ($p=0,0006$), e AL (0,0277) (Figura 16).

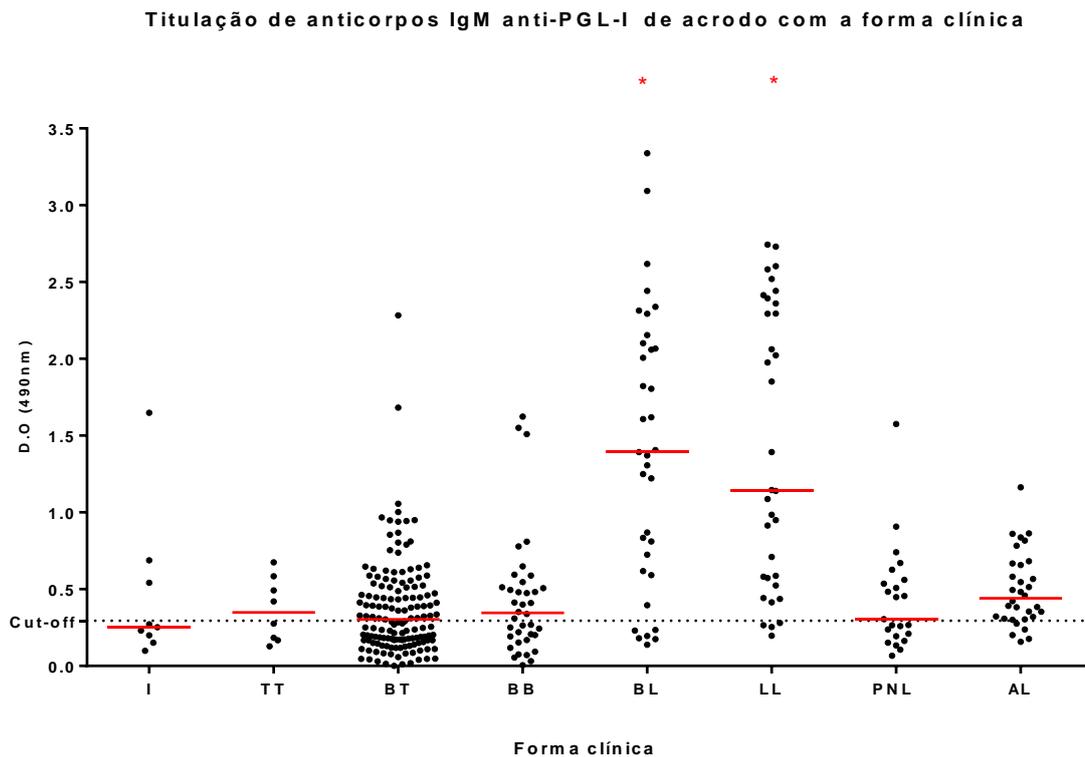


Figura 16: Detecção de Anticorpos IgM anti-PGL-I dos casos clássicos, iniciais e assintomáticos segundo a forma clínica

3.4. EXAME HISTOPATOLÓGICO DE LESÃO DE PELE

Foram realizadas 115 biópsias de lesão de pele, sendo 49/115 (42,6%) de indivíduos com as manifestações clínicas clássicas, e 66/116 (57,4%) de indivíduos nas formas iniciais. Na avaliação histopatológica, o exame demonstrou ser capaz de diagnosticar hanseníase em 29/116 (25,2%) dos casos, os demais laudos se mostraram inespecíficos, com resultados de dermatite granulomatosa 24/115 (20,9%), dermatite perivascular com 52/115 (45,2%) demonstrados na tabela 4.

Tabela 4: Diagnóstico histopatológico de lesões de pele de indivíduos diagnosticados com hanseníase.

Laudo histopatológico	Casos clássicos		Casos Iniciais		Total	
	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)
Hanseníase	27	56.3	2	3.0	29	25.2
Dermatite granulomatosa	12	25.0	12	17.9	24	20.9
Dermatite perivascular	7	14.6	44	65.7	51	44.3
Dermatite espongiótica	1	2.1	6	9.0	7	6.1
Rosácea granulomatosa	1	2.1	0	0.0	1	0.9
Dermatite psoriasiforme-espongiótica superficial	0	0.0	1	1.5	1	0.9
Líquen Plano	0	0.0	2	3.0	2	1.7
Total	48	100.0	67	100.0	115	100.0

A análise realizada nos grupos de estudo demonstrou diferença no diagnóstico dos casos clássicos e iniciais, aonde o diagnóstico de hanseníase foi 27/48 (56,3%) nos casos clássicos, e 2/67 (3,0%) nos casos não clássicos.

3.5. DETECÇÃO DA REGIÃO RLEP DO *M. leprae* EM RASPADO INTRADÉRMICO

O exame apresentou positividade em 253/322 (78,6%) indivíduos com diagnóstico de hanseníase. Sendo 103/105 (98,1%) em indivíduos classificados como casos clássico, e 150/270 (69,1%) nos casos não clássicos. Nos contatos clinicamente saudáveis a positividade foi de 128/433 (29,9%) (Figura 17). Nos casos clássicos a positividade nas formas clínicas TT (4/4), BB (7/7), BL (32/32) e LL (30/30) foi de 100%. Na forma clínica BT a positividade foi de 30/31 (96,8%), quanto o único indivíduo classificado como PNL não apresentou amplificação do RLEP (Tabela 2).

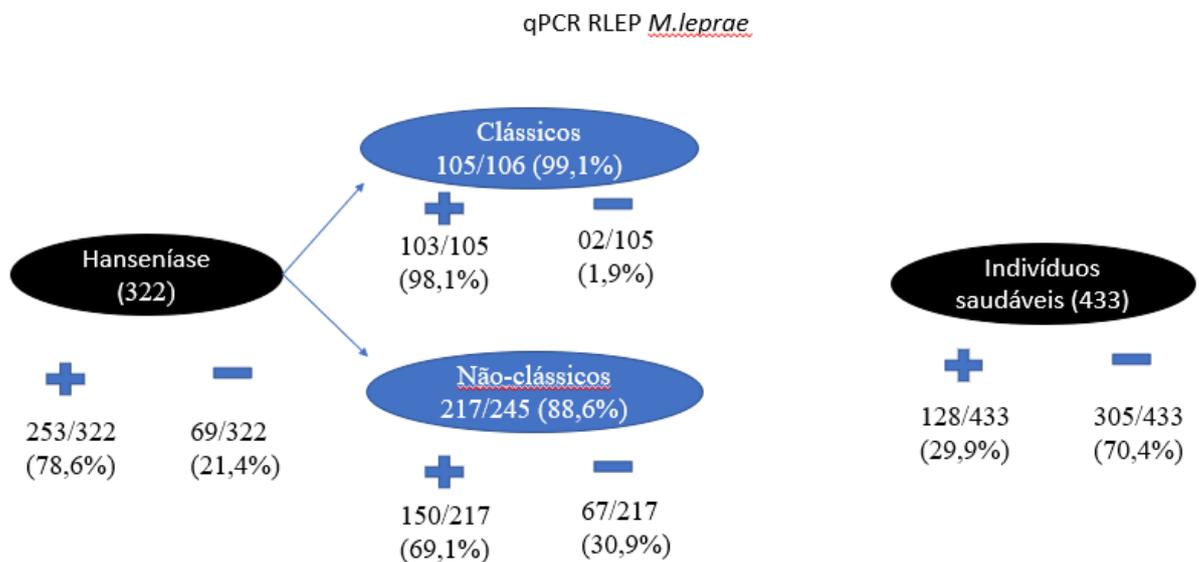


Figura 17: Positividade do exame de detecção da região RLEP por qPCR em raspado intradérmico

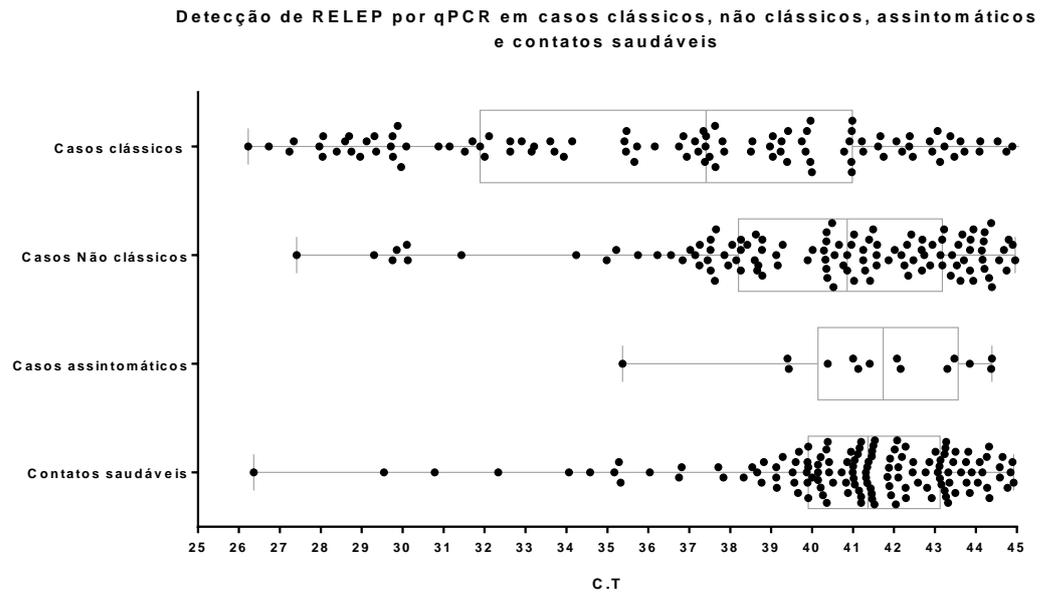
Na análise estatística, pelo teste Kruskal-Wallis, a comparação de mediana de CT de amplificação demonstrou que o grupo de casos clássicos (CT= 37,4) pôde ser diferenciado dos casos iniciais (CT= 40,8) com $p \leq 0,0001$, dos casos assintomáticos (CT= 41,7) com $p = 0,0022$, e dos contatos clinicamente saudáveis (CT= 41,3) com $p \leq 0,0001$. Os outros grupos se apresentaram semelhantes na comparação da mediana, conforme demonstrado na figura 18. Quando avaliamos a mediana de CT de detecção entre as formas clínicas, detectamos que as

formas clínicas BL e LL foram diferentes estatisticamente da forma clínica BT, casos assintomáticos e contatos saudáveis. Os demais grupos foram semelhantes entre si (Figura 19).

Tabela 5: Positividade de detecção de RLEP por qPCR nos grupos casos clássicos, não clássicos e contatos saudáveis.

Detecção de RLEP por qPCR								
	Forma Clínica	Mediana (C.T)	Positivo	%	Negativo	%	Total	
Casos Clássicos	TT	36.1	4	100.0	0	0.0	4	
	BT	40.7	30	96.8	1	3.2	31	
	BB	37.7	7	100.0	0	0.0	7	
	BL	34.2	32	100.0	0	0.0	32	
	LL	34.9	30	100.0	0	0.0	30	
	PNL			0	0.0	1	100.0	1
Total		37.4	103	98.1	2	1.9	105	
Casos não clássicos		40.8	110	62.1	67	37.9	177	
Casos Assintomáticos		41.7	14	45.2	17	54.8	31	
Contatos Saudáveis		Total	41.3	128	29.6	305	70.4	433

Legenda: I: hanseníase indeterminada; TT: hanseníase tuberculóide; BT: hanseníase bordeline-tuberculóide; BB: hanseníase bordeline-bordeline; BL: hanseníase bordeline-virchowiana; LL: hanseníase virchowiana; PNL: hanseníase primariamente neural; AL: hanseníase assintomática



Teste Kruskal-Wallis			
	Casos oligossintomáticos	Casos assintomáticos	Contatos saudáveis
Casos clássicos (p)	< 0.0001	0,0022	< 0.0001
Casos não clássicos (p)		> 0.9999	0,9606
Casos assintomáticos (p)			> 0.9999

Figura 18: Deteccção e CT de amplificação da região RELEP em casos clássicos, não clássicos, assintomáticos e contatos clinicamente saudáveis.

Amplificação da região RLEP em raspado intradérmico de lóbulo auricular de casos clássicos, não clássicos, assintomáticos e contatos saudáveis

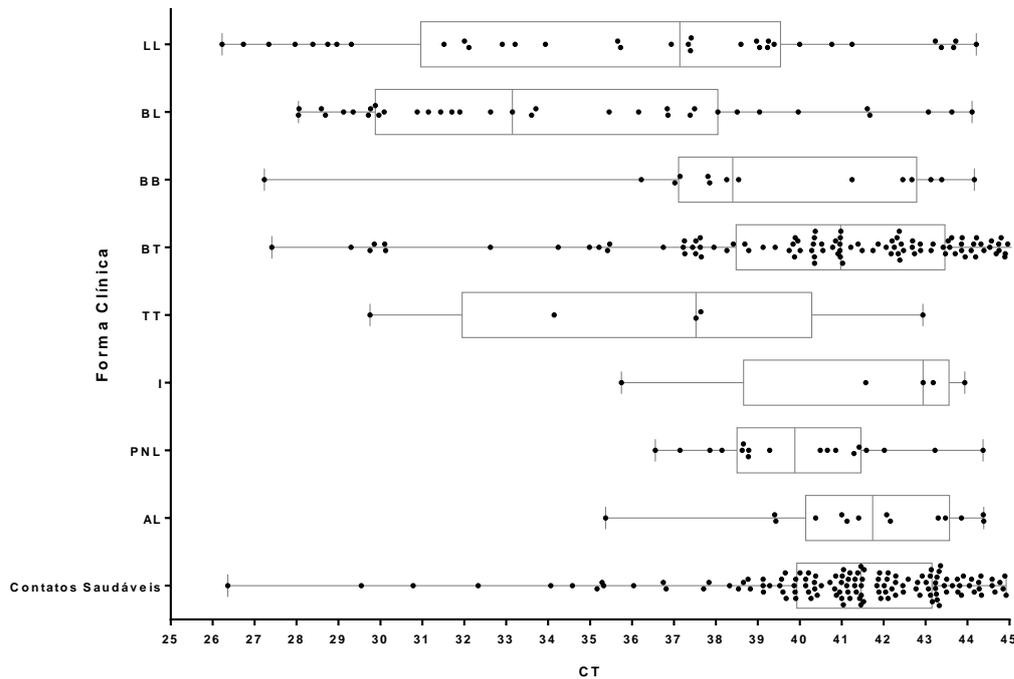


Figura 19: Detecção da amplificação da região RLEP segundo as formas clínicas, indivíduos assintomáticos e contatos saudáveis

3.6. DETECÇÃO DA REGIÃO RLEP DO *M. leprae* EM BIÓPSIA DE PELE

Foi realizada detecção molecular de RLEP nos fragmentos de lesão de pele em 175 pacientes diagnosticados clinicamente com hanseníase. A positividade do exame foi de 101/175 (57,7%), e quando consideramos os grupos, observamos que a positividade foi de 85/104 (81,7%) em casos com as manifestações clínicas clássicas, e 16/71 (22,5%) entre aqueles pacientes com manifestações iniciais da hanseníase (Tabela 06).

Nos casos clássicos, o maior percentual de positividade foi nos pacientes do polo virchowiano, com positividade de 30/30 (100%), e 29/32 (90,6%) nas formas clínicas LL e BL respectivamente, apresentando decaimento do percentual conforme a forma clínica se aproxima do polo TT, com positividade de 18/30 (60,0%) e 3/4 (75,0%) nas formas clínicas BT e TT respectivamente. Considerando as formas clínicas dos casos iniciais, a positividade variou de 0/1 (0%) nos pacientes da forma clínica BB e LL, a 2/3 (66,7%) na forma clínica TT (Tabela 06).

Tabela 6: Detecção de RLEP por qPCR em lesão de pele em pacientes com hanseníase

Detecção de RLEP em lesão de pele						
	Forma Clínica	Positivo	%	Negativo	%	Total
Casos Clássicos	TT	3	75,0	1	25,0	4
	BT	18	60,0	12	40,0	30
	BB	5	71,4	2	28,6	7
	BL	29	90,6	3	9,4	32
	LL	30	100,0	0	0,0	30
	PNL	0	0,0	1	100,0	1
Total		85	81,7	19	18,3	104
Casos Não Clássicos		16	22,5	55	77,5	71
Total de casos de hanseníase		101	57,7	74	42,3	175

Legenda: I: hanseníase indeterminada; TT: hanseníase tuberculóide; BT: hanseníase bordeline-tuberculóide; BB: hanseníase bordeline-bordeline; BL: hanseníase bordeline-virchowiana; LL: hanseníase virchowiana; PNL: hanseníase primariamente neural; AL: hanseníase assintomática

3.7. CORRELAÇÃO DA DETECÇÃO DE RLEP POR qPCR E OS DEMAIS EXAMES LABORATORIAIS

A avaliação da correlação entre a positividade do índice baciloscópico e o Ct de amplificação da detecção de RLEP pela técnica de qPCR, demonstrou correlação moderada ($r=-0,51$) entre o aumento do índice baciloscópico e a diminuição do Ct ($p<0,001$; $r^2=0,2640$) (Tabela 07 e Figura 20), havendo diferença estatística ($p<0,05$) apenas no Ct de detecção dos pacientes com IB 0, quando comparados com pacientes com IB 4 e 5, e pacientes com IB 1, também quando comparados com pacientes com IB 4 e 5, pelo teste estatístico Kruskal-Wallis (Figura 21).

Tabela 7: Detecção de RLEP por qPCR de acordo com a baciloscopia nas formas clínicas

Forma clínica	Baciloscopia	RLEP Positivo		RLEP Negativo		TOTAL
		n	%	n	%	N
I (n= 4)	Positivo	0	0,0	0	0,0	0
	Negativo	4	100,0	0	0,0	4
TT (n=6)	Positivo	0	0,0	1	100,0	1
	Negativo	5	100,0	0	0,0	5
BT (n=124)	Positivo	8	80,0	2	20,0	10
	Negativo	84	73,7	30	26,3	114
BB (n=10)	Positivo	7	100,0	0	0,0	7
	Negativo	2	66,7	1	33,3	3
BL (n=35)	Positivo	34	100,0	0	0,0	34
	Negativo	1	100,0	0	0,0	1

LL (n=33)	Positivo	30	100,0	0	0,0	30
	Negativo	3	100,0	0	0,0	3
PNL (n=20)	Positivo	0	0,0	0	0,0	0
	Negativo	14	70,0	6	30,0	20
AL (n=31)	Positivo	14	45,2	17	54,8	31

Legenda: I: hanseníase indeterminada; TT: hanseníase tuberculóide; BT: hanseníase bordeline-tuberculóide; BB: hanseníase bordeline-bordeline; BL: hanseníase bordeline-virchowiana; LL: hanseníase virchowiana; PNL: hanseníase primariamente neural; AL: hanseníase assintomática

Correlação entre Índice baciloscópico e CT de amplificação de RLEP por qPCR de indivíduos com hanseníase

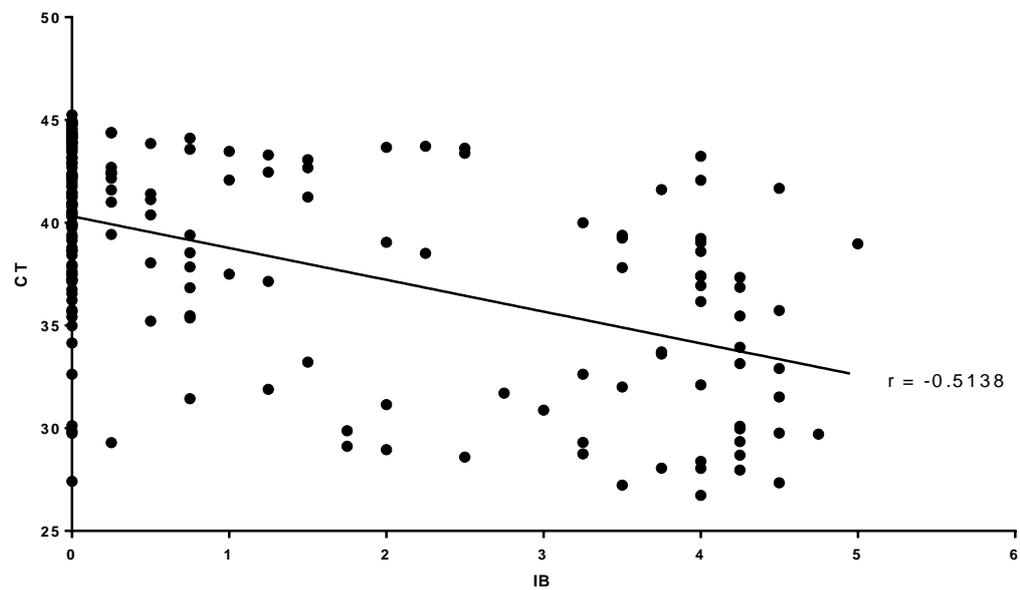


Figura 20: Correlação entre índice Baciloscópico e CT de amplificação de RLEP por qPCR de indivíduos diagnosticados com hanseníase

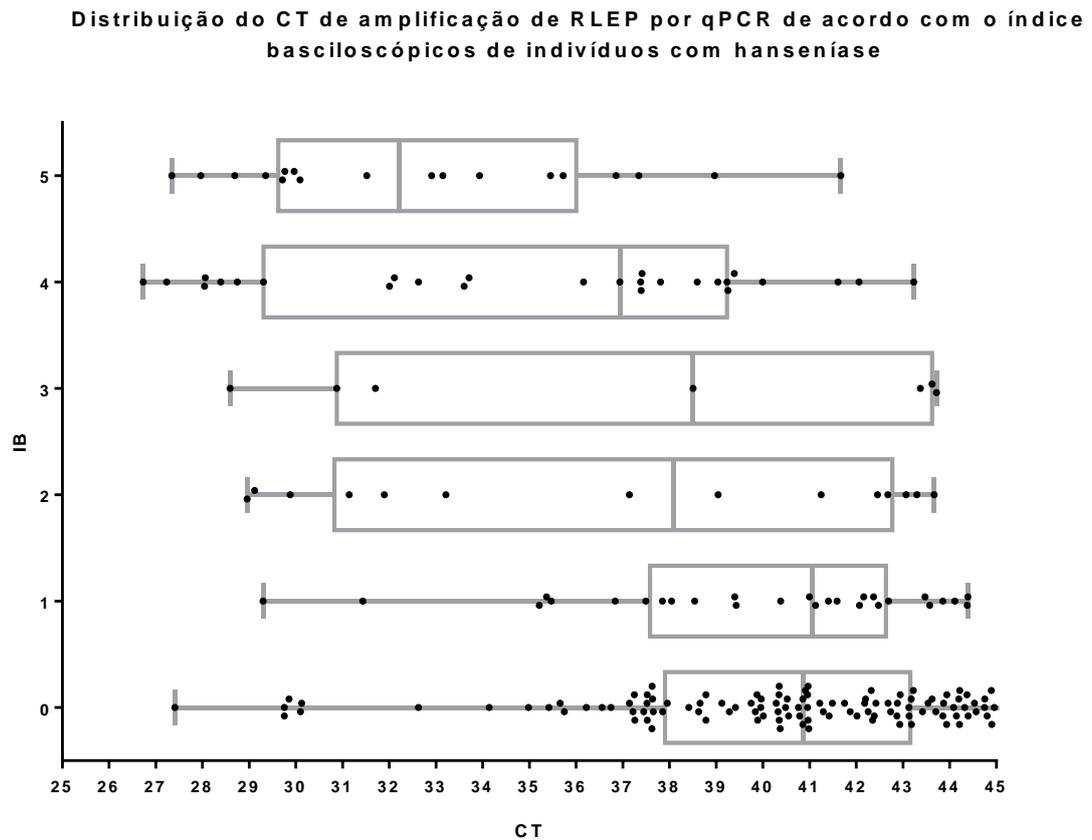


Figura 21: Distribuição do CT de amplificação de RLEP de acordo com o índice baciloscópico de indivíduos diagnosticados com hanseníase

Foi realizada a comparação da detecção de anticorpos Anti-PGL-I e a detecção molecular de 289 indivíduos com hanseníase e 381 contatos. A avaliação da relação da positividade da sorologia IgM Anti-PGL-I com a positividade do RLEP em raspado intradérmico demonstrou que foi possível detectar o DNA do bacilo em pacientes mesmo quando a sorologia se apresentou negativa (74,5% - 79/106), como demonstrado na tabela 08. A regressão linear que compara o Ct de amplificação e a D.O de leitura do exame Elisa Anti-PGL-I demonstrou correlação moderada ($r = -0,4477$) entre a diminuição do C.T e o aumento da D.O de leitura da sorologia ($p < 0,0001$; $r^2 = 0,2005$) (Figura 22).

Tabela 08: Positividade de RLEP por qPCR de acordo com a detecção de anticorpos Anti-PGL-I segundo as formas clínicas.

Forma clínica	Resultado	IgM Anti-PGL-I		RLEP Positivo		RLEP Negativo	
		n	%	n	%	n	%
I (n= 7)	Positivo	2	28,6	2	100,0	0	0,0
	Negativo	5	71,4	3	60,0	2	40,0

TT (n= 7)	Positivo	3	42,9	2	66,7	1	33,3
	Negativo	4	57,1	3	75,0	1	25,0
BT (n= 132)	Positivo	69	52,3	49	71,0	20	29,0
	Negativo	63	47,7	49	77,8	14	22,2
BB (n=23)	Positivo	14	60,9	9	64,3	5	35,7
	Negativo	9	39,1	5	55,6	4	44,4
BL (n=35)	Positivo	29	82,9	29	100,0	0	0,0
	Negativo	6	17,1	6	100,0	0	0,0
LL (n=34)	Positivo	30	88,2	30	100,0	0	0,0
	Negativo	4	11,8	4	100,0	0	0,0
PNL (n=22)	Positivo	12	54,5	10	83,3	2	16,7
	Negativo	10	45,5	6	60,0	4	40,0
AL (n=29)	Positivo	24	82,8	9	37,5	15	62,5
	Negativo	5	17,2	3	60,0	2	40,0
Contatos Saudáveis (n= 381)	Positivo	187	49,1	48	25,7	139	74,3
	Negativo	194	50,9	73	37,6	121	62,4

Legenda: I: hanseníase indeterminada; TT: hanseníase tuberculóide; BT: hanseníase bordeline-tuberculóide; BB: hanseníase bordeline-bordeline; BL: hanseníase bordeline-virchowiana; LL: hanseníase virchowiana; PNL: hanseníase primariamente neural; AL: hanseníase assintomática

Correlação entre Anti-PGL-I e CT de amplificação de RLEP por qPCR de indivíduos com hanseníase

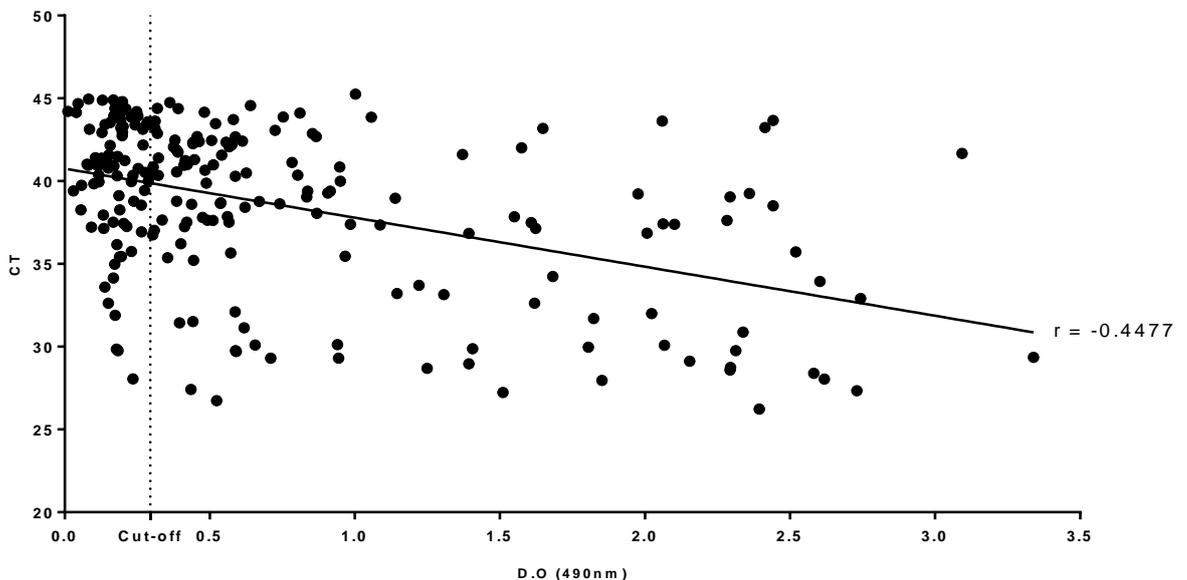


Figura 22: Correlação entre D.O do ELISA IgM Anti-PGL-I e C.T de detecção de RLEP em raspado intradérmico

Foi realizada a correlação entre a detecção de RLEP em nas amostras de lesão de pele e raspado intradérmico de 162 indivíduos diagnosticados com hanseníase. A positividade em

lesão de pele foi 98/162 (60,5%), enquanto a positividade em raspado intradérmico foi de 139/162 (85,8%). A detecção de RLEP em raspado intradérmico foi capaz de identificar o DNA do *M. leprae* em indivíduos com hanseníase, mesmo quando o material genético do patógeno não era detectável na lesão de pele. O percentual de detecção nos casos RLEP de lesão de pele negativo e RLEP de raspado intradérmico positivo variou de 50 % nas formas clínicas I (1/2), e PNL (2/4), a 100% nas formas clínicas TT (1/1) e LL (2/2) (Tabela 09)

Tabela 09: Positividade de RLEP em raspado intradérmico por qPCR de acordo com a detecção de RLEP em lesão de pele segundo as formas clínicas.

Forma clínica	RLEP lesão de pele	RLEP SSS +		RLEP SSS -		TOTAL n
		n	%	n	%	
I (n= 3)	Positivo	0	0,0	1	100,0	1
	Negativo	1	50,0	1	50,0	2
TT (n=6)	Positivo	4	80,0	1	20,0	5
	Negativo	1	100,0	0	0,0	1
BT (n=67)	Positivo	24	92,3	2	7,7	26
	Negativo	32	78,0	9	22,0	41
BB (n=16)	Positivo	5	83,3	1	16,7	6
	Negativo	6	60,0	4	40,0	10
BL (n=33)	Positivo	29	100,0	0	0,0	29
	Negativo	3	75,0	1	25,0	4
LL (n=32)	Positivo	30	100,0	0	0,0	30
	Negativo	2	100,0	0	0,0	2
PNL (n=5)	Positivo	0	0,0	1	0,0	1
	Negativo	2	50,0	2	50,0	4
Total		139	85,8	23	14,2	162

Legenda: I: hanseníase indeterminada; TT: hanseníase tuberculóide; BT: hanseníase bordeline-tuberculóide; BB: hanseníase bordeline-bordeline; BL: hanseníase bordeline-virchowiana; LL: hanseníase virchowiana; PNL: hanseníase primariamente neural;

Naqueles que receberam diagnóstico histopatológico de hanseníase, a detecção molecular do RLEP em raspado intradérmico e lesão de pele foi 96,6% (28/29), a análise dos grupos demonstrou que o percentual por grupo foi respectivamente: 100% (27/27) e 96,3 (26/27) em casos clássicos, e 50% (1/2) e 100% (2/2) em casos iniciais (Tabela 11), enquanto que aqueles indivíduos com hanseníase, que não foram diagnosticados pela análise histopatológica, se considerássemos a detecção do RLEP raspado intradérmico, alcançaríamos 100% dos casos clássicos diagnosticados como dermatite granulomatosa (12/12), dermatite espongiótica (1/1), e 87,5% (7/8) dos casos clássicos classificados como dermatite perivascular. Já nos casos não clássicos, se o diagnóstico tivesse sido guiado pela detecção do

RLEP em raspado intradérmico, um exame menos invasivo do que uma coleta de biópsia, teria sido diagnosticado 41,7 % (5/9) daqueles pacientes que receberam diagnóstico de dermatite granulomatosa, 25% (11/19) pacientes com diagnóstico de dermatite perivascular, e 50% (1/2) diagnosticado como dermatite espongiótica (Tabela 10).

Quando avaliamos a positividade das lesões de pele quanto ao marcador RLEP em casos não clássicos, detectamos que o percentual de positividade foi maior do que a detecção no raspado intradérmico apenas nos casos diagnosticados como hanseníase pelo exame histopatológico. Naqueles indivíduos que não teriam diagnóstico pela histopatologia, o raspado intradérmico apresentou maior percentual de positividade do que o PCR da lesão. Um viés importante nestas análises consiste no C.T máximo de leitura das biópsias de pele, uma vez que as qPCRs de lesão foram realizadas no *École polytechnique fédérale de Lausanne*, aonde adotam C.T máximo de 40 ciclos. Enquanto nossa padronização de técnica permite a leitura até 45 ciclos, o que foi utilizado para análise do raspado intradérmico.

Tabela 10: Positividade do marcador molecular RLEP em raspado intradérmico e fragmento de lesão de pele

Laudo histopatológico			Casos clássicos		Casos Iniciais		Total	
			(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)
Hanseníase	Histopatológico		27	54	2	3	29	25
	RLEP SSS	Positivo	27	100	1	50	28	96,6
		Negativo	0	0	1	50	1	3,4
	RLEP SL	Positivo	26	96,3	2	100	28	96,6
		Negativo	1	3,7	0	0	1	3,4
Dermatite granulomatosa	Histopatológico		12	24	12	18,2	24	20,7
	RLEP SSS	Positivo	12	100	5	41,7	17	70,8
		Negativo	0	0	4	33,3	4	16,7
	RLEP-SL	Positivo	11	91,7	1	8,3	12	50
		Negativo	1	8,3	5	41,7	6	25
Dermatite perivascular	Histopatológico		8	16	44	66,7	52	44,8
	RLEP SSS	Positivo	7	87,5	11	25	18	34,6
		Negativo	1	12,5	19	43,2	20	38,5
	RLEP-SL	Positivo	4	50	4	9,1	8	15,4
		Negativo	4	50	21	47,7	25	48,1
Dermatite espongiótica	Histopatologia		1	2	6	9,1	7	6
	RLEP SSS	Positivo	1	100	1	16,7	2	28,6

		Negativo	0	0	1	16,7	1	14,3
	RLEP-SL	Positivo	0	0	0	0	0	0
		Negativo	1	100	3	50	4	57,1
	Histopatológico		1	2	2	3	3	2,6
Outros diagnósticos	RLEP SSS	Positivo	1	100	0	0	1	33,3
		Negativo	0	0	0	0	0	0
	RLEP-SL	Positivo	1	100	0	0	1	33,3
		Negativo	0	0	0	0	0	0

RLEP SSS = Raspado intradérmico RLEP SL = Lesão de pele =

Apesar do percentual de detecção de RLEP em raspado intradérmico e fragmento de lesão ser semelhante nos indivíduos com diagnóstico clínico e histopatológico, nos grupos com diagnóstico inespecífico, a detecção do RLEP do raspado intradérmico se mostrou uma importante ferramenta para direcionamento do diagnóstico, uma vez que a positividade em casos com outros diagnósticos no exame histopatológico.

Quando comparados os exames laboratoriais, verificamos que a amplificação da região RLEP do *M. leprae* apresentou maior positividade entre os casos de hanseníase, chegando a 227/313 (72,5%), seguido do exame sorológico IgM anti-PGL-I, com 197/322 (61,2%) e detecção em fragmento de pele com 101/175 (57,7%) de positividade. Enquanto os exames considerados padrão ouro de detecção, baciloscopia do raspado intradérmico e histologia de lesão, apresentaram positividade de 116/278 (41,7%) e 29/115 (25,2%) respectivamente (Tabela 11).

Quando avaliamos os grupos separadamente, a detecção molecular do *M. leprae* em raspado intradérmico de lóbulos auriculares também apresentou maior percentual de positividade dentre os exames realizados nos grupos casos clássicos e iniciais. Nos casos clássicos, a detecção da região RLEP em raspado intradérmicos de lóbulos auriculares foi de 103/105 (98,1%), o segundo exame com a maior positividade foi a detecção da região RLEP no fragmento de pele, com 16/71 (81,7%), a sorologia IgM anti-PGL-I foi positiva em 74/107 (69,2%) dos casos clássicos, e na sequência, os exames baciloscopia de raspado intradérmico, com positividade em 68/105 (64,8%), e 27/48 (56,2%) na histopatologia de lesão de pele (Tabela 11).

Nos casos não clássicos, a detecção da região RLEP por qPCR em amostra de raspado intradérmico foi de 110/177 (62,1%), seguido titulação de anticorpos anti-PGL-I, com percentual de positividade de 98/185 (53,0%), seguido da detecção molecular da região RLEP

em fragmento de lesão de pele, com positividade de 16/71 (22,5%). A baciloscopia de raspado intradérmico e histopatologia de lesão apresentaram os percentuais de positividade mais baixos, 16/141 (11,3%) e 2/67 (3,0%) respectivamente (Tabela 11).

O exame com maior positividade nos casos assintomáticos foi a sorologia anti-PGL-I 25/30 (83,3%), seguido da detecção da região RLEP, com positividade de 14/31 (45,2%). No grupo de indivíduos contatos saudáveis, detectamos 199/416 (47,8%) dos contatos com sorologia positiva para o anticorpo anti-PGL-I, e 128/434 (29,5%) de indivíduos positivos na detecção molecular do *M. leprae* em raspado intradérmico de lóbulo auricular (Tabela 12).

Como a positividade da baciloscopia do raspado intradérmico foi considerada critério para o diagnóstico dos contatos que não apresentavam sinais e sintomas clínicos, os casos assintomáticos, e o seu resultado negativo utilizado como critério para inclusão dos indivíduos no grupo de contatos saudáveis, a positividade deste exame não pode ser considerada para análise estatística nestas duas populações.

A capacidade dos exames laboratoriais em detectar um caso de hanseníase foi avaliada a partir do cálculo da sensibilidade. Dentre os exames avaliados, o que apresentou maior sensibilidade, foi a detecção da região RLEP, por qPCR em amostra de raspado intradérmico (72,5%), o segundo exame com maior sensibilidade foi a qPCR de RLEP em biópsia de lesão de pele (65,8%), a sorologia apresentou sensibilidade de 61,2%, enquanto a baciloscopia de raspado intradérmico apresentou sensibilidade de 41,7% e a sensibilidade da histopatologia da lesão de pele foi de 25,0%.

Tabela 11: Percentual de positividade dos exames laboratoriais realizados nos indivíduos diagnosticados clinicamente com hanseníase e de contatos saudáveis

		Casos de Hanseníase		Casos Clássicos		Casos Não Clássicos		Casos Assintomáticos		Contatos saudáveis	
		n	%	n	%	N	%	n	%	n	%
		RLEP SSS	Positivo	227/313	72,5	103/105	98,1	110/177	62,1	14/31	45,2
	Negativo	86/313	27,5	02/105	1,9	67/177	37,9	17/31	54,8	305/433	70,4
RLEP Lesão de pele	Positivo	101/175	57,7	85/104	81,7	16/71	22,5	NA	NA	NA	NA
	Negativo	74/175	42,3	19/104	18,3	55/71	77,5	NA	NA	NA	NA
Histopatologia	Positivo	29/115	25,2	27/48	56,2	02/67	3,0	NA	NA	NA	NA
	Negativo	87/115	74,8	21/48	43,8	56/67	97,01	NA	NA	NA	NA
Baciloscopia raspado	Positivo	116/278	41,7	68/105	64,8	16/141	11,3	32/32	100	NA	NA
Intradérmico	Negativo	162/278	58,3	37/105	35,2	125/141	88,7	NA	NA	388	100
Sorologia IgM	Positivo	197/322	61,2	74/107	69,2	98/185	53,0	25/30	83,3	199/416	47,8
Anti-PGL-I	Negativo	125/322	38,8	33/107	30,8	87/185	47,0	05/30	16,7	217/416	52,2

Legenda: NA= Não avaliado

Quando observamos os grupos de pacientes separadamente, detectamos que o exame de qPCR de RLEP no raspado intradérmico de lóbulos auriculares se apresentou como o exame mais sensível tanto nos casos com manifestação clínica clássica, com sensibilidade de 98,1%, e 61,2% nos casos com manifestações clínicas iniciais. O segundo exame com maior sensibilidade nos pacientes com as formas clínicas clássicas foi a biologia molecular para detecção de RLEP em biópsia de lesão de pele, com sensibilidade de 89,2%, seguido da sorologia IgM anti-PGL-I (69,2%), a baciloscopia de raspado intradérmico e a histopatologia apresentaram as menores sensibilidades, com 64,8% e 56,3% respectivamente. No grupo de pacientes com manifestações clínicas iniciais, o exame com segunda maior sensibilidade foi a sorologia IgM anti-PGL-I, com sensibilidade de 53,0%, seguido da detecção de RLEP em biópsia de lesão, com sensibilidade de 24,6%, do exame baciloscópico de raspado intradérmico (11,3%) e histopatologia de lesão (3,4%) (Tabela 12).

Avaliamos também a capacidade dos exames laboratoriais em determinar quem realmente não tem hanseníase, ou seja, pessoas saudáveis. Para isso, avaliamos a especificidade dos testes. O exame que apresentou maior especificidade foi a detecção molecular da região RLEP em raspado intradérmico, com 70,5%. A sorologia anti-PGL-I apresentou especificidade de 52,2%. Não calculamos a especificidade da histologia e detecção molecular de RLEP de lesão de pele, pois foram coletadas apenas lesões com característica clínica de hanseníase, e não foi possível calcular a especificidade baciloscopia de raspado intradérmico de contatos saudáveis, pois este foi um critério de inclusão dos indivíduos no grupo (Tabela 12).

Tabela 12: Determinação da sensibilidade e especificidade dos exames laboratoriais nos grupos do estudo.

Exame	Casos de hanseníase	Sensibilidade (%)		Especificidade (%)
		Casos Clássicos	Casos Não clássicos	
RLEP SSS	72.5	98.1	62.1	70.4
RLEP Lesão de pele	65.8	89.2	24.6	NA
Histologia	25.0	56.3	3.4	NA
Baciloscopia raspado intradérmico	41.7	64.8	11.3	NA
IgM Anti-PGL-I	61.2	69.2	53.0	52.2

Legenda: NA= Não avaliado

A análise da concordância dos exames laboratoriais com o diagnóstico clínico, através do teste Kappa, apontou o exame de detecção molecular da região RLEP (kappa= 0,42, concordância boa) apresentou melhor concordância do que a sorologia anti-PGL-I, com kappa de 0,13, e concordância considerada fraca, em pacientes com hanseníase. Os exames:

baciloscopia do raspado intradérmico, exame histopatológico e detecção molecular em fragmento de pele não tiveram seus parâmetros avaliados, pois não realizamos coleta de fragmento de pele de indivíduos sem lesão e o grupo contatos saudáveis foi criado a partir do critério de baciloscopia negativa (Tabela 13).

A fim de encontrar um direcionamento laboratorial, avaliamos a associação dos exames: detecção molecular da região RLEP e o exame sorológico anti-PGL-I, os dois exames com maior sensibilidade no grupo de pacientes iniciais. Considerando os resultados duplo positivos e duplo negativos, percebemos que há diminuição na sensibilidade (48,1%) e na especificidade (31,7%), quando comparados com os testes isoladamente, no entanto, houve um discreto aumento no índice Kappa (0,55) (Tabela 14).

Tabela 13: Avaliação da concordância dos exames laboratoriais com o diagnóstico clínico, através do teste Kappa

	RLEP- Raspado intradérmico			IgM Anti-PGL-I		
	Kappa	<i>p</i>	Conclusão	Kappa	<i>p</i>	Conclusão
Casos de hanseníase	0.42	<0,0001	Boa	0.13	0,0002	Fraca
Casos clássicos	0,47	<0,0001	Boa	0,14	<0,0001	Fraca
Casos não clássicos	0,3	<0,0001	Fraca	0,04	0,1225	Fraca
Casos assintomáticos	0.5	0.0343	Fraca	0.1	<0,0001	Fraca

Tabela 14: Sensibilidade, especificidade e avaliação de concordância com diagnóstico clínico da associação dos exames sorologia anti-PGL-I e detecção molecular da região RLEP

Sensibilidade	Especificidade	Kappa	<i>p</i>	Concordância
48,1	31,8	0,5537	<0,0001	Boa

3.8. DETERMINAÇÃO DO PERFIL GENÉTICO DAS CEPAS DE *M. leprae* ISOLADAS

Foram coletadas 203 amostras de biópsias de pele provenientes de indivíduos sem histórico de tratamento com PQT anterior ao diagnóstico de hanseníase (121/203- 59,6%), de 65/203 (32,0%) recidivas, (9/203- 4,4%) insuficiência terapêutica, (8/203- 3,9%-) sem melhora clínica e laboratorial mesmo com o tratamento com a PQT.

A forma clínica BT foi predominante, com 74/203 (36,5%), seguida da forma clínica mais predominante foi a LL, com 47/203 (23,3%). Dentre os casos novos, a forma clínica mais predominante foi a forma BT, com 62/121 (51,2%), enquanto a forma clínica LL foi a mais

frequente nos grupos de pacientes com recidiva, com 28/65 (43,08%), nos pacientes sem melhora clínica com tratamento, com percentual de 5/8 (62,6%), e no grupo de pacientes com insuficiência terapêutica 5/9 (55,56%) (Figura 23).

Das amostras coletadas, a positividade na baciloscopia do raspado intradérmico foi de 93/203 (45,8%), e 73/203 (36%) na biópsia de lesão. O maior percentual de indivíduos com baciloscopia de raspado intradérmico positiva (35/203- 17,2%) apresentavam IB no intervalo de 3,25 a 4,00+. Com relação à biópsia, o maior percentual de indivíduos (17/203- 8,4%) apresentou IB no intervalo de 5,25 a 6,0+ (Figura 24).

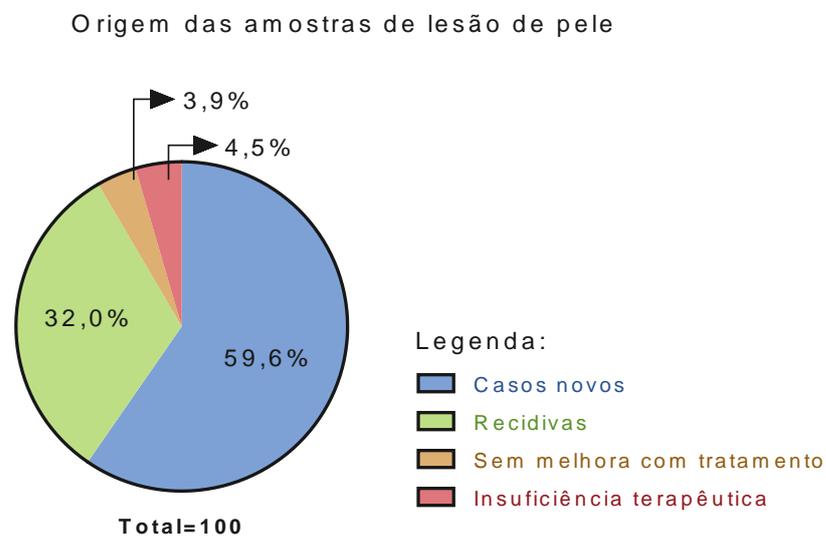


Figura 23: Origem das amostras de biópsia de pele dos pacientes participantes do estudo

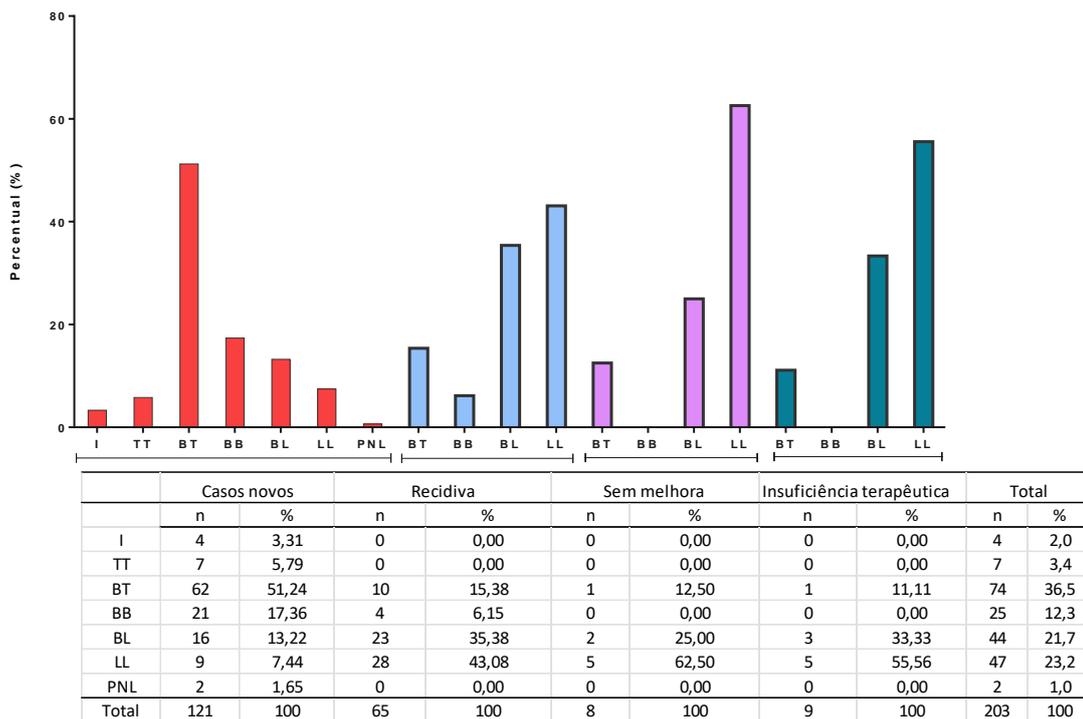


Figura 24: Forma clínica dos participantes do estudo, distribuídos em casos novos, recidiva, pacientes sem melhora clínica com tratamento e pacientes que insuficiência terapêutica

Legenda: I: hanseníase indeterminada; TT: hanseníase tuberculóide; BT: hanseníase borderline-tuberculóide; BB: hanseníase borderline-bordeline; BL: hanseníase borderline-virchowiana; LL: hanseníase virchowiana; PNL: hanseníase primariamente neural;

Na análise molecular dos fragmentos de pele foi possível detectar a presença do DNA do patógeno, em 140/203 (68,97%) amostras, todos os microrganismos analisados foram identificados como *Mycobacterium leprae*, e não evidenciamos a presença do *Mycobacterium lepromatosis*. Foi possível determinar o genótipo de 66/203 (32,5%) das cepas responsáveis por causar hanseníase nos pacientes atendidos na UREMC.

O genótipo mais predominante foi o tipo 4, presente em 56/66 (84,4%) pacientes, sendo o subtipo 4N o que apresentou maior distribuição na população atendida com 52/66 (78,8%), o subtipo 4P apresentou frequência de 4/66 (6,1%) e o genótipo 3I, com 9/66 (13,6%), uma destas cepas foi identificada como subtipo 3I-1 (1/66- 1,5%). Outra cepa identificada em nosso estudo, foi a cepa 1D (1/66- 1,5%) (Figura 25).

Associamos a genotipagem à forma clínica, e histórico clínico do paciente. Com isso, detectamos que, a cepa 1D, foi identificada causando hanseníase com na manifestação clínica BL, enquanto o genótipo 3I foram isoladas de casos BT (2/9-22,2%), BB (1/9-11,1%), BL (4/9-44,4%), e na forma clínica LL (2/9-22,2%). As cepas do genótipo 4N também estavam

presentes nas formas clínicas multibacilares: BT (4/52- 7,7%), BB (3/52- 5,8%), BL (24/52- 46,2%), LL (21/52- 40,4%). O genótipo 4P foi associado às formas clínicas BT (1/4- 25%), BL (1/4- 25%) e à forma clínica LL (2/4- 50%), como representado na figura 26.

O histórico de entrada do paciente detectou que aqueles que eram casos novos da doença, apresentaram em sua maioria, as cepas 4N (22/30- 73,3%), que já demonstrou ser a cepa que apresenta a maior frequência de detecção. Os genótipos 3I (5/30- 16,7%), e 4P (3/30- 10%) também foram detectados em outros indivíduos diagnosticados como casos novos de hanseníase. O grupo de pacientes com recidiva é constituído de 26/31 (83,9%) de indivíduos que adoeceram pela cepa do genótipo 4N. Os genótipos 1D, 3I e 4P correspondem a 1/31 (3,2%), 3/31 (9,7%), e 1/31(3,2%) respectivamente. Aqueles indivíduos que não apresentavam melhora clínica mesmo já tomando a medicação, apresentaram cepas do genótipo 4N (2/3- 66,7%), e 3I (1/3- 33,3%). Aqueles que foram detectados como insuficiência terapêutica apresentaram as cepas 4N (2/2- 100%) (Figura 27).

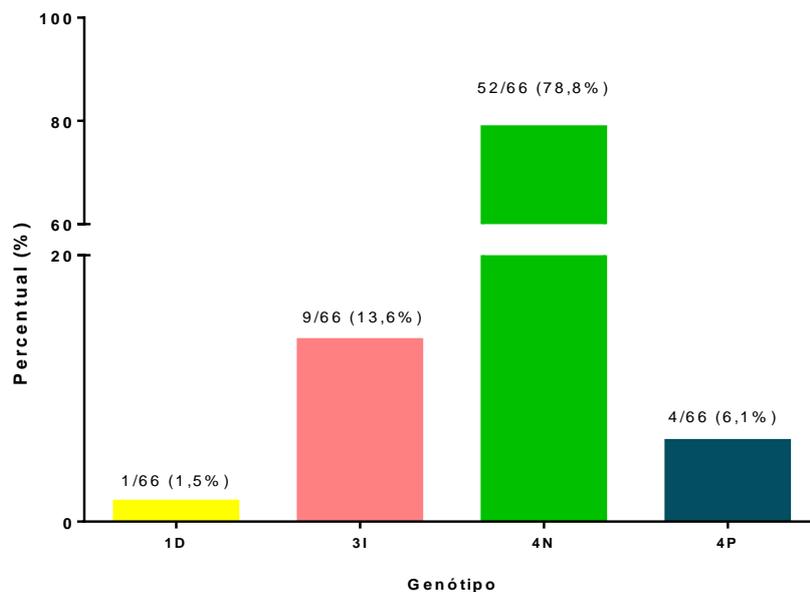


Figura 25: Genotipagem das cepas de *Mycobacterium leprae* causadoras de hanseníase em pacientes atendidos na Unidade de Referência Dr. Marcello Candia

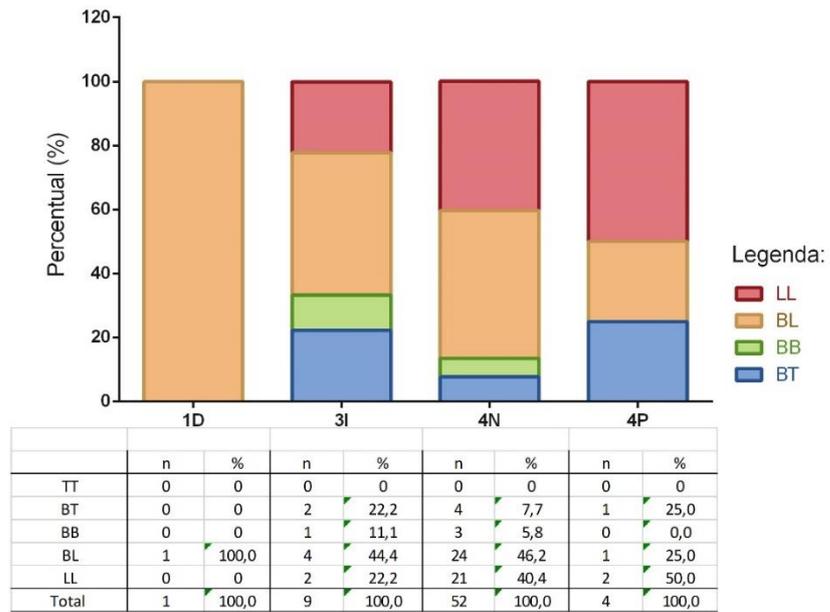


Figura 26: Genótipo das cepas de *Mycobacterium leprae* associado às formas clínicas da hanseníase

Legenda: I: hanseníase indeterminada; TT: hanseníase tuberculóide; BT: hanseníase bordeline-tuberculóide; BB: hanseníase bordeline-bordeline; BL: hanseníase bordeline-virchowiana; LL: hanseníase virchowiana; PNL: hanseníase primariamente neural;

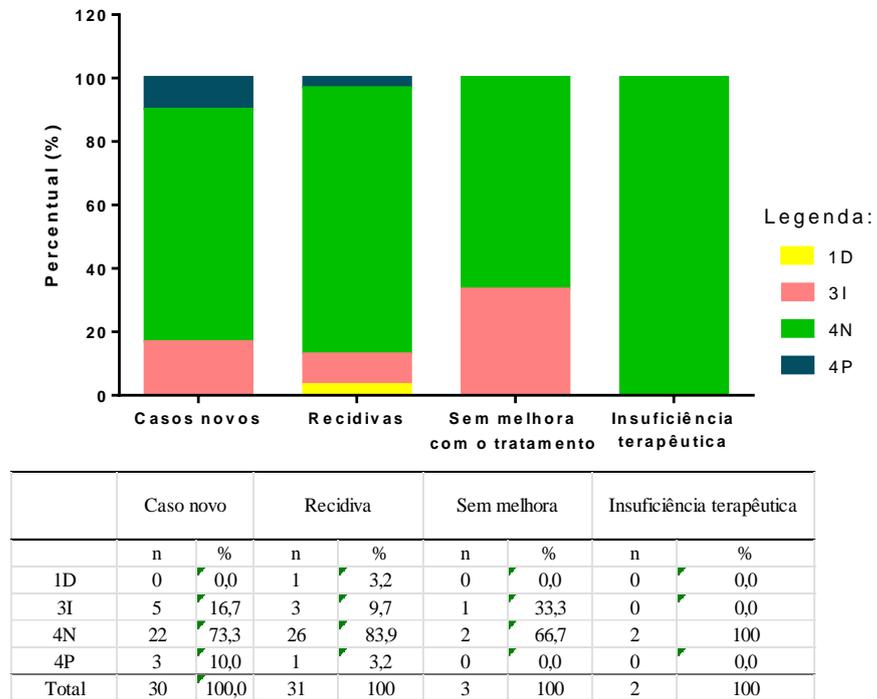


Figura 27: Associação do genótipo de *Mycobacterium leprae* com a história clínica do paciente

Legenda: I: hanseníase indeterminada; TT: hanseníase tuberculóide; BT: hanseníase borderline-tuberculóide; BB: hanseníase borderline-bordeline; BL: hanseníase borderline-virchowiana; LL: hanseníase virchowiana; PNL: hanseníase primariamente neural;

As amostras obtidas no estudo foram provenientes dos 23/144 (16%) dos municípios do Estado do Pará e 1 município do Maranhão. O município de Belém, destacado em amarelo, na figura 28, abriga os 4 tipos de cepas detectadas no estudo, com frequência de 100% (1/1) das cepas 1D, 22,2% (2/9) de cepas 3I, 32,7% (17/52) das cepas 4N, e 25% (1/4) das cepas do genótipo 4P (Tabela 15).

O genótipo 3I, demonstrou distribuição geográfica em cinco municípios paraenses: Acará com 4/9 (44,4%), Ananindeua com 1/9 (11,1%), Belém com 2/9 (22,2%), e Canaã dos carajás com 1/9 (11,1%), e Tomé-açu com 1/9 (11,1%). O genótipo 4N foi detectado em 19 municípios paraenses e em 1 município do Estado do Maranhão. A maior frequência da cepa foi na região metropolitana de Belém, nos municípios de Belém (17/52- 32,7%), Marituba (10/52- 19,2%), e Ananindeua (6/52- 11,5%). Foi detectado também no município de Cameté e castanhal, ambos com detecção de 2/52 (3,8%), e com detecção de 1/53 (1,9%) de nos municípios de Acará, Capanema, Capitão poço, Garrafão do norte, Goianésia do Pará, Igarapé Miri, Irituia, Jacundá, Marapanin, Mocajuba, Nova esperança do piriá, Paragominas, Salvaterra, Santa Izabel, e Cedral- Maranhão. O genótipo 4P foi detectado em 4 municípios, com percentual de 25% (1/4) em cada um. Os municípios foram: Ananindeua, Belém, que já apresentavam cepas com outros genótipos, e como única detecção nos municípios de Maracanã e Vigia (Figura 28 e Tabela 15).

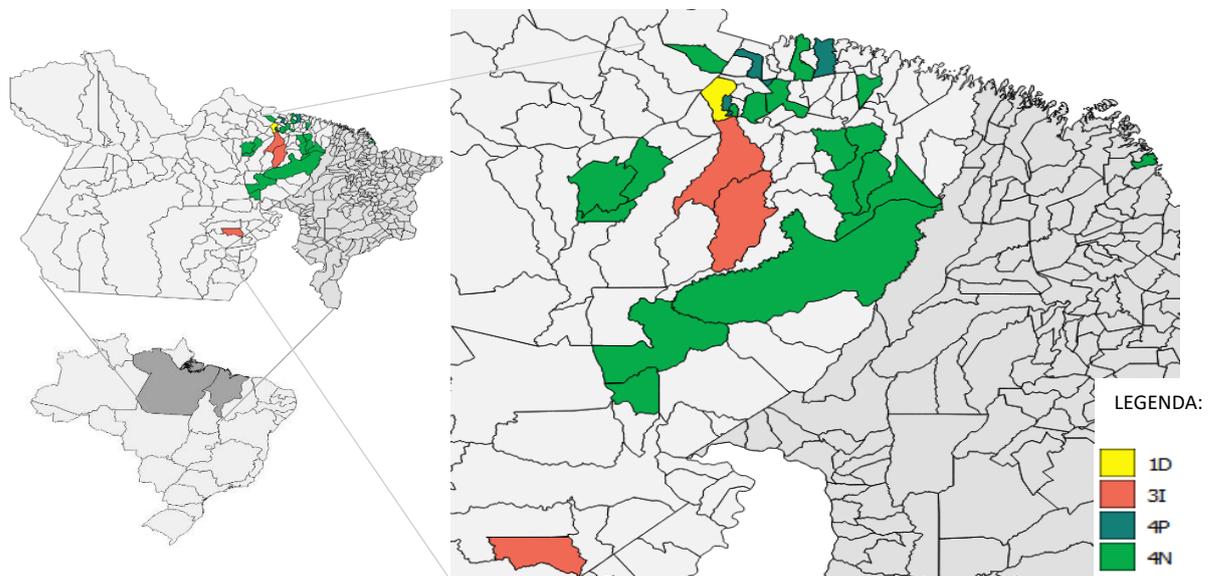


Figura28: Distribuição geográfica das cepas identificadas no Estudo.

Tabela 15: Distribuição dos genótipos nos municípios dos Estados do Pará e Maranhão.

Municípios	1D		3I		4N		4P		Total
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Acará	0	0,0	4	80,0	1	20,0	0	0,0	5
Ananindeua	0	0,0	1	12,5	6	75,0	1	12,5	8
Belém	1	4,8	2	9,5	17	81,0	1	4,8	21
Cametá	0	0,0	0	0,0	2	100,0	0	0,0	2
Canaã dos carajás	0	0,0	1	100,0	0	0,0	0	0,0	1
Capanema	0	0,0	0	0,0	1	100,0	0	0,0	1
Capitão poço	0	0,0	0	0,0	1	100,0	0	0,0	1
Castanhal	0	0,0	0	0,0	2	100,0	0	0,0	2
Garrafão do norte	0	0,0	0	0,0	1	100,0	0	0,0	1
Goianésia do Pará	0	0,0	0	0,0	1	100,0	0	0,0	1
Igarapé Miri	0	0,0	0	0,0	1	100,0	0	0,0	1
Irituia	0	0,0	0	0,0	1	100,0	0	0,0	1
Jacundá	0	0,0	0	0,0	1	100,0	0	0,0	1
Maracanã	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	100,0	1
Marapanim	0	0,0	0	0,0	1	100,0	0	0,0	1
Marituba	0	0,0	0	0,0	10	100,0	0	0,0	10
Mocajuba	0	0,0	0	0,0	1	100,0	0	0,0	1
Nova esperança do Piriá	0	0,0	0	0,0	1	100,0	0	0,0	1
Paragominas	0	0,0	0	0,0	1	100,0	0	0,0	1
Salvaterra	0	0,0	0	0,0	1	100,0	0	0,0	1
Santa Isabel	0	0,0	0	0,0	1	100,0	0	0,0	1
Tome açú	0	0,0	1	100,0	0	0,0	0	0,0	1
Vigia	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	100,0	1
Cedral- Maranhão	0	0,0	0	0,0	1	100,0	0	0,0	1
Total	1	1,5	9	13,6	52	78,8	4	6,1	66

Foi possível realizar o sequenciamento da região DRDR de 109/203 (53,7%) das amostras de lesões de pele de pacientes, com amplificação de pelo menos um gene de interesse provenientes de indivíduos sem histórico de hanseníase anterior ao diagnóstico (56/109; 51,4%), pacientes com recidiva (44/109; 40,4%), pacientes com insuficiência terapêutica (44/109; 40,4%), e de pacientes com falência terapêutica (5/109; 4,6%).

Obtivemos amplificação da região *rpoB* em 96/203 (47,3%) e todas (96/96; 100%) apresentaram o alelo selvagem (*Wild type- WT*). A amplificação da região *folP1* foi possível em 101/203 (49,8%) das amostras, sendo 98/101 (97%) *WT*, e 3/101 (3%) apresentaram mutações conhecidamente associadas à resistência medicamentosa. Obtivemos 100/203 (49,2%) amplificações da região *gyrA*, e todas com alelo *WT*, e em 40/203 (19,7%) cepas foi

possível avaliar a região *gyrB*, onde detectamos 39/40 (97,5%) possuíam o alelo *WT*, e 1/40 (2,5%) apresentaram mutação (Tabela 16).

Tabela 16: Percentual de amostras amplificadas e sua caracterização fenotípica baseada na amplificação dos genes *rpoB*, *folP1*, *gyrA*, *gyrB*

	Sem amplificação		Com amplificação		Caracterização das cepas			
	n	%	N	%	Sensível		Resistente	
	n	%	N	%	n	%	n	%
<i>rpoB</i>	107	52.7	96	47.3	96	100.0	0	0
<i>folP1</i>	102	50.2	101	49.8	98	97.0	3	3.0
<i>gyrA</i>	103	50.7	100	49.3	100	100.0	0	0
<i>gyrB</i>	163	80.3	40	19.7	39	97.5	1	2.5

Consideramos cepas sensíveis aquelas que apresentaram alelo *WT* em todas as regiões gênicas associadas com droga-resistência. Portanto, 38/109 (34,9%) cepas foram consideradas sensíveis aos fármacos dapsona, rifampicina e ofloxacina. Estas estão representadas no círculo amarelo, no centro do gráfico de intercessão, da figura 29. As demais cepas que apresentaram sensibilidade em apenas uma região gênica (9/109- 8,3%), duas regiões gênicas (12/109- 11,0%), ou em três, das quatro regiões gênicas (47/109- 43,1%), cuja distribuição está demonstrada na figura 29, estas foram denominadas como cepas com sensibilidade indeterminada. Três cepas (3/109- 2,8%) foram detectadas com mutações responsáveis por causar resistência à fármacos no gene *folP1*, todas no códon 55, sendo duas cepas com troca do aminoácido pronina por arginina, e uma cepa com modificação da pronina por leucina. Esta cepa também apresentou mutação na região *gyrB*, no códon 503, com substituição da treonina por isoleucina, mutação nunca descrita em *M. leprae*. A presença da associação das mutações em *folP1* e *gyrB*, determinam a presença de uma cepa multidroga resistente (Figura 29 e Tabela 17).

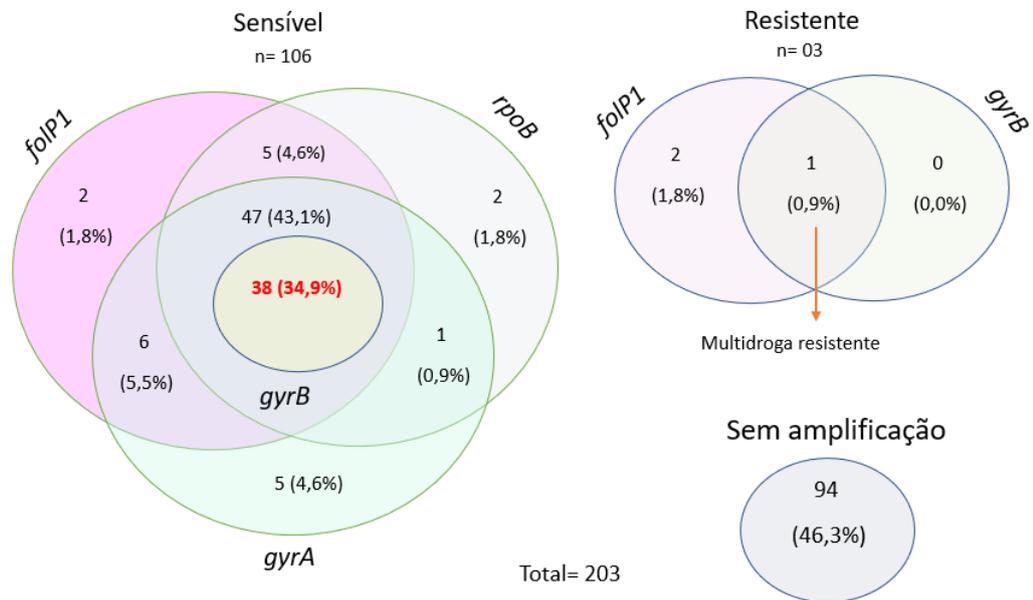


Figura 28: Amplificação das regiões gênicas *rpoB*, *folP1*, *gyrA*, *gyrB*, e seu perfil de sensibilidade.

Tabela 17: Mutações detectadas nas regiões de determinação de droga-resistência

	<i>rpoB</i>	<i>folP1</i>	<i>gyrA</i>	<i>gyrB</i>
Cepa		Códon 55		Códon 503
Br2016-153	<i>wt</i> *	Pro > Arg***	<i>wt</i>	<i>wt</i>
Br51353	<i>wt</i>	Pro > Arg	<i>wt</i>	SA [#]
Br2016-15	<i>wt</i>	Pro>Leu**	<i>wt</i>	Thr>Iso ^{##}

Legenda: **wt*: Wild type; **Pro>Leu: substituição de uma Pronina por uma Leucina; ***Pro > ArG: Substituição de uma Pronina por uma Arginina; [#]SA: Sem Amplificação; ^{##}Thr>Iso: Substituição de uma treonina por Isoleucina;

As cepas com mutações que caracterizam resistência contra fármacos foram detectadas nos grupos de pacientes caracterizados como casos novos, em 1/56 (1,8%) dos indivíduos, no grupo de pacientes com recidiva, com 1/44 (2,3%), e no grupo de pacientes com falência terapêutica, com 1/5 (20,0%). Moradores dos municípios de Belém, Ananindeua e Castanhal, considerados municípios da região metropolitana de Belém (Tabela 18).

Tabela 18: Modo de entrada de cada paciente no estudo e seu perfil de sensibilidade

	Casos novos		Recidiva		Insuficiência terapêutica		Falência terapêutica	
	N	%	n	%	n	%	N	%
Sensível	18	32,1	17	38,6	1	25	2	40
Resistente	1	1,8	1	2,3	0	0	1	20
Indeterminado	37	66,1	26	59,1	3	75	2	40
Total	56	100	44	100	4	100	5	100

O paciente com recidiva da doença é um paciente do sexo masculino de 55 anos de idade, morador do município de Ananindeua, caminhoneiro, a esposa foi avaliada e não apresentou sinais e sintomas de hanseníase. O filho do casal não pode ser avaliado por estar privado de liberdade. Seu primeiro tratamento foi há 6 anos antes da entrada do paciente no estudo, na avaliação clínica apresentou lesão nodular no dorso, com forma clínica LL, IB = 3,25, Anti-PGL-I Positivo (D.O = 0,710), qPCR positivo (C.T = 29), SNP 4N (Figura 30). A paciente com falência terapêutica, é do sexo feminino. A apresentou lesões nodulares disseminadas pelo tegumento, na avaliação clínica foi diagnosticada como LL, apresentou IB= 4,75, IM= 25%, Anti-PGL-I = 1.837, e SNP 4N (Figura 31). O paciente com resistência primária apresentou mutação em duas regiões gênicas referentes à droga-resistência (dapsona e quinolonas), além destas, outras 4 mutações foram encontradas em seu genoma fadD9 (G796S), ribD (A63T), pks4 (M14I) e nth (N142fs), esta cepa foi considerada hipermutante. Este paciente apresentou lesões disseminadas pelo tegumento, com I.B= 3,5, e Anti-PGL-I positivo com D.O 2,023 (Figura 32).

Mediante o achado de uma cepa hipermutante causando droga-resistência primária, houve a necessidade de avaliarmos os contatos intra-domiciliares e sociais do paciente (Figura 33) com a finalidade de verificarmos a dispersão da cepa. Os dados desta busca foram publicados no artigo “ Specialized active leprosy search strategies in an endemic area of the Brazilian Amazon identifies a hypermutated *Mycobacterium leprae* strain causing primary drug resistance” (BOUTH et al., 2023) (Apêndice I).

Na avaliação dos contatos, foi identificado que a esposa e o filho apresentavam sinais e sintomas clínicos de hanseníase (2/14 - 14,3%). Na titulação de anticorpos Anti-PGL-I, apenas 2 (14,3%) indivíduos foram soropositivos. A amplificação do RLEP das amostras de raspado intradérmico dos 12 contatos clinicamente saudáveis foi positiva em 6/12 (50,0%).

A esposa, 21 anos, apresentava lesão hipocrômica maior que 10 cm de diâmetro com bordas imprecisas (pseudópodes) no abdômen (Figura 34) com perda de sensibilidade, e DG0. Ela foi classificada com hanseníase BT com título de anti-PGL-I positivo (O.D. = 0,41) e negativo para RLEP por qPCR em raspado intradérmico. O exame histopatológico da biópsia de pele mostrou epiderme com leve acantose e mínimo infiltrado linfocitário perivascular na derme superior. BAARs estavam ausentes pela coloração de Fite-Faraco e a lesão foi diagnosticada como dermatite perivascular superficial mínima. A amostra de biópsia de pele não apresentou carga bacilar suficiente para análise molecular dos genes de resistência.

O filho, de 4 anos, apresentava lesões hipocrômicas com presença de tubérculos no antebraço esquerdo, e antebraço direito (Figura 35) associadas a espessamento do nervo ulnar esquerdo, DG0 e sorologia negativa (O.D. = 0,28). Também foi clinicamente classificado como hanseníase BT (Figura 1). O exame histopatológico demonstrou denso infiltrado inflamatório granulomatoso de arquitetura nodular composto por linfócitos, plasmócitos e histiócitos epitelióides citoplasmáticos, com presença de BAAR (1+) nos cortes corados com Fite-Faraco, com definição diagnóstica de hanseníase borderline-tuberculóide por histopatologia segundo classificação de Ridley e Jopling. A detecção de RLEP por qPCR nos lóbulos auriculares foi positivo (Ct = 41,4). A análise molecular da biópsia de pele mostrou alelos WT em *rpoB*, *folp1*, *gyrA* e *gyrB*.



Figura 30: Lesão nodular de paciente com recidiva de hanseníase e resistência a dapsona;



Figura 31: Paciente com resistência à dapsona com insuficiência terapêutica. Apresenta lesões disseminadas pelo tegumento.



Figura 32: Paciente com resistência primária, com lesões disseminadas pelo tegumento, com diagnóstico de Hanseníase LL.

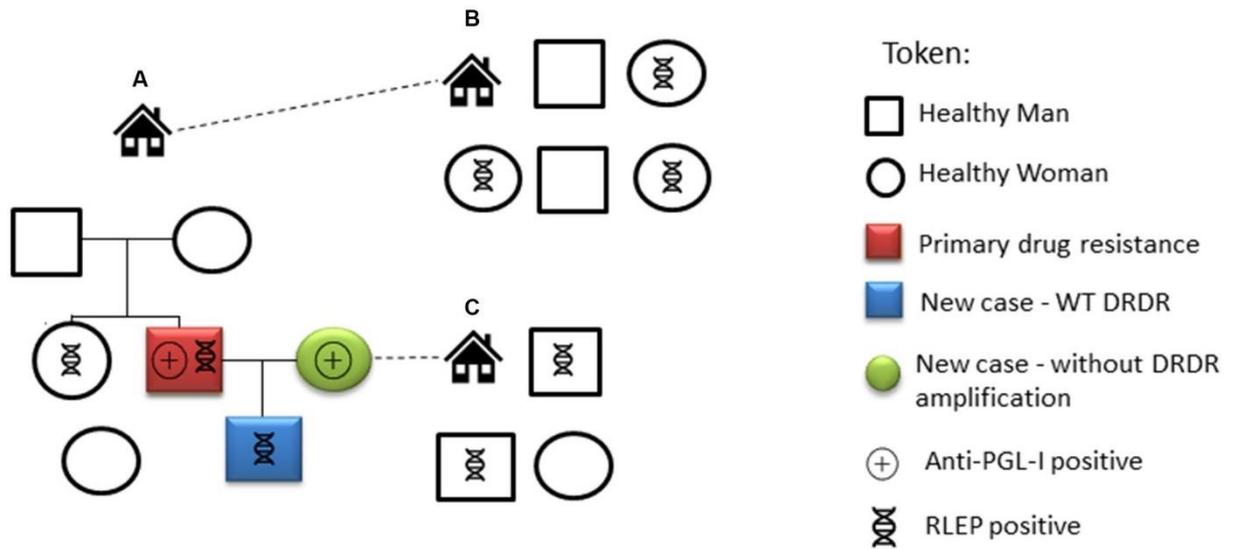


Figura 33: Avaliação e exames laboratoriais do caso com resistência primária e seus contatos. Moradores da Casa A: o caso primariamente resistente (quadrado vermelho), a esposa (círculo verde), seu filho (quadrado roxo) e outros parentes. Os moradores da casa B, localizada próxima à casa A, são contatos de longa data. Parentes da esposa moram na casa C. São apresentados os resultados positivos para sorologia anti-PGL-I e detecção de RLEP para cada indivíduo.



Figura 34: Esposa, com placa hipocrômicas em abdômen.

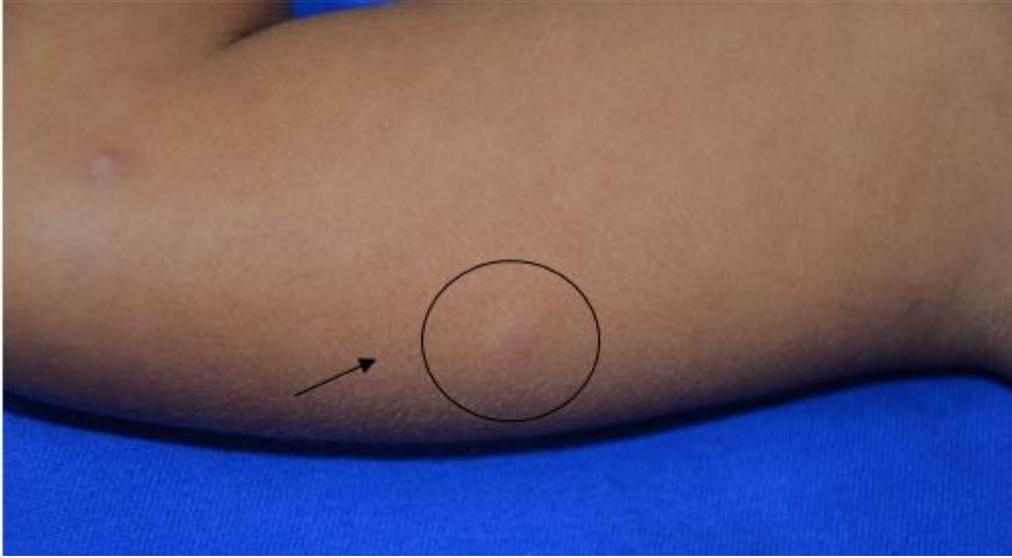


Figura 35: Filho, com lesão hipocrômica e tubérculos no antebraço apontada na seta.

4. DISCUSSÃO

A hanseníase é hoje um importante problema de saúde pública. Órgãos mundiais seguem traçando metas com o intuito de promover o controle da doença e diminuição do impacto econômico e social que ela acarreta (VAN BRAKEL et al., 2012), como exemplo, temos a Estratégia Global contra a Hanseníase 2021- 2023 “Rumo a erradicação da hanseníase”, com a finalidade de promover medidas para zerar a transmissão e incapacidades físicas decorrentes de hanseníase (WHO, 2021).

Para isso seja possível, é necessário a quebra da cadeia de transmissão proporcionando ao paciente o diagnóstico em estágios iniciais da doença, início do tratamento antes do surgimento e estabelecimento de sequelas e incapacidades físicas visíveis, e reforçar a detecção e vigilância sobre cepas resistentes à drogas (WHO, 2017).

O Brasil, em 2018, notificou 28.660 casos novos de hanseníase, equivalente a 13,7 casos novos/100.000 habitantes. Destes, 2109 (7,4%) com grau 2 de incapacidade física, evidenciando o diagnóstico tardio da doença (“WHO | Weekly Epidemiological Record, 30 August 2019, vol. 94, 35/36 (pp. 389–412)”, 2019).

Em nosso estudo, avaliamos 833 indivíduos de 23 dos 144 municípios do estado do Pará. Destes, diagnosticamos 42,1% (351/833) casos de hanseníase, 40,7% (143/351) dos casos diagnosticados já apresentavam algum grau de incapacidade física decorrente da doença, e 12,2% (43/351) já apresentavam alterações físicas visíveis (GI2). O que demonstra atraso na detecção dos sinais iniciais da doença, permitindo que ela se agrave ao ponto de ocasionar deformações físicas visíveis.

O atraso no diagnóstico é um problema estrutural, que não é restrito à região norte do Brasil. Está associada a uma série de fatores, dentre eles a falta de expertise médica com relação à detecção e diagnóstico clínico, como evidenciado em um estudo realizado com pacientes multibacilares, os quais tiveram um atraso de em média três anos para receber o correto diagnóstico, o que levou ao desenvolvimento de complicações da doença (TRINDADE et al., 2009b). Outros estudos afirmam também que há a necessidade de aumentar as campanhas educativas para alertar a população sobre sinais e sintomas, esclarecimento sobre a doença e diminuição do medo do estigma (HENRY et al., 2016), além de intensificar os treinamentos e capacitações das equipes de saúde para o correto diagnóstico dos casos de hanseníase (DHARMAWAN et al., 2022).

Outro grande desafio na hanseníase é a ausência de um exame laboratorial que seja capaz de detectar a doença em todos os seus polos. O exame considerado “ouro” dentro da

hanseníase hoje, é o exame histopatológico de biópsia de pele (SCOLLARD et al., 2006), que se coletado de uma lesão bem representativa de lesão hansênica, processada da forma adequada, e corada com as técnicas adequadas como por exemplo a utilização da coloração fite-faraco (FARACO, 1938), e analisada por um patologista com expertise na caracterização da doença, pode demonstrar a resposta imune do indivíduo a partir das organização tecidual, envolvimento das estruturas nervosas periféricas e a presença do bacilo no tecido. Estudos demonstram que o exame histopatológico pode ter de 57,2 % a 98,0% de correlação com a clínica (BHATIA et al., 1993; CHAKRABARTI et al., 2016; GIRIDHAR et al., 2012; MCDUGALL; PONNIGHAUS; FINE, 1987).

Em nosso estudo, o exame histopatológico demonstrou correlação de 56% (27/48) entre clínica e diagnóstico laboratorial com o diagnóstico clínico apenas nos casos considerados clássicos, ou seja, apresentavam clínica bem definida, segundo Ridley e Joplin (RIDLEY, 1966). Quando avaliamos os casos não clássicos, o percentual cai drasticamente para 3% (2/67). Considerando todos os casos de hanseníase, o percentual de correlação foi de 25,2% (29/115). Outros estudos demonstraram que o exame histopatológico não apresentou a mesma capacidade no diagnóstico, principalmente em lesões em estágios iniciais (JHA; KARKI, 2010; NADKARNI; REGE, 1999; SEMWAL et al., 2018) o que dificulta sua utilização como escolha principal para definição de diagnóstico.

Lesões muito precoces podem apresentar-se como infiltrados perineural relativamente inespecíficos, nos quais raros bacilos álcool-ácido resistentes podem ser demonstrados, mas sem infiltrados suficientes para classificá-los (Scollard et al., 2006), por esse motivo pode apresentar grande quantidade de exames negativos ou duvidosos sendo considerado irrelevante em indivíduos paucibacilares, ou nas formas iniciais da doença (Veena et al., 2011).

A baciloscopia do raspado intradérmico é considerado um exame menos invasivo, e de menor custo, e de mais fácil execução, quando comparado ao exame histopatológico de lesão de pele. Além disso, quando positivo, é determinante para o diagnóstico de hanseníase multibacilar, independente da caracterização clínica da doença. No entanto, seu resultado negativo não exclui a doença, como acontece com os pacientes paucilares (BRASIL., 2002; HANSENÍASE; BACILOSCOPIA, 2010).

A positividade do exame pode variar de 18% a 59%, apresentando maiores percentuais quando executada em pacientes multibacilares do polo virchowiano, como pacientes BL e LL (BANERJEE et al., 2011; DEMSISS et al., 2022; KAMAL et al., 2010; SIWAKOTI et al., 2016; SRINIVAS; SUNEETHA; RAO, 2002). Em nosso estudo, o percentual geral de positividade dos casos de hanseníase foi de 41,7%. Quando avaliados os grupos de casos

clássicos e casos não clássicos, o percentual foi de 64,8% e 11,3% respectivamente. Além dos casos clinicamente diagnosticados, com a baciloscopia do raspado intradérmico foi possível diagnosticar 7,6% (32/420) indivíduos considerados contatos saudáveis. Após o recebimento do laudo, estes foram considerados ‘casos assintomáticos’.

Neste estudo, a soropositividade entre os casos gerais de hanseníase (61,2%), casos clássicos (69,2%), casos não clássicos (53,0%), e contatos saudáveis (47,8%) apresentaram percentual de positividade com valor próximo, não diferenciando casos de não casos. No estudo, o grupo que apresentou maior percentual foi o grupo de casos assintomáticos (83,3%). O uso da sorologia IgM Anti-PGL-I, apesar de estar associado à presença do BAAR, seja acompanhando proporcionalmente o índice baciloscópico(STEFANI et al., 1998), ou com marcador de infecção subclínica capaz de apontar contatos intradomiciliares com risco aumentado de adoecimento (DOUGLAS et al., 2004; SCALIANTE DE MOURA et al., 2008) quando aplicada em população endêmica não apresenta diferença significativa de soropositividade entre casos e contatos intradomiciliares, o que o torna não indicado para o direcionamento do diagnóstico(BARRETO et al., 2011, 2012; MOURA et al., 2008).

As técnicas de biologia molecular demonstram ser promissoras quanto à capacidade de detecção de patógenos associados a doenças infecciosas, e pesquisa de mutações em regiões gênicas específicas, podendo assim ser mais rápido e eficiente na detecção de mutações para droga-resistência(YANG; ROTHMAN, 2004). Variações da PCR são amplamente estudadas, com a PCR em tempo real (qPCR), onde já foi demonstrado ser capaz de detectar até 10fg de DNA de *M. leprae* purificado, o equivalente à aproximadamente 300 bactérias no tecido analisado (YOON et al., 1993). O reconhecimento da região repetitiva RLEP, com 37 cópias no genoma (COLE; SUPPLY; HONORÉ, 2001), permitiu estudos avaliando esta região espécie específica do *M. leprae* através da técnica de reação da cadeia da polimerase, apontaram como potencial marcador para o diagnóstico de hanseníase.

A detecção do material genético do *M. leprae* nos nódulos auriculares, através do raspado intradérmico, apresentou o maior percentual (72,5%) de detecção entre casos de hanseníase na análise comparativa entre os exames realizados, chegando a 98% de positividade nos casos clássicos, 62% em casos não clássicos. E menor percentual (29,6%) de positividade entre os contatos saudáveis. Quando analisamos a presença do RLEP em biópsia de pele, o percentual diminuiu para 57,7%, com variação de 81,7% a 22,5% em casos clássicos e casos não clássicos respectivamente.

Quando comparados, o exame que possuem maior capacidade de detectar um caso de hanseníase, a sensibilidade, e o exame o que melhor possui a capacidade em determinar que um indivíduo não possui hanseníase, a especificidade, a detecção de RLEP por qPCR de raspado intradérmico de lóbulos auriculares foi a que demonstrou melhor desempenho entre os testes, com 72,5% de sensibilidade entre os casos de hanseníase, chegando a 98% nos casos clássicos e 62% nos casos não clássicos, com 70.4% de especificidade.

Dentre os testes moleculares diagnósticos disponíveis para doenças infecciosas as sensibilidades variam de 60,8% para *Chlamydia trachomatis* (BLACK et al., 2002) a 99% para HIV (VARGO et al., 2002) e HPV (CLAVEL et al., 2001), e a variação de especificidade variando de 85% para HVP (CLAVEL et al., 2001), a 100% para *Streptococcus* do grupo B (FUKUSHIMA et al., 2003), *Trichomonas vaginalis* (WITT et al., 2000). A detecção do *M. tuberculosis*, nas técnicas de biologia molecular, apresentaram sensibilidade que variou de 79,4 a 95,2%, e especificidade acima de 99% (FUKUSHIMA et al., 2003).

Na análise de concordância entre os exames laboratoriais e o diagnóstico clínico, pelo teste Kappa, a detecção do RLEP no raspado intradérmico demonstrou melhor concordância dentre os exames. A associação dos exames detecção molecular da região RLEP e o exame sorológico anti-PGL-I, considerando os resultados duplo positivos e duplo negativos, percebemos que apesar da diminuição na sensibilidade e na especificidade, há um discreto aumento no índice Kappa (0,55).

Ao considerarmos que a presença do material genético do *M. leprae*, em uma região fisicamente distante do seu ponto de contato, como são os lóbulos auriculares, evidencia a presença do microrganismo no indivíduo. Com isso, defendemos que se faz necessário o início do tratamento, da mesma forma como a evidência do bacilo em uma baciloscopia positiva, é definitivo para o início do tratamento multibacilar (HANSENÍASE; BACILOSCOPIA, 2010). Assim, a detecção do RLEP no raspado intradérmico pode auxiliar o clínico no diagnóstico, permitindo o início de tratamento, sem que os sinais e sintomas estejam tão evidentes, permitindo a prevenção de lesões neurais irreversíveis causadas pela bactéria, a quebra da cadeia de transmissão na comunidade.

Atualmente, diante do diagnóstico de hanseníase, o tratamento é realizado utilizado um protocolo preconizado pela OMS há pelo menos 40 anos atrás (WHO, 1982). E mesmo com as evidências da possibilidade de atualização dos esquemas de tratamento com drogas mais eficientes (MAIA; CUNHA; CUNHA, 2013; NARANG et al., 2019) este protocolo se mantém.

A possibilidade do diagnóstico sem evidências clínicas clássicas nos traz o questionamento sobre a possibilidade de utilizarmos outras drogas e outros esquemas de tratamento que possam fazer o papel de eliminação da infecção, prevenção das possíveis incapacidades físicas e quebra da cadeia de transmissão, sem a necessidade de submeter ao esquema atual que apresenta um período longo de tratamento, e estigmatizante em alguns casos, por causa da coloração deixada pelo medicamento Clofazimina.

detecção de RLEP no raspado intradérmico, o diagnóstico de hanseníase tanto de casos clássicos, como em casos não clássicos,

Tão importante como o diagnóstico nos estágios iniciais, é conhecer o microrganismo que está causando o adoecimento da nossa população. Por não ser cultivado em meios de cultura artificial, o que conhecemos do patógeno hoje advém dos avanços tecnológicos na área da biologia molecular e bioinformática. O sequenciamento do genoma completo do *M. leprae* (Cole et al., 2001), permitiu inferir a evolução reductiva deste patógeno e realizar estudos de ancestralidade e dispersão das cepas de *M. leprae* pelo mundo (Monot et al., 2009), fortificou também a proposta de ferramentas moleculares aplicáveis ao diagnóstico da hanseníase (Azevedo et al., 2017), o estudo de mutações relacionadas aos perfis de resistência antimicrobiana (Benjak et al., 2018), informações sobre seu metabolismo e interação como o hospedeiro (COLE; SUPPLY; HONORÉ, 2001; MONOT et al., 2009; SALGADO et al., 2018; SINGH; COLE, 2011)

Em estudo comparativo de cepas capazes de causar hanseníase em humanos, foi detectada em pacientes com hanseníase virchowiana, com reação cutânea grave, conhecida como fenômeno de Lucio uma cepa de *Mycobacterium spp.* com diferença entre em regiões gênicas suficiente para ser diferenciada em outra espécie, o *M. lepromatosis* (HAN et al., 2008). Posteriormente, a cepa começou a ser identificada em hanseníase com outras caracterizações clínicas distribuídas em países como Brasil, Filipinas, Myamae, México, Malásia e Estados Unidos (DEPS; COLLIN, 2021). Nas cepas analisadas neste estudo, referentes a um estado endêmico da Amazônia brasileira, não detectamos a presença do *M. lepromatosis*, apenas infecção pelo *M. leprae*.

Monot *et al.*, (MONOT et al., 2009b) , em estudo comparativo de cepas de *M. leprae* demonstrou homologia de mais de 99% entre os genomas, diferindo em algumas regiões, o que determinou apenas dezesseis subtipos baseados em polimorfismos de nucleotídeo único (SNP), que demonstraram forte correlação com o padrão de migração humana nos primórdios da construção histórica das civilizações atuais, traçando rotas de dispersão das cepas de *M. leprae* pelo mundo (Monot et al., 2009).

Em nosso estudo, o SNP mais frequente foi o 4N (78,8%). Com menor frequência os SNPs 4P (6,1%), 3I (13,6%), sendo uma delas do subtipo 3I-1 (1,5%) e uma 1D (1,5%). Em estudos anteriores, foram detectadas na região sudeste do Brasil cepas 3I (FINARDI et al., 2023; MONOT et al., 2009b). Em Juazeiro do Norte, nordeste do Brasil, foi detectado em amostras ambientais cepas de *M. leprae* caracterizada como 4N(DE HOLANDA et al., 2017).

As cepas 3I parecem ter sido trazidas ao território brasileiro pelos imigrantes europeus, por sua origem e principalmente pelos achados paleontológicos de cepas europeias medievais (principalmente quanto à caracterização da cepa 3I-1) (FINARDI et al., 2023; MONOT et al., 2009b).

As cepas do Tipo 4, apresentam sua origem genética no Oeste Africano (MONOT et al., 2005). A presença tão forte do genótipo de subtipo 4N pode estar associado não à colonização europeia, como visto pelas cepas do sudeste do Brasil, mas sim, associada à vinda dos povos africanos para o Brasil, no regime de escravidão (MONOT et al., 2005, 2009b).

Evidências na literatura reforçam essa teoria, como por exemplo, o artigo intitulado “Escravos no purgatório: o leprosário do Tucunduba (Pará, século XIX)”(HENRIQUE, 2012) que traz em sua narrativa recortes de documentos históricos que remontam a relação das pessoas afetadas pela hanseníase com a sociedade paraense no século XIX. Em passagens do texto é comum observar falas associando a hanseníase à vinda dos colonizadores, assim como a sua forte presença entre os negros. A presença da hanseníase também é descrita como presente em um número reduzido de indígenas da região, mas afirma-se que quando o Brasil foi “descoberto” não havia a doença na região. O que pode ser confirmado por artigos que datam os primeiros achados de hanseníase no Brasil a partir 1600, no Rio de Janeiro (EIDT, 2004).

Chama a atenção também, os relatos da caracterização observada nos registros sobre a manifestação clínica da doença na população negra. O documento traz relatos de que a hanseníase na população negra trazia consigo as características marcantes da face leonina, ou “lepra leontina”, ou elefantíase de rosto, levantando-se ao questionamento de que tal característica fosse peculiar desta população, já que pouco se via alterações em pessoas de pele branca (HENRIQUE, 2012). A face Leonina, e as características de adoecimento gerais, da

população podem ser explicadas pelo tempo de interação do bacilo com o hospedeiro, pelas características imunes inerentes aos indivíduos, e também pela cepa de *M. leprae* que está ocasionando a doença.

Diante da dificuldade de manutenção do *M. leprae* em laboratório, pouco se sabe sobre seu metabolismo, no entanto um estudo comparativo do crescimento de cepas de SNP 4P e 3I, em animal de experimentação, demonstrou que a cepa 4P apresentou um crescimento significativamente maior do que a cepa 3I, o que levanta a hipótese de que há variações no perfil de adoecimento por estirpes diferentes de *M. leprae* (SHARMA et al., 2018). Em nosso estudo, as cepas do tipo 4 (4N e 4P) estão associadas aos casos de recidiva, insuficiência terapêutica e não melhora clínica com o tratamento, o que pode estar relacionado também à característica de alta taxa de crescimento da cepa.

Estes problemas associados a não melhora do paciente, mesmo com o correto tratamento com a PQT, pode ter sua origem também nas resistências bacterianas aos medicamentos. A pesquisa de droga-resistência é dificultada pelo fato do *M. leprae* não crescer em meios de artificial. Para sua realização, é necessária a inoculação do agente infeccioso em pata de camundongo (GROSSET et al., 1985), uma técnica que requer tempo prolongado para realização, cerca de seis a 12 meses, elevado custo e estrutura laboratorial para manutenção dos animais.

As técnicas de biologia molecular, como PCR e sequenciamento das regiões gênicas, e até mesmo o sequenciamento do genoma completo, facilitaram as pesquisas de mutações que causam droga-resistência de alvos terapêuticos conhecidos como a dapsona, a rifampicina e às drogas alternativas, como as quinolonas. No entanto, a pesquisa de resistência à clofazimina, por biologia molecular, ainda não é possível, uma vez que ainda não se conhecem os marcadores genéticos associados ao seu mecanismo de ação (CAMBAU et al., 2018).

Até meados dos anos de 2010, poucos estudos demonstravam dados robustos sobre a realidade da resistência bacteriana às drogas utilizadas na PQT. Em 2018, um estudo realizado com 1932 cepas isoladas no mundo todo, identificou 8% de mutações que conferiam alguma droga-resistência. Nas 154 cepas, foram observadas 182 mutações que conferiam resistência, sendo 3,8 % mutações conferindo droga-resistência à rifampicina, 4,5% à dapsona, e 1,1% à ofloxacina. 1% resistentes a rifampicina e a dapsona, 0,2% a ofloxacina e dapsona, e nenhum caso com resistência a rifampicina e ofloxacina (CAMBAU et al., 2018). Este estudo foi importante para alertar e impulsionar a OMS sobre a necessidade da vigilância sobre as cepas resistentes (WHO, 2009).

No Brasil, estudos pontuais demonstram a realidade das cepas resistentes, como um estudo realizado em São Paulo que detectou 12,5% de resistência a dapsona, e 5% de resistência a rifampicina (“Relapse and drug resistance in leprosy”, 2011), outro estudo demonstrou 10,7% de resistência a dapsona em várias regiões do país (DIÓRIO et al., 2009),

Em um estudo realizado em 2019, na antiga colônia de hanseníase localizada no Prata, Igarapé-Açu, Estado do Pará, analisou 37 amostras provenientes de pacientes casos novos e com recidiva da doença. No estudo foram detectadas 43,24% mutações referentes à droga-resistência. Dessas cepas analisadas, 8% apresentavam resistência a dapsona, e 2,7% a rifampicina. Foi encontrada também multidroga-resistência a rifampicina e a dapsona em 11% dos pacientes casos novos, e 21,6% dos pacientes com recidiva (ROSA et al., 2019).

Neste estudo, conseguimos amplificar pelo menos 1 gene de interesse em 53% das amostras analisadas. As demais amostras não apresentavam carga bacilar suficiente para a análise, o que aponta uma importante limitação da técnica. 100% das amplificações do gene *rpoB* apresentaram o alelo selvagem, no entanto obtivemos 3% de mutações causando troca de uma pronina por uma arginina no códon 55 do gene, o que conhecidamente confere resistência medicamentosa (MATSUOKA, 2010). Obtivemos 1% de mutação em *gyrA*, com a troca de uma valina por uma isoleucina no códon 731, no entanto essa mutação não acarreta mudança na estrutura da enzima, portanto é uma mutação silenciosa, e 2,5% de mutação na região *gyrB*, com a troca de uma treonina por uma isoleucina no códon 503. Estas mutações foram encontradas em 3 pacientes. Um (2,3%) com recidiva da doença, 1 (20%) com insuficiência terapêutica, e 1 paciente (1,8%) caso novo, sem histórico de tratamento anterior.

A presença de uma cepa hipermutante é de grande importância clínica e epidemiológica para o curso do controle da doença como problema de saúde pública. As mutações ocorrem a partir de mutações espontâneas no cromossomo bacteriano, que eventualmente afetam a DRDR, resultando em uma cepa resistente. Em nosso achado, o acúmulo de mutações provavelmente se deu pela mutação no gene *nth*, responsável pela endonuclease III, uma enzima de papel fundamental nas vias de reparo de mutações do DNA, logo, sua mutação impede sua função de reparo (BENJAK et al., 2018; KROKAN; BJØRÅS, 2013).

Além da mutação na enzima de reparo, a cepa apresentou mais seis pontos de mutação, três delas em região de droga resistência: Mutação em *folP1*, conferindo resistência à dapsona, em *gyrB*, conferindo resistência às fluoroquinolonas, e em *gyrA*, que não confere resistência aos medicamentos (MATSUOKA, 2010).

Diante da importância de uma cepa hipermutante em uma região endêmica avaliamos a dispersão desta cepa a partir da pesquisa nos contatos intradomiciliares. Na avaliação clínica,

detectamos 2,8% de casos novos, a esposa e o filho do casal. Os demais contatos, não apresentaram evidências clínicas da doença. No entanto, apresentaram evidências laboratoriais de infecção subclínica, com Anti-PGL-I positivo (2,8%) e a presença do RLEP em raspado de lóbulos auriculares (50%). O filho, com hanseníase BT, apresentou baixa carga bacilar e por isso, não conseguimos a amplificação do WGS, no entanto, a amplificação das regiões específicas permitiu identificar que as cepas era WT nos genes DRDRs. Já a esposa, também pela baixa carga bacilar, não foi possível a amplificação das regiões DRDR, permanecendo um resultado inconclusivo.

Não foi possível determinar a distribuição de cepas na família e região pela baixa sensibilidade da técnica em amplificar baixas concentrações de DNA de *M. leprae* em casos iniciais de hanseníase. Paciente com cepa primária resistente a medicamentos chama a atenção para a importância de intensificar o monitoramento de cepas resistentes circulantes, especialmente em áreas endêmicas

5. CONCLUSÃO

A hanseníase tem seu diagnóstico dificultado por haver diferentes manifestações clínicas, pela evolução crônica e lenta. Nossos dados demonstram que a ferramenta laboratorial de detecção de RLEP por qPCR dos lóbulos auriculares apresentou muitas vantagens frente aos outros exames laboratoriais disponíveis. A sua associação com a sorologia Anti-PGL-I deve ser utilizada como ferramenta para tomada de decisão para definição de caso de hanseníase, e início de tratamento. A ferramenta molecular possibilitou também o conhecimento do perfil das cepas circulantes na região amazônica, adicionando uma informação desconhecida até então na epidemiologia molecular da doença demonstrando uma grande frequência do genótipo do tipo 4, sugerindo que as cepas circulantes na Amazônia possuem sua origem na África, provavelmente trazidas pelas pessoas que chegaram ao Brasil como escravas, no período da colonização. Possibilitou conhecer as taxas de droga-resistência, chamando a atenção para uma cepa hipermutante com potencial de dispersão na população, se não houver o devido controle e monitoramento dos indivíduos da região, que já é endêmica para a doença.

6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ACHARYA, B. et al. Advances in diagnosis of Tuberculosis: an update into molecular diagnosis of Mycobacterium tuberculosis. **Molecular Biology Reports**, v. 47, n. 5, p. 4065–4075, 1 maio 2020.
- BANERJEE, S. et al. Diagnosing leprosy: revisiting the role of the slit-skin smear with critical analysis of the applicability of polymerase chain reaction in diagnosis. **International Journal of Dermatology**, v. 50, n. 12, p. 1522–1527, 2011.
- BARBOSA DE LIMA FONSECA, A. et al. The influence of innate and adaptative immune responses on the differential clinical outcomes of leprosy. **Infectious diseases of poverty**, v. 6, n. 1, 2017.
- 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.
- BARRETO, J. G. et al. 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, dez. 2012.
- BARRETO, J. G. et al. Spatial epidemiology and serologic cohorts increase the early detection of leprosy. **BMC infectious diseases**, v. 15, p. 527, 16 nov. 2015.
- BELTRÁN-ALZATE, C. et al. Leprosy Drug Resistance Surveillance in Colombia: The Experience of a Sentinel Country. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 10, p. e0005041, out. 2016.
- BENJAK, A. et al. Phylogenomics and antimicrobial resistance of the leprosy bacillus Mycobacterium leprae. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 2018.
- BHATIA, A. S. et al. Clinical and histopathological correlation in the classification of leprosy. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association**, v. 61, n. 3, p. 433–8, set. 1993.
- BLACK, C. M. et al. Head-to-Head Multicenter Comparison of DNA Probe and Nucleic Acid Amplification Tests for Chlamydia trachomatis Infection in Women Performed with an Improved Reference Standard. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 10, p. 3757, 1 out. 2002.
- BOUTH, R. C. et al. Specialized active leprosy search strategies in an endemic area of the Brazilian Amazon identifies a hypermutated Mycobacterium leprae strain causing primary drug resistance. **Frontiers in Medicine**, v. 10, 13 set. 2023.
- BRASIL. **Guia para o controle da hanseníase**. [s.l.: s.n.].
- BRASIL, M. D. S. **Hanseníase | Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis**. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pt-br/tags/agravo/hanseniaze>>. Acesso em: 1 mar. 2020.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portaria nº 3.125 de 7 de outubro de 2010**. BRASIL, 2010.
- BRASIL MINISTÉRIO DA SAÚDE; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Boletim Epidemiológico - Hanseníase**. Brasília: [s.n.].
- CAMBAU, E. et al. Multidrug-resistance to dapsone, rifampicin, and ofloxacin in Mycobacterium leprae. **Lancet (London, England)**, v. 349, n. 9045, p. 103–4, 11 jan. 1997.

- CAMBAU, E. et al. Antimicrobial resistance in leprosy: results of the first prospective open survey conducted by a WHO surveillance network for the period 2009-15. **Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 0, n. 0, 1 mar. 2018.
- CHAKRABARTI, S. et al. Clinico-Pathological Study of Cutaneous Granulomatous Lesions- a 5 yr Experience in a Tertiary Care Hospital in India. **Iranian journal of pathology**, v. 11, n. 1, p. 54–60, jan. 2016.
- CLAVEL, C. et al. Human papillomavirus testing in primary screening for the detection of high-grade cervical lesions: A study of 7932 women. **British Journal of Cancer**, v. 84, n. 12, 2001.
- COLE, S. T. et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. **Nature**, v. 409, n. 6823, p. 1007–1011, 22 fev. 2001.
- COLE, S. T.; SUPPLY, P.; HONORÉ, N. **Repetitive sequences in Mycobacterium leprae and their impact on genome plasticity** Introduction **Lepr Rev.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://leprev.iisl.br/pdfs/2001/v72n4/pdf/v72n4a08.pdf>>. Acesso em: 8 abr. 2019.
- DA SILVA, M. B. et al. Evidence of zoonotic leprosy in Pará, Brazilian Amazon, and risks associated with human contact or consumption of armadillos. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 6, 2018.
- DA SILVA ROCHA, A. et al. Drug and multidrug resistance among Mycobacterium leprae isolates from Brazilian relapsed leprosy patients. **Journal of clinical microbiology**, v. 50, n. 6, p. 1912–7, jun. 2012.
- DE HOLANDA, M. V. et al. Presence of Mycobacterium leprae genotype 4 in environmental waters in Northeast Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 2, 2017.
- DEMSISS, W. et al. Slit-skin smear for the classification of leprosy; are we wasting time and resource? **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 16, n. 81, 2022.
- DEPS, P. et al. Contact with armadillos increases the risk of leprosy in Brazil: A case control study. **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**, v. 74, n. 4, 2008.
- DEPS, P.; COLLIN, S. M. Mycobacterium lepromatosis as a Second Agent of Hansen’s Disease. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 10 set. 2021.
- DHARMAWAN, Y. et al. Delayed detection of leprosy cases: A systematic review of healthcare-related factors. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 16, n. 9, 2022.
- DIÓRIO, S. M. et al. Recidivas associadas à resistência a drogas na hanseníase. **Hansen. int**, v. 34, n. 1, 2009.
- DOCKRELL, H. Keep the faith- Leprosy still needs new diagnostic tools and laboratory research. **Leprosy Review**, v. 82, p. 340–343, 2011.
- DONOGHUE, H. D.; HOLTON, J.; SPIGELMAN, M. PCR primers that can detect low levels of Mycobacterium leprae DNA. 2001.
- DOUGLAS, J. T. et al. The effects of chemotherapy on antibody levels in lepromatous patients. **Leprosy review**, v. 59, p. 127–135, 1988.
- DOUGLAS, J. T. et al. Prospective study of serological conversion as a risk factor for development of leprosy among household contacts. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 11, n. 5, p. 897–900, set. 2004.

- EIDT, L. M. Breve história da hanseníase: sua expansão do mundo para as Américas, o Brasil e o Rio Grande do Sul e sua trajetória na saúde pública brasileira. **Saúde e Sociedade**, v. 13, n. 2, 2004.
- FARACO, J. Bacillos de Hansen e cortes de parafina: metodo complementar para a pesquisa de bacillos de Hansen em cortes de material incluído em parafina. **Revista brasileira de leprologia**, p. 177–180, 1938.
- FINARDI, A. J. et al. Genetic diversity of Mycobacterium leprae in the state of São Paulo, an area of low-leprosy incidence in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 56, 2023.
- FOSS, N. T. Hanseníase: aspectos clínicos, imunológicos e terapêuticos. **An Bras Dermatol**, p. 113–9, 1999.
- FUKUSHIMA, R. et al. Molecular diagnosis of infectious disease. **Nippon Geka Gakkai zasshi**, v. 104, n. 7, p. 518–522, 2003.
- GARBINO, J. A. et al. Primary neural leprosy: systematic review. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 71, n. 6, p. 397–404, jun. 2013.
- GHOSH, S.; CHAUDHURI, S. Chronicles of Gerhard-Henrik Armauer Hansen's life and work. **Indian Journal of Dermatology**, v. 60, n. 3, p. 219, 1 maio 2015.
- GIRIDHAR, M. et al. Clinicohistopathological concordance in leprosy - a clinical, histopathological and bacteriological study of 100 cases. **Indian journal of leprosy**, v. 84, n. 3, p. 217–25, 2012.
- GONÇALVES BARRETO, J. et al. Anti-PGL-I seroepidemiology in leprosy cases: household contacts and school children from a hyperendemic municipality of the Brazilian Amazon. **Brazilian Journal of Dermatology**, v. 56, n. 1, p. 1–6, 2011. ***Dr Marcello Candia Reference Unit in Sanitary Dermatology of the State of Pará. **Leprosy Review**, 2011.
- GOULART, I. M. B. et al. Efeitos adversos da poliquimioterapia em pacientes com hanseníase: um levantamento de cinco anos em um Centro de Saúde da Universidade Federal de Uberlândia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 5, 2002.
- GOULART, I. M. B. et al. Risk and protective factors for leprosy development determined by epidemiological surveillance of household contacts. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, n. 1, 2008.
- GOULART, I. M. B.; PENNA, G. O.; CUNHA, G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao Mycobacterium leprae. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 4, p. 363–375, ago. 2002.
- GROSSET, J. et al. **Drug sensitivity testing of M. leprae. International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, 1985.
- GUEDES SALGADO, C. et al. **What do we actually know about leprosy worldwide? The Lancet Infectious Diseases**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.who.>>. Acesso em: 1 ago. 2018.
- HAN, X. Y. et al. A new Mycobacterium species causing diffuse lepromatous leprosy. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 130, n. 6, p. 856–864, 2008.
- HANSENÍASE, H.; BACILOSCOPIA, B. Guia de procedimentos técnicos. 2010.
- HENRIQUE, M. C. Escravos no purgatório: o leprosário do Tucunduba (Pará, século XIX). **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 19, n. suppl 1, p. 153–177, dez. 2012.
- HENRY, M. et al. Factors Contributing to the Delay in Diagnosis and Continued Transmission of Leprosy in Brazil-An Explorative, Quantitative, Questionnaire Based Study. 2016.

- JACOBSON, R.; HASTINGS, ROBERTC. RIFAMPIN-RESISTANT LEPROSY. **The Lancet**, v. 308, n. 7998, p. 1304–1305, 11 dez. 1976.
- JHA, R.; KARKI, S. Limitations of clinico-histopathological correlation of skin biopsies in leprosy. **Journal of Nepal Health Research Council**, v. 8, n. 1, p. 40–3, 1 abr. 2010.
- JOSHI, R. Clues to histopathological diagnosis of treated leprosy. **Indian journal of dermatology**, v. 56, n. 5, p. 505–9, 2011.
- KAMAL, R. et al. Evaluation of diagnostic role of in situ PCR on slit-skin smears in pediatric leprosy. **Indian journal of leprosy**, v. 82, n. 4, p. 195–200, 1 out. 2010.
- KROKAN, H. E.; BJØRÅS, M. Base excision repair. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 5, n. 4, p. a012583, 1 abr. 2013.
- LAHIRI, R.; KRAHENBUHL, J. L. The role of free-living pathogenic amoeba in the transmission of leprosy: a proof of principle. **Leprosy Review**, v. 79, n. 4, 2008.
- LEHMAN, L. F. L. et al. **AVALIAÇÃO NEUROLÓGICA SIMPLIFICADA**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/avaliacao_neuro_hanseniose.pdf>. Acesso em: 26 ago. 2018.
- LUSLI, M. et al. Dealing with stigma: experiences of persons affected by disabilities and leprosy. **BioMed research international**, v. 2015, p. 261329, 2015.
- MAIA, M. V.; CUNHA, M. DA G. S.; CUNHA, C. S. Adverse effects of alternative therapy (minocycline, ofloxacin, and clofazimine) in multibacillary leprosy patients in a recognized health care unit in Manaus, Amazonas, Brazil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 88, n. 2, 2013.
- MARIA, I. et al. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao Mycobacterium leprae. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 4, p. 363–375, ago. 2002.
- MARQUES, G. F. et al. Esquema alternativo para tratamento de hanseníase multibacilar em um caso de hepatotoxicidade durante a poliquimioterapia. **Hansen. int**, v. 37, n. 2, 2012.
- MATSUOKA, M. **Drug resistance in leprosy**. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, 2010.
- MCDOUGALL, A. C.; PONNIGHAUS, J. M.; FINE, P. E. M. Histopathological examination of skin biopsies from an epidemiological study of leprosy in Northern Malawi. **International Journal of Leprosy**, v. 55, n. 1, 1987.
- MINELLI, L. Etiopatogenia da hanseníase. **Semina Ciências Agrárias**, v. 4, n. 14, p. 452–454, 1983.
- MONOT, M. et al. On the Origin of Leprosy. **Science**, v. 308, n. 5724, 2005.
- MONOT, M. et al. Comparative genomic and phylogeographic analysis of Mycobacterium leprae. **Nature genetics**, v. 41, n. 12, p. 1282–9, dez. 2009a.
- MONOT, M. et al. Comparative genomic and phylogeographic analysis of Mycobacterium leprae. **Nature Genetics**, v. 41, n. 12, p. 1282-U39, 1 dez. 2009b.
- MOURA, R. S. DE et al. Leprosy serology using PGL-I: a systematic review. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41 Suppl 2, p. 11–8, jan. 2008.

NADKARNI, N. S.; REGE, V. L. Significance of histopathological classification in leprosy. **Indian journal of leprosy**, v. 71, n. 3, p. 325–32, 1999.

NAKATA, N.; KAI, M.; MAKINO, M. Mutation Analysis of Mycobacterial *rpoB* Genes and Rifampin Resistance Using Recombinant Mycobacterium smegmatis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 4, p. 2008–2013, abr. 2012.

NARANG, T. et al. Alternate anti-leprosy regimen for multidrug therapy refractory leprosy: A Retrospective Study from a Tertiary Care Center in North India. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 1, 2019.

OLIVEIRA, F. R. et al. Clinical Applications and Methemoglobinemia Induced by Dapsone. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 10, p. 1770–1779, 2014.

PETTIT, J. H.; REES, R. J. Sulphone Resistance in Leprosy. an Experimental and Clinical Study. **Lancet (London, England)**, v. 2, n. 7361, p. 673–4, 1964a.

PETTIT, J. H. S.; REES, R. J. W. SULPHONE RESISTANCE IN LEPROSY. **The Lancet**, v. 284, n. 7361, p. 673–674, 26 set. 1964b.

PLOEMACHER, T. et al. Reservoirs and transmission routes of leprosy; A systematic review. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 4, p. e0008276, 27 abr. 2020.

Relapse and drug resistance in leprosy. Revista de Saude Publica, 2011.

RIDLEY, D. S. Histological classification and the immunological spectrum of leprosy. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 51, n. 5, p. 451–65, 1974.

RIDLEY, D. S. & J. W. H. Classification of Leprosy According to Immunity A Five-group System. **International Journal Of Leprosy**, v. 34, n. 3, p. 1215, 1966.

RIDLEY, D. S.; HILSON, G. R. F. A logarithmic Index of Bacilli in biopsies. **International journal of leprosy**, v. 25, p. 184–186, 1967.

ROSA, P. S. et al. Emergence and transmission of drug/multidrug-resistant Mycobacterium leprae in a former leprosy colony in the Brazilian Amazon. **Clinical Infectious Diseases**, 1 jul. 2019.

SABIN, T. D. Neurologic features of lepromatous leprosy. **American family physician**, v. 4, n. 1, p. 84–94, jul. 1971.

SALGADO, C. G. et al. miRNome expression analysis reveals new players on leprosy immune physiopathology. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. MAR, 2018.

SCALIANTE DE MOURA, R. et al. **Leprosy serology using PGL-I: a systematic review** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v41s2/v41s2a04.pdf>>. Acesso em: 23 set. 2018.

SCHILLING, A. K. et al. British red squirrels remain the only known wild rodent host for leprosy bacilli. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 6, n. FEB, 2019.

SCHURING, R. P. et al. Association between anti-PGL-I IgM and clinical and demographic parameters in leprosy. **Leprosy review**, v. 77, p. 345–355, 2006.

SCOLLARD, D. M. et al. The continuing challenges of leprosy. **Clinical microbiology reviews**, v. 19, n. 2, p. 338–81, abr. 2006.

- SEMWAL, S. et al. Clinico-Histological Correlation in Hansen's Disease: Three-year Experience at a Newly Established Tertiary Care Center in Central India. **Indian journal of dermatology**, v. 63, n. 6, p. 465–468, 2018.
- SHARMA, R. et al. Differential growth of *Mycobacterium leprae* strains (SNP genotypes) in armadillos. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 62, p. 20–26, 1 ago. 2018.
- SINGH, P.; COLE, S. T. *Mycobacterium leprae* : genes, pseudogenes and genetic diversity. **Future Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 57–71, jan. 2011.
- SIQUEIRA, L. F. DE G.; ALMEIDA, R. G. DE; BELDA, W. Comportamento tintorial do *Mycobacterium leprae*: revisão histórica. **Revista de Saúde Pública**, v. 17, n. 4, p. 297–315, ago. 1983.
- SIWAKOTI, S. et al. Evaluation of Polymerase Chain Reaction (PCR) with Slit Skin Smear Examination (SSS) to Confirm Clinical Diagnosis of Leprosy in Eastern Nepal. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 12, p. e0005220, dez. 2016.
- SPENCER, J. S.; BRENNAN, P. J. The Role of *Mycobacterium leprae* Phenolic Glycolipid I (PGL-I) in Serodiagnosis and in the Pathogenesis of Leprosy. **Leprosy review**, v. 82, p. 344–357, 2011.
- SPIERINGS, E. et al. Novel mechanisms in the immunopathogenesis of leprosy nerve damage: The role of Schwann cells, T cells and *Mycobacterium leprae*. **Immunology and Cell Biology**, v. 78, n. 4, p. 349–355, 1 ago. 2000a.
- SPIERINGS, E. et al. Novel mechanisms in the immunopathogenesis of leprosy nerve damage: The role of Schwann cells, T cells and *Mycobacterium leprae*. **Immunology and Cell Biology**, v. 78, n. 4, p. 349–355, 1 ago. 2000b.
- SRINIVAS, D.; SUNEETHA, P. N. R. T. S. S. L. S.; RAO, P. N. **BACTERIAL INDEX OF GRANULOMA AND ITS RELEVANCE COMPARED TO BI OF SKIN SMEARS**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.lepra.org.uk/platforms/lepra/files/lr/Mar02/0012.pdf>>. Acesso em: 14 set. 2018.
- STEFANI, M. M. A. et al. Assessment of anti-PGL-I as a prognostic marker of leprosy reaction. **International Journal of Leprosy**, v. 66, n. 3, 1998.
- SUZUKI, K. et al. Infection during infancy and long incubation period of leprosy suggested in a case of a chimpanzee used for medical research. **Journal of clinical microbiology**, v. 48, n. 9, p. 3432–4, set. 2010.
- TAKIFF, H. E. et al. Cloning and nucleotide sequence of *Mycobacterium tuberculosis* gyrA and gyrB genes and detection of quinolone resistance Cloning and Nucleotide Sequence of *Mycobacterium tuberculosis* gyrA and gyrB Genes and Detection of Quinolone Resistance Mutations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, n. 4, p. 773–780, 1994.
- TANG, Y. W.; OU, C. Y. **Past, present and future molecular diagnosis and characterization of human immunodeficiency virus infections**. **Emerging Microbes and Infections**, 2012.
- TRINDADE, M. A. B. et al. Delayed diagnosis of multibacillary leprosy: a report of eight cases. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 13, n. 2, p. 155–157, abr. 2009a.
- TRINDADE, M. A. B. et al. Delayed diagnosis of multibacillary leprosy: a report of eight cases. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 13, n. 2, p. 155–157, abr. 2009b.
- TRUMAN, R. **Leprosy in wild armadillos**. **Leprosy Review**, 2005.

- VALERO, C.; MARTÍN-GÓMEZ, M. T.; BUITRAGO, M. J. Molecular Diagnosis of Endemic Mycoses. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, v. 9, n. 1, 1 jan. 2022.
- VAN BRAKEL, W. H. et al. The prognostic importance of detecting mild sensory impairment in leprosy: a randomized controlled trial (TRIPOD 2). **Leprosy review**, v. 74, n. 4, p. 300–10, dez. 2003.
- VAN BRAKEL, W. H. et al. Disability in people affected by leprosy: the role of impairment, activity, social participation, stigma and discrimination. **Global health action**, v. 5, 2012.
- VARGO, J. et al. Clinical specificity and sensitivity of a blood screening assay for detection of HIV-1 and HCV RNA. **Transfusion**, v. 42, n. 7, 2002.
- WATERS, M. F. R. To smear or not to smear? **Leprosy review**, v. 73, n. 3, p. 211–4, set. 2002.
- WHO. Chemotherapy of leprosy for control programmes. **World Health Organization technical report series**, v. 675, p. 1–33, 1982.
- WHO. Guidelines for global surveillance of drug resistance in leprosy. **World Health Organization**, 2009.
- WHO. World Health Organization, Global Leprosy Strategy 2016-2020. 2017.
- WHO. Towards zero leprosy Global Leprosy (Hansen's disease) Strategy 2021-2030. **World Health Organization**, p. 1–30, 2021.
- WHO | A guide for surveillance of antimicrobial resistance in leprosy: 2017 update. **WHO**, 2017.
- WHO | Classification of leprosy. **WHO**, 2016.
- WHO | Weekly Epidemiological Record, 30 August 2019, vol. 94, 35/36 (pp. 389–412). **WHO**, 2019.
- WILLIAMS, D. L. et al. Primary multidrug-resistant leprosy, United States. **Emerging infectious diseases**, v. 19, n. 1, p. 179–81, jan. 2013.
- WILLIAMS, D. L.; GILLIS, T. P. Drug-resistant leprosy: Monitoring and current status. **Lepr Rev**, v. 83, n. 3, p. 269–281, 2012.
- WITT, D. J. et al. Analytical performance and clinical utility of a nucleic acid sequence-based amplification assay for detection of cytomegalovirus infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 11, 2000.
- YANG, S.; ROTHMAN, R. E. **PCR-based diagnostics for infectious diseases: Uses, limitations, and future applications in acute-care settings**. **Lancet Infectious Diseases**, 2004.
- YOKOYAMA, K. et al. Amino Acid Substitutions at Position 95 in GyrA Can Add Fluoroquinolone Resistance to Mycobacterium leprae. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 2, p. 697–702, fev. 2012a.
- YOKOYAMA, K. et al. Impact of Amino Acid Substitutions in B Subunit of DNA Gyrase in Mycobacterium leprae on Fluoroquinolone Resistance. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 10, p. e1838, 11 out. 2012b.
- YOON, K. H. et al. Evaluation of polymerase chain reaction amplification of Mycobacterium leprae-specific repetitive sequence in biopsy specimens from leprosy patients. **Journal of clinical microbiology**, v. 31, n. 4, p. 895–9, abr. 1993.

APÊNDICE



OPEN ACCESS

EDITED BY

Helioswilton Sales-Campos,
Universidade Federal de Goiás, Brazil

REVIEWED BY

Mallika Lavania,
National Institute of Virology (ICMR), India
Mircea Ioan Popa,
Carol Davila University of Medicine and
Pharmacy, Romania

*CORRESPONDENCE

Raquel Carvalho Bouth
✉ raquelbouth@gmail.com
Claudio Guedes Salgado
✉ csalgado@ufpa.br

RECEIVED 20 June 2023

ACCEPTED 25 August 2023

PUBLISHED 13 September 2023

CITATION

Bouth RC, Gobbo AR, Barreto JG, do Carmo
Pinto PD, Bittencourt MS, Frade MAC,
Nascimento AC, Bandeira SS, da Costa PF,
Conde GAB, Avanzi C, Ribeiro-dos-Santos Â,
Spencer JS, da Silva MB and Salgado CG (2023)
Specialized active leprosy search strategies in
an endemic area of the Brazilian Amazon
identifies a hypermutated *Mycobacterium
leprae* strain causing primary drug resistance.
Front. Med. 10:1243571.
doi: 10.3389/fmed.2023.1243571

COPYRIGHT

© 2023 Bouth, Gobbo, Barreto, do Carmo
Pinto, Bittencourt, Frade, Nascimento,
Bandeira, da Costa, Conde, Avanzi, Ribeiro-
dos-Santos, Spencer, da Silva and Salgado. This
is an open-access article distributed under the
terms of the [Creative Commons Attribution
License \(CC BY\)](#). The use, distribution or
reproduction in other forums is permitted,
provided the original author(s) and the
copyright owner(s) are credited and that the
original publication in this journal is cited, in
accordance with accepted academic practice.
No use, distribution or reproduction is
permitted which does not comply with these
terms.

Specialized active leprosy search strategies in an endemic area of the Brazilian Amazon identifies a hypermutated *Mycobacterium leprae* strain causing primary drug resistance

Raquel Carvalho Bouth^{1*}, Angélica Rita Gobbo¹,
Josafá Gonçalves Barreto^{1,2}, Pablo Diego do Carmo Pinto³,
Maraya Semblano Bittencourt⁴, Marco Andrey Cipriani Frade⁵,
Apolônio Carvalho Nascimento⁶, Sabrina Sampaio Bandeira⁶,
Patricia Fagundes da Costa¹, Guilherme Augusto Barros Conde⁷,
Charlotte Avanzi^{8,9}, Ândrea Ribeiro-dos-Santos³,
John Stewart Spencer⁹, Moises Batista da Silva¹ and
Claudio Guedes Salgado^{1,10*}

¹Laboratório de Dermato-Imunologia, Universidade Federal do Pará, Marituba, Pará, Brazil, ²Spatial Epidemiology Laboratory, Federal University of Pará, Castanhal, Brazil, ³Laboratório de Genética Humana e Médica, ICB, UFPA, Belém, Brazil, ⁴Santa Casa de Misericórdia do Pará – Serviço de Dermatologia – UFPA, Belém, Brazil, ⁵Divisão de Dermatologia, Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, ⁶Unidade de Referência Especializada em Dermatologia Sanitária do Estado do Pará – URE Dr. Marcelo Candia, Marituba, Pará, Brazil, ⁷Laboratório de Suporte à Distância, Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém, Pará, Brazil, ⁸Department of Medical Parasitology and Infection Biology, Swiss Tropical and Public Health Institute, Basel, Switzerland, ⁹Department of Microbiology, Immunology and Pathology, Mycobacteria Research Laboratories, Colorado State University, Fort Collins, CO, United States, ¹⁰Coordenação de Atenção às Doenças Transmissíveis na Atenção Primária à Saúde, Departamento de Gestão do Cuidado Integral, Secretaria de Atenção Primária à Saúde, Ministério da Saúde, Brasília, Brazil

Introduction: Leprosy, an infectious disease caused by *Mycobacterium leprae*, remains a public health concern in endemic countries, particularly in Brazil. In this study, we conducted an active surveillance campaign in the hyperendemic city of Castanhal in the northeastern part of the state of Pará using clinical signs and symptoms combined with serological and molecular tools to diagnose new cases and to identify drug resistance of circulating *M. leprae* strains and their distribution in the community.

Methods: During an active surveillance of one week, we enrolled 318 individuals using three different strategies to enroll subjects for this study: (i) an active survey of previously treated cases from 2006 to 2016 found in the Brazil National Notifiable Disease Information System database ($n = 23$) and their healthy household contacts (HHC) ($n = 57$); (ii) an active survey of school children (SC) from two primary public schools in low-income neighborhoods ($n = 178$), followed by visits to the houses of these newly diagnosed SC ($n = 7$) to examine their HHC ($n = 34$) where we diagnosed additional new cases ($n = 6$); (iii) and those people who spontaneously presented themselves to our team or the local health center with clinical signs and/or symptoms of leprosy ($n = 6$) with subsequent follow-up of their HHC when the case was confirmed ($n = 20$) where we diagnosed two additional cases ($n = 2$). Individuals received a dermato-neurological examination,

5 ml of peripheral blood was collected to assess the anti-PGL-I titer by ELISA and intradermal earlobe skin scrapings were taken from HHC and cases for amplification of the *M. leprae* RLEP region by qPCR.

Results: Anti-PGL-I positivity was highest in the new leprosy case group (52%) followed by the treated group (40.9%), HHC (40%) and lowest in SC (24.6%). RLEP qPCR from SSS was performed on 124 individuals, 22 in treated cases, 24 in newly diagnosed leprosy cases, and 78 in HHC. We detected 29.0% (36/124) positivity overall in this sample set. The positivity in treated cases was 31.8% (7/22), while in newly diagnosed leprosy cases the number of positives were higher, 45.8% (11/23) and lower in HHC at 23.7% (18/76). Whole genome sequencing of *M. leprae* from biopsies of three infected individuals from one extended family revealed a hypermutated *M. leprae* strain in an unusual case of primary drug resistance while the other two strains were drug sensitive.

Discussion: This study represents the extent of leprosy in an active surveillance campaign during a single week in the city of Castanhal, a city that we have previously surveyed several times during the past ten years. Our results indicate the continuing high transmission of leprosy that includes fairly high rates of new cases detected in children indicating recent spread by multiple foci of infection in the community. An unusual case of a hypermutated *M. leprae* strain in a case of primary drug resistance was discovered. It also revealed a high hidden prevalence of overt disease and subclinical infection that remains a challenge for correct clinical diagnosis by signs and symptoms that may be aided using adjunct laboratory tests, such as RLEP qPCR and anti-PGL-I serology.

KEYWORDS

leprosy, *Mycobacterium leprae*, household contacts, school children, drug resistance

1. Introduction

Leprosy, caused by the human pathogen *Mycobacterium leprae*, is a chronic, slowly evolving disease that causes damage to skin and nerves resulting in a wide array of skin lesions, nerve inflammation and pain leading to nerve impairment, loss of sensation, muscle weakening, atrophy and bone loss leading to disfigurement and disability with resulting social stigma. It remains a public health problem, especially in middle and low-income countries, such as India, Brazil, and Indonesia, where 79.6% of all global new cases were reported in 2019, when 202,185 new cases were detected globally. Brazil detected the second largest number of cases worldwide after India, with 27,863 new cases (1). The Brazil Amazon region, besides being highly endemic, has been depicted as having a very high hidden prevalence of leprosy (2). *M. leprae* primarily infects the peripheral nerves and later the skin (3, 4). Transmission from person to person is thought to be through the aerosol route, mainly in persons living in close contact for extended periods of time (5). Therefore, daily and continuous exposure with untreated patients make household contacts (HHC) a high-risk group in disease control strategies (6). Leprosy in children below 15 years old indicates recent infection to the bacillus during the early years of life and active circulation of bacilli in the community (7). This group was included as a target in the strategy for early detection and disrupting the transmission chain, aiming for the elimination of leprosy as a public health problem by the World Health Organization (8).

Early detection through contact tracing and active surveillance is essential to break the chain of transmission, to prevent severe neural involvement and physical disabilities due to disease progression. The diagnosis still relies on identifying well-characterized clinical signs and symptoms, with the detection of peripheral nerve damage, loss of sensation, and skin lesions. Laboratory tools, such as bacilloscopy in slit skin smears (SSS) (9), histopathology of skin lesions and molecular biology for detecting the *M. leprae*-specific repetitive element RLEP in SSS and skin biopsy (10, 11) as well as anti-PGL-I serology titer (2, 12, 13) support case elucidation, patient and HHC follow-up, and evaluation of subclinical infection in the community.

Together with the difficulties in the clinical diagnosis of leprosy and the absence of laboratory tools, drug resistance is an aggravating factor in controlling leprosy. The emergence of drug resistance has been reported since 1960 (14), and the presence of point mutations within genes in the drug resistance determining region (DRDR) is widely considered an important molecular signature for drug resistance in leprosy (15). Mutations in the *folP1* and *rpoB* genes confer resistance to the first line drugs used in the multidrug therapy (MDT) regimen, dapsone and rifampicin respectively, while mutations in *gyrA* and *gyrB* confer resistance to quinolones, second-line drugs of choice for leprosy treatment (16, 17).

Drug-resistant strains from 2009–2015 were recently described worldwide from MB leprosy cases from 19 sentinel countries for resistance to rifampicin, dapsone and ofloxacin showing around 2.3% in new cases and 4.5% in relapsed cases with 154 out of 1,932 (8%) *M. leprae* strains found overall with drug resistant mutations (18). In

Brazil, a study with relapsed leprosy patients from the states of Rio de Janeiro, Espírito Santo, Amazonas, Pará and Ceará showed mutations associated with drug-resistance in *folP1* (5.3%), *rpoB* (7%), and *gyrA* (2.6%) (19). In the Brazilian Amazon region, the detection of drug resistance variants reached 43.2% among leprosy patients in a former leprosy colony, Prata Village (20), that is located less than 40 Km from Castanhal, the city of our study.

In this study, we conducted an active surveillance campaign in the hyperendemic city of Castanhal using clinical signs and symptoms combined with serological and molecular tools to diagnose new cases and to identify drug resistance of circulating *M. leprae* strains and their distribution in the community.

2. Methods

2.1. Study area

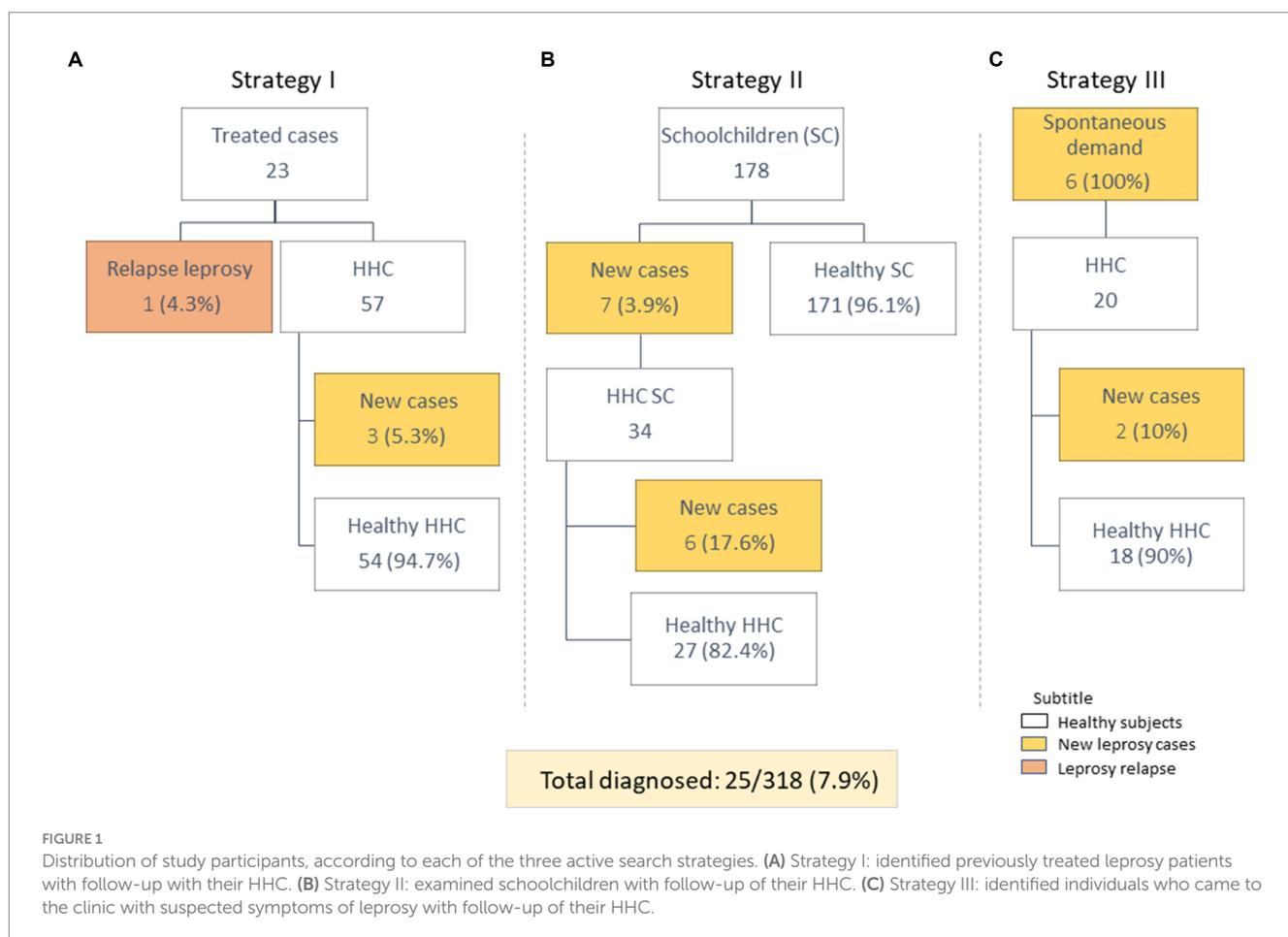
Castanhal is a municipality located 68 Km from Belém, the capital city of the state of Pará, Northern Brazil Amazon region, with an estimated population of 198,000 inhabitants in 2018 (21). The municipality has 76.4% of the urban population covered by the Family Health Strategy (SUS, the primary health service in charge of leprosy diagnosis), which is much higher than Belém that had only 22% coverage in 2016 (22). The average leprosy new case detection rate in the last ten years in Castanhal was 42.7/100,000 inhabitants,

considered hyperendemic according to the WHO and Brazilian Ministry of Health (23).

2.2. Fieldwork

Fieldwork was carried out using three distinct strategies: (i) active survey of reported and multidrug therapy (MDT) treated cases from 2006 to 2016 at the Brazil National Notifiable Disease Information System and their HHC (Figure 1A), (ii) active survey of school children (SC) from two primary public schools in peripheral and low-income neighborhoods, followed by a visit of the houses of the SC diagnosed with leprosy to examine their HHC (Figure 1B), and (iii) people who spontaneously presented themselves to our team, or the local health center, with signs and/or symptoms of leprosy as well as a visit to their HHC when the case was confirmed (Figure 1C).

The active survey was conducted according to the following scheme. All subjects were clinically evaluated by our team of health professionals (including a leprosy specialist, nurse and physiotherapist) and had peripheral blood and earlobe SSS collected according to established protocols. Biopsy of skin lesions was performed for pathological analyses by hematoxylin and eosin to detect cellular infiltrates and Fite-Faraco staining for quantifying acid-fast bacilli (AFB) (24) in a logarithmic index, resulting in the bacillary index (BI) registered from 0 to 6+ (25) depending on the number of AFB detected in the sample. The sample's BI is related to the number of



M. leprae genome copies in the sample collected which is a determining factor for predicting the success rate for *M. leprae* whole genome sequencing (WGS) (26).

2.3. Clinical evaluation

In the clinical evaluation, the leprosy physician examines the skin of each individual and when suspected characteristic skin lesions were detected, a sensitivity test was performed using the Semmes-Weinstein monofilament (27). Based on the Simplified Neurological Evaluation protocol proposed by the Brazil leprosy control program (28), peripheral nerves were examined by palpation as well as determining sensitivity, motor and autonomic functions for all nerves, including trigeminal, facial and auricular on face and neck; radial, radial cutaneous, median and ulnar nerves in the upper limbs; and fibular, superficial fibular and tibial nerves in the lower limbs. The assessment of neural impairment and grade of disability varied from 0 to 2, where grade 0 represents an absence of physical disability, grade 1 those individuals with decrease or loss of sensitivity on hands and/or feet, and grade 2 those with visible physical disabilities in eyes and/or limbs (8).

2.4. Laboratory analyses

Five milliliters of peripheral blood were collected from all individuals for the serological assay for the detection of anti-PGL-I antibodies by the ELISA technique, using the ND-O-HSA antigen, through a protocol described previously (29).

SSS were collected from both earlobes in one eppendorf tube containing 70% ethanol (13). After rehydration of the pelleted material in phosphate buffer saline (PBS), DNA extraction was performed using the Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Germantown, MD) following the manufacturer's recommendations. Amplification of the specific *M. leprae* RLEP region was performed by quantitative PCR (qPCR) using forward LP1 (5'-GTGAGGGTAGTTGTT-3') and reverse LP2 (5'-GGTGCGAATAGTT-3') primers (30). The qPCR amplification mixture contained 5 μ L of PCR grade water, 10 μ L of SYBR green fluorescent DNA binding dye, 1 μ L of primers and 10 ng of total DNA or 10 ng of positive control *M. leprae* DNA, or 4 μ L of PCR grade water as a negative control, in a total volume of 25 μ L per reaction. Each reaction was conducted in duplicate and the contents were processed and read by an Applied Biosystems® 7,500 Real-Time PCR System. The reaction occurred with the following specifications: Uracil-DNA glycosylase (UDG) at 50°C for 2 min, prior 95°C for 2 min for initial denaturation followed by 45 cycles, each cycle consisting of denaturation at 95°C for 15 s, annealing at 58°C for 15 s and extension at 72°C for 1 min. A melting curve was performed in each experiment. A standard amplification curve was prepared with purified *M. leprae* starting at 10⁹ bacilli genome copies/ μ L. The standard curve was composed of five points and was performed by serial dilution (1,100 to 1,5,000). The melting curve was used to analyze the specificity of the amplification. The results were obtained according to the first fluorescence signal detection cycle threshold (Ct). The sample was considered positive when duplicate samples showed a Ct less than 45 cycles. The standard curve was performed on each plate and included three negative control samples for each experiment.

Two skin biopsies were collected from each patient showing altered sensitivity skin lesions by a dermatologist using a 4 mm disposable punch (25). One fragment was stored in 10% formalin for

histopathological examination and the other fragment was placed in 70% alcohol for WGS. Formalin fixed samples were dehydrated, clarified, and embedded in paraffin. Slides of 5 μ m thickness were obtained from blocks sectioned with a microtome and subsequently deparaffinized. Sections were stained with hematoxylin–eosin to evaluate cellular infiltration and with Fite-Faraco for AFB detection (31).

For WGS of skin biopsy material, DNA was extracted using a pre-established protocol combining host tissue digestion and the QIAmp microbiome kit for host DNA depletion, strong bacterial cell lysis, and silica-based purification (26). Libraries with low *M. leprae* content underwent enrichment using whole-genome tiling arrays as described previously (32).

2.5. Statistical analysis

To compare the medians of the test results, the Mann–Whitney test was performed for two independent non-parametric samples. The statistical test and the plotting of results on graphs were performed using the GraphPad prism® program (version 6.1), the significance level of 0.5 ($p \leq 0.05$) was used.

3. Results

During the fieldwork week, we evaluated a total of 318 individuals and diagnosed 25 cases (7.9%) using the three different strategies (Figure 1). In the previously treated case group, we evaluated 23 individuals and diagnosed one relapse (1/23; 4.3%). Among their HHC, three new cases were diagnosed (3/57; 5.3%) (Figure 1A). In the SC survey, 178 students were examined and 7 were diagnosed as new leprosy cases (7/178, 3.9%). The HHC of newly diagnosed SC were examined and six of 34 of these (17.6%) were diagnosed (Figure 1B). Six individuals with spontaneous demand (those who visited the clinic with symptoms of leprosy) were diagnosed (6/6; 100.0%) and two of the 20 HHC from these new cases (2/20; 10.0%) were diagnosed (Figure 1C).

The newly diagnosed leprosy cases ($n = 25$) ranged in age from 4 to 64 years old. Of these, nine (9/25; 36%) were children under 15 years old. The clinical forms were classified as: Primary neural (2/25; 8%), Indeterminate (3/25; 12%), Tuberculoid (1/25; 4%), Borderline (17/25; 60%), and Lepromatous leprosy (2/25; 8%). The disability grade of new cases was categorized as: Grade 0 (17/25; 68%), Grade 1 (6/25; 24%), and Grade 2 (2/25; 8%).

The anti-PGL-I IgM antibody titer was positive in 32.7% of all individuals (104/318). Among newly diagnosed leprosy cases, the positivity was 52% (13/25), the O.D. median was 0.31 while for treated cases the positivity was 40.9% (9/22) with an O.D. median of 0.21. HHC were positive in 40.0% (40/100) with an O.D. median of 0.24 and 24.6% (42/171) of SC were positive with an O.D. median of 0.18 (Table 1 and Supplementary Table S1). The statistical test showed a significant difference between SC and HHC ($p = 0.003$, 95% CI -0.09 to -0.019) and between SC and new leprosy cases ($p = 0.018$, 95% CI -0.017 to -0.198) (Figure 2).

RLEP qPCR from SSS was performed on 124 individuals, 22 in treated cases, 24 in newly diagnosed leprosy cases, and 78 in HHC. We detected 29.0% (36/124) positivity overall in this sample set. The positivity in treated cases was 31.8% (7/22), while in newly diagnosed

leprosy cases the number of positives were higher, 45.8% (11/23) and lower in HHC at 23.7% (18/76). The percentage of double-positives overall (anti-PGL-I IgM+/RLEP qPCR+) was 5.6% (7/124). In the individual groups double positivity was 16.7% (4/24) for new leprosy cases, 4.5% (1/22) for treated cases and 2.6% (2/78) for HHC (Table 1).

A total of 22 skin biopsies were sampled from newly diagnosed leprosy patients. Three samples (3/22, 13.6%) were confirmed as leprosy by histopathology due to the presence of AFB. Three samples (3/22, 13.6%) were classified as superficial spongioid dermatitis; three samples (3/22, 13.6%) were classified as granulomatous dermatitis and 13 (13/22, 59.2%) were classified as superficial perivascular dermatitis. RLEP qPCR was performed for 17 biopsies and was positive in seven of these (7/17, 41.2%), among which only three (42.8%) were positive for AFB and confirmed as leprosy by histopathology. Of the remaining samples, 2/7 (28.6%) were characterized as superficial perivascular dermatitis while the other 2/7 (28.6%) were characterized as granulomatous dermatitis.

Only five of the RLEP positive samples had enough bacillary DNA for WGS (n = 2) or to fully sequence the drug resistance determining region (DRDR) by PCR sequencing (n = 3). The two strains fully sequenced were covered 111 (patient 3702) and 57 times (patient 51447), respectively. 51447 was wild type (WT) for *rpoB*, *folp1*, *gyrA*, and *gyrB* while another was found to be a hypermutated *M. leprae* strain (3702), with multiple mutations in the DRDR genes *folp1* (P55L), *gyrA* (V731I) and *gyrB* (T503I). There were additional mutations found in a number of other genes, including *fadD9* (G796S), *ribD* (A63T), *pks4* (M14I) and *nth* (N142fs) (26). Raw genome sequences were deposited into the NCBI Sequence Read Archive (SRA) with biosample numbers SAMN07514430 (3702 or Br2016-15) and SAMN36810538 (Br51447). Both of these isolates were SNP type 4N which predominates in this region (Supplementary Table S1). The remaining three samples were WT in *rpoB* and *folp1* and two were WT for *gyrA*. None of the three amplified the *gyrB* gene, so this gene could not be characterized.

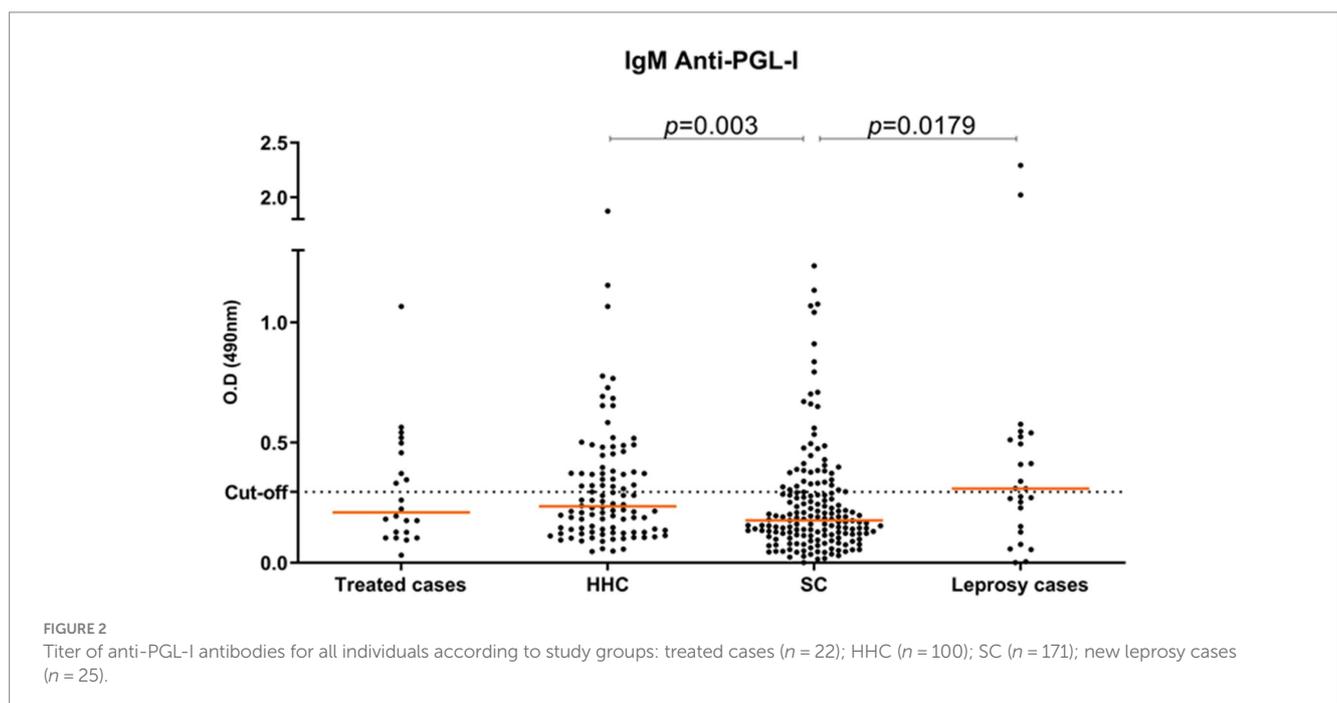
TABLE 1 Positivity of anti-PGL-I IgM, molecular detection of RLEP and association of the two tests in the groups of the study.

Groups	Anti-PGL-I				RLEP (qPCR)				Double				
	Median	Positive		Negative		Positive		Negative		Positive		Negative	
	(O.D.)	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)
New leprosy cases	0.31	13	52.0	12	48.0	11	45.8	13	54.2	4	16.7	5	20.8
Leprosy treated cases	0.21	9	40.9	13	59.1	7	31.8	15	68.2	1	4.5	7	31.8
HHC ^a	0.24	40	40.0	60	60.0	18	23.1	60	76.9	2	2.0	32	34.0
SC ^b	0.18	42	24.6	129	75.4	NA ^c	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Total		104	32.7	214	67.3	36	29.0	88	71.0	7	5.0	44	31.4

^aHHC: Household contacts.

^bSC: School children.

^cNA: Not available.



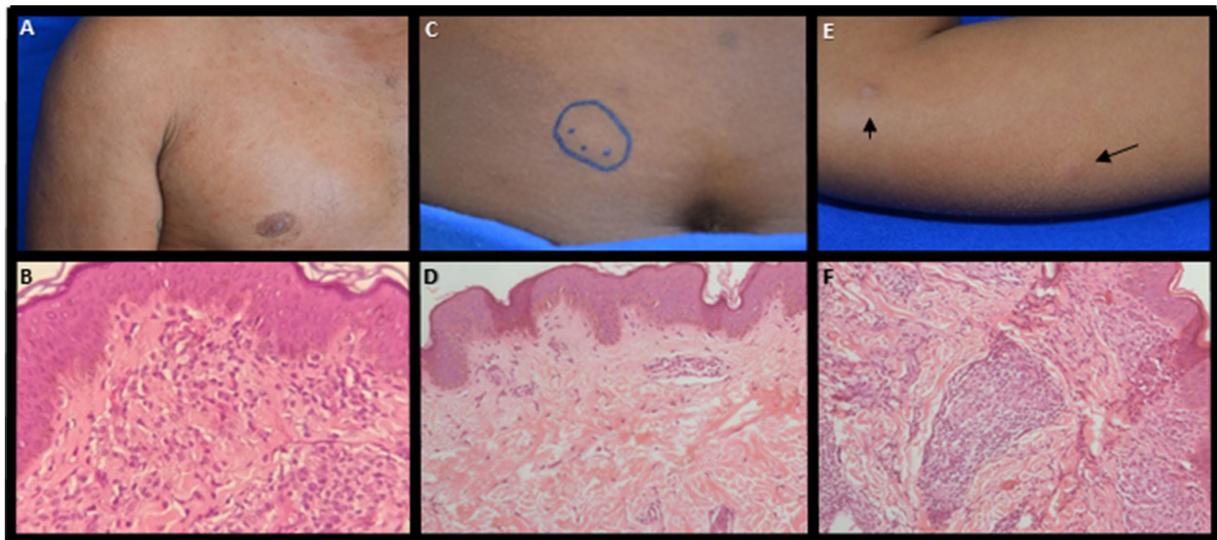


FIGURE 3 Clinical and pathological examination evaluation. Primary drug-resistant leprosy case (A) presence of infiltrative lesions and nodules disseminated through the integument; (B) dense granulomatous inflammatory infiltrate composed of lymphocytes, epithelioid histiocytes of foamy cytoplasm and plasmocytes, involving vessels, nerve filaments and superficial and deep plexus attachments; (C) spouse presented hypochromic plaque in the abdomen; (D) epidermis with a mild acanthosis and dermis with minimal perivascular lymphocytic infiltrate in the upper dermis and negative AFB. (E) son with hypochromic maculae with the presence of tubers in the right arm and elbow; (F) dense granulomatous inflammatory infiltrate of nodular architecture, composed of lymphocytes, plasmocytes and cytoplasmic epithelioid histiocytes with few positive AFB.

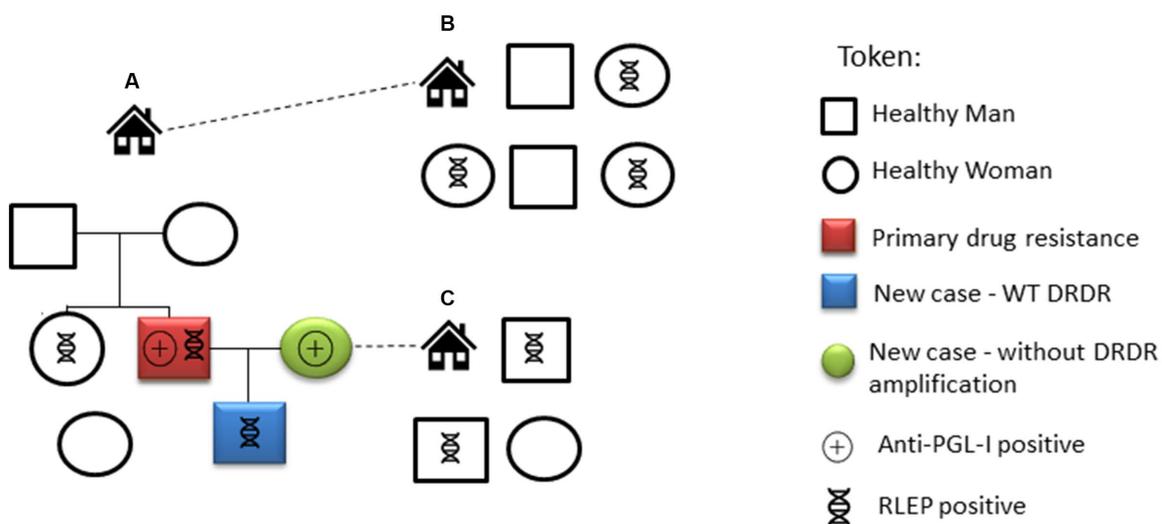


FIGURE 4 Evaluation and laboratory exams of the primary drug-resistant leprosy case and his contacts. House A residents: the individual primary drug-resistant case (red square), his spouse (green circle), their son (blue square) and other relatives. Residents of house B, located close to house A, are life-long contacts. Relatives of the spouse live in house C. The positive results for anti-PGL-I serology and detection of RLEP for each individual are shown.

3.1. Case findings of three diagnosed leprosy patients in a single extended family

3.1.1. The primary multidrug-resistant leprosy case

A 31-year-old male with no prior history of leprosy presented infiltrative and nodular lesions disseminated throughout the skin, including face and ears, for at least one-year. After clinical evaluation,

he was diagnosed with lepromatous leprosy (Figure 3A). The neurological evaluation showed three affected nerves with no disability (DG0). Adjunct laboratory tests demonstrated positive results for: SSS (BI 3.5), anti-PGL-I IgM antibody (O.D. = 2.02), positive RLEP qPCR in SSS (Ct=32) and histopathological examination showing a dense superficial and deep granulomatous inflammatory infiltrate with a nodular architecture composed of lymphocytes, epithelioid histiocytes of foamy cytoplasm and

plasmocytes involving vessels and nerve filaments (Figure 3B). The Fite-Faraco staining was also positive, with AFB either isolated or forming globi classified histopathologically as borderline lepromatous (BL) according to Ridley and Jopling classification. Molecular evaluation of the skin lesion was RLEP positive. Whole genome sequencing identified the strain as SNP subtype 4N and as a hypermutated *M. leprae* strain with multiple mutations in the DRDR genes *folp1* (P55L), *gyrA* (V731I), *gyrB* (T503I), and in several other genes, including *fadD9* (G796S), *ribD* (A63T), *pks4* (M14I) and *nth* (N142fs). Regarding the treatment of this patient, after 11 doses of standard MDT, new nodular lesions in the lower limbs continued to appear at which time the WGS results confirmed dapsone resistance. The treatment regimen substituted daily minocycline 100 mg for dapsone and after 12 additional doses with this modified regimen the patient showed improvement in the clinical and laboratory parameters including an absence of active lesions, a decrease in the BI to 2.5 and a lower anti-PGL-I titer to 0.42. These laboratory parameters continued to decrease 6 months after medical discharge with a BI of 2.0 and a negative anti-PGL-I titer of 0.27. Fourteen of the HHC of this individual were evaluated, and 2 (14.3%), a spouse and son, were diagnosed with clinical signs and symptoms of leprosy. The IgM anti-PGL-I titers were positive only in 2 samples (14.3%) and negative in the remaining ten HHCs, varying from O.D. 0.11 to 0.28. The amplification of the RLEP of SSS samples by qPCR was positive in 6/12 HHC (50%) considered clinically healthy (Figure 4).

The spouse, 21-years-old, presented a hypochromic skin plaque larger than 10 cm diameter with imprecise edges (pseudopods) on the abdomen (Figure 3C) with loss of sensation, and DG0. She was classified as borderline leprosy (BT) with a positive anti-PGL-I titer (O.D. = 0.41) and negative for RLEP by qPCR in SSS. The histopathological examination of the skin biopsy showed an epidermis with mild acanthosis and minimal perivascular lymphocytic infiltrate in the upper dermis. AFB were absent by the Fite-Faraco stain, and the lesion was diagnosed as minimal superficial perivascular dermatitis (Figure 3D).

The son, 4-years-old, had hypochromic lesions with the presence of tubers in the left forearm, left forehead, and right forearm (Figure 3E) associated with thickening of the left ulnar nerve, DG0 and negative serology (O.D. = 0.28). He was also clinically classified as borderline leprosy. Histopathological examination demonstrated a dense granulomatous inflammatory infiltrate of nodular architecture composed of lymphocytes, plasmocytes and cytoplasmic epithelioid histiocytes (Figure 3F), with AFB (1+) on the sections examined by Fite-Faraco stain with the diagnostic definition of borderline tuberculoid (BT) leprosy by histopathology according to Ridley and Jopling classification. The qPCR performed on the SSS sample was positive (Ct=41.4) for RLEP of *M. leprae*. The molecular analysis of the skin biopsy showed WT alleles in *rpoB*, *folp1*, *gyrA* and *gyrB*.

4. Discussion

Castanhal is a city in the northeastern part of Pará state, an endemic area that has been monitored by our leprosy surveillance team since 2010 (12). The municipality presents structural challenges in terms of public health, including the capacity to diagnose leprosy cases early and perform contact tracing and follow-up. In only 1 week

of fieldwork, our group detected 25 new cases, which represents 71.4% of the number of cases detected in a year before the study (35 new cases) (29). The delay in diagnosis was supported by the presence of grade 2 physical disability (DG2) in 8% of cases and the number of new cases of leprosy in children under 15 (9/25, 36%) indicates ongoing recent infection from multiple foci of spread within the community corresponding to 4.5-fold more than was diagnosed by the local health team in 2015 (23). Leprosy diagnosis is primarily based on clinical signs and symptoms identified by well-trained leprologists. Laboratory tests with high sensitivity and specificity are not able to diagnose those with leprosy in all clinical forms and cannot even predict which at-risk HHC with positive anti-PGL-I titers will eventually progress to disease (33). However, laboratory tools may help identify biomarkers of subclinical infection, supported by the fact that individuals who do not show obvious clinical signs and symptoms of leprosy, considered healthy contacts, can be identified as having been infected if they have a positive anti-PGL-I titer and/or confirmed acid-fast bacilli or RLEP PCR positivity in SSS or skin lesion biopsy (13). We have previously shown that HHC with a positive anti-PGL-I titer have an 8.6-fold higher risk of progressing to disease than those with negative serology within 4 years (12). In this current study, almost 10% of the HHC had a confirmed leprosy diagnosis and 40.0% of clinically healthy HHC were seropositive. This means that 4 out of 10 HHC have this higher risk of developing leprosy.

Another important tool is the detection of *M. leprae* DNA, which may assist in the monitoring of asymptomatic HHC in an endemic area (34). In our study, we used RLEP, a repetitive region with up to 37 copies in the *M. leprae* genome (35). Therefore, its detection is efficient even when there are low levels of *M. leprae* DNA in different samples (10) and correlates with the bacilloscopy index and the clinical form (11). In our study, 23.1% of HHC had a positive RLEP qPCR result in SSS. In addition, we found that 2% of HHC were double-positive (anti-PGL-I+/RLEP qPCR+), results that we have previously established as likely representing latent leprosy disease (13). These individuals live in an endemic area, have leprosy cases in their household, are positive for *M. leprae* DNA in the ear lobe and show a non-protective immune response against the bacillus allowing its ability to grow and spread. Despite not showing clinical signs and symptoms of leprosy, individuals positive for both biomarkers of infection likely are subclinical with latent disease and need continuous monitoring by the local health team. Moreover, the presence of *M. leprae* confirmed by intradermal smear microscopy or skin biopsy is one of the cardinal signs for leprosy case definition by the WHO (36). In fact, RLEP qPCR is just a more sensitive method to detect *M. leprae* through the presence of DNA in either SSS or skin biopsy, and this alone should be considered sufficient to diagnose such individuals and to subsequently treat them early with MDT to effectively break the transmission chain and to avoid a delayed diagnosis with severe nerve damage and disability.

Our strategies of active surveillance for new cases among contacts of former patients that had already been treated and among school children allows many of these cases to be diagnosed in their earliest clinical manifestations, with light clinical signs and symptoms without significant nerve damage or disability, which are often poorly understood by the patient, their family and even for many untrained professionals. Thus, early diagnosis and treatment of cases prior to the development of nerve damage are extremely important to break the

transmission chain and to avoid disfigurement and disabilities that can lead to stigma and social isolation.

The patient found with drug resistant *M. leprae* was apparently a case of primary drug resistance with no previous history of the patient being treated for leprosy. Luckily, our study showed that the son of this patient was not infected by this hypermutated strain, his strain was WT and drug sensitive. A limitation of this study was that although six of the 12 individuals in this extended family were RLEP+, none of these individuals had enough DNA to allow for sequencing and the spouse, who was diagnosed with leprosy, was qPCR negative for RLEP. Nevertheless, the finding of a patient with a strain resistant to dapsona, one of the main drugs used in the MDT regimen to treat most patients, in addition to mutations in *gyrA* and *gyrB* indicating possible resistance to fluoroquinolones, important second-line drugs used for the treatment of leprosy, should draw attention to the increased danger and prevalence of multidrug resistant strains and provide an incentive for increased funding for testing more clinical strains for drug resistance, especially in endemic areas. There is also a need to seek new alternative drug regimens that can be substituted in cases of resistance to the three main drugs used in MDT as was eventually used to treat the patient with the hypermutated strain and to identify new and more effective antimycobacterial drugs to facilitate a real break in the transmission chain of these strains in the community (37).

5. Conclusion

Our surveillance activities in just 1 week in an area hyperendemic for leprosy in the Amazon region of Brazil (Castanhal, Pará State) showed high transmission rates of leprosy. It also revealed a high hidden prevalence of overt disease and subclinical infection that remains a challenge for correct clinical diagnosis by signs and symptoms that may be aided using adjunct laboratory tests, such as RLEP qPCR and anti-PGL-I serology. The spread of leprosy can be worsened by the presence of drug resistant *M. leprae* strains that are potentially circulating in this population, which should be monitored more closely.

Data availability statement

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found at (NCBI Sequence Read Archive, SRR6241736).

Ethics statement

The studies involving human participants were reviewed and approved by Institute of Health Sciences Research Ethics Committee from Pará Federal University (CAAE 26765414.0.0000.0018 CEP-ICS/UFPa). Written informed consent to participate in this study was provided by the participant or participants' legal guardian/next of kin.

The studies were conducted in accordance with the local legislation and institutional requirements. Written informed consent was obtained from all individuals and/or minors' legal guardian/next of kin for the publication of any potentially identifiable images or data included in this article, including data in [Supplementary Table S1](#).

Author contributions

RB, JB, JS, MS, and CS: contributed to the research design and writing the draft manuscript. RB, AG, MB, PCa, MB, MF, AN, SB, PCo, GC, ÂR-d-S, and CS: collected data and organized the database. RB, GC, CA, JS, MS, and CS: performed statistical and data analysis. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

This work was supported by CNPq (486183/2013–0 CNPq grant for MS; 448741/2014–8 grant for JB; 428964/2016–8 grant and 313633/2018–5 fellowship for CS; and 306815/2018–4 grant for ÂR-d-S), CAPES PROAMAZONIA 3288/2013, CAPES Biocomputacional – RPGPH (3381/2013), Brazil Ministry of Health 035527/2017, PROPESP/UFPa, VALE S.A. 27756/2019, Fulbright Scholar to Brazil 2019–2020 (JS) and the Heiser Program of the New York Community Trust for Research in Leprosy (JB, MS, CS, and JS) grants P15-000827, P16-000796, and P18-000250.

Acknowledgments

We thank all study participants.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2023.1243571/full#supplementary-material>

References

- WHO. Global leprosy (Hansen disease) update, 2019: time to step-up prevention initiatives. *Wkly Epid Rec.* (2020) 95:389–412.
- Salgado CG, Ferreira DVG, Frade MAC, Guimarães LDS, Da Silva MB, Barreto JG. High anti-phenolic glycolipid-I IgM titers and hidden leprosy cases, Amazon region. *Emerg Infect Dis.* (2012) 18:889–90. doi: 10.3201/eid1805.111018
- Kaplan G, Cohn ZA. The immunobiology of leprosy. *Int Rev Exp Pathol.* (1986) 28:45–78.
- Britton WJ. Immunology of leprosy. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* (1993) 87:508–14. doi: 10.1016/0035-9203(93)90066-Y
- 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. *Clin Inf Dis.* (2016) 63:1412–20. doi: 10.1093/cid/ciw570
- Moet FJ, Meima A, Oskam L, Richardus JH. Risk factors for the development of clinical leprosy among contacts, and their relevance for targeted interventions. *Lepr Rev.* (2004) 75:310–26. doi: 10.47276/lr.75.4.310
- Barreto JG, Frade MAC, Bernardes Filho F, da Silva MB, Spencer JS, Salgado CG. Leprosy in children. *Curr Infect Dis Rep.* (2017) 19:23. doi: 10.1007/s11908-017-0577-6
- Pan American Health Organization. (2016). Global leprosy strategy 2016–2020. Available at: <https://www.paho.org/en/documents/global-leprosy-strategy-2016-2020-accelerating-towards-leprosy-free-world>
- Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity: a five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* (1966) 34:255–73.
- 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) 5:e1354. doi: 10.1371/journal.pntd.0001354
- Azevedo MD, Ramunho NM, Fachine LRV, Tassa M, Rosa PS, Belone ADFF, et al. qPCR detection of *Mycobacterium leprae* in biopsies and slit skin smear of different leprosy clinical forms. *Braz J Inf Dis.* (2017) 21:71–8. doi: 10.1016/j.bjid.2016.09.017
- Barreto JG, Bisanzio D, Frade MAC, Moraes TMP, Gobbo AR, Guimarães LDS, et al. Spatial epidemiology and serologic cohorts increase the early detection of leprosy. *BMC Infect Dis.* (2015) 15:527–35. doi: 10.1186/s12879-015-1254-8
- da Silva MB, Li W, Bouth RC, Gobbo AR, Messias ACC, Moraes TMP, et al. Latent leprosy infection identified by dual RLEP and anti-PGL-I positivity: implications for new control strategies. *PLoS One.* (2021) 16:e0251621. doi: 10.1371/journal.pone.0251621
- Pettit JHS, Rees RJW. Sulphonhe resistance in leprosy. *Lancet.* (1964) 284:673–4. doi: 10.1016/S0140-6736(64)92482-1
- Maeda S, Matsuoka M, Nakata N, Kai M, Maeda Y, Hashimoto K, et al. Multidrug resistant *Mycobacterium leprae* from patients with leprosy. *Antimicrob Agents Chemother.* (2001) 45:3635–9. doi: 10.1128/AAC.45.12.3635-3639.2001
- Williams DL, Gillis TP. Drug-resistant leprosy: monitoring and current status. *Lepr Rev.* (2012) 83:269–81. doi: 10.47276/lr.83.3.269
- Yokoyama K, Kim H, Mukai T, Matsuoka M, Nakajima C, Suzuki Y. Impact of amino acid substitutions in B subunit of DNA gyrase in *Mycobacterium leprae* on fluoroquinolone resistance. *PLoS Negl Trop Dis.* (2012) 6:e1838. doi: 10.1371/journal.pntd.0001838
- Cambau E, Saunderson P, Matsuoka M, Cole ST, Kai M, Suffys P, et al. Antimicrobial resistance in leprosy: results of the first prospective open survey conducted by a WHO surveillance network for the period 2009–15. *Clin Microbiol Inf.* (2018) 24:1305–10. doi: 10.1016/j.cmi.2018.02.022
- da Silva Rocha A, Cunha M, Diniz LM, Salgado C, Aires MA, Nery JA, et al. Drug and multidrug resistance among *Mycobacterium leprae* isolates from Brazilian relapsed leprosy patients. *J Clin Microbiol.* (2012) 50:1912–7. doi: 10.1128/JCM.06561-11
- Rosa PS, D'Espindula HRS, Melo ACL, Fontes ANB, Finardi AJ, Belone AFF, et al. Emergence and transmission of drug/multidrug-resistant *Mycobacterium leprae* in a former leprosy colony in the Brazilian Amazon. *Clin Infect Dis.* (2020) 70:2054–61. doi: 10.1093/cid/ciz570/5526733
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). (2021). Estimativa da População, Castanhal, Pará. Available at: <https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/pa/castanhal.html>
- Salgado CG, Barreto JG, da Silva MB, Frade MAC, Spencer JS. What do we actually know about leprosy worldwide? *Lancet Inf Dis.* (2016) 16:778. doi: 10.1016/S1473-3099(16)30090-1
- BRASIL. DATASUS. (2019). Available at: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=02>
- WHO. (1987). *Leprosy unit*. Laboratory techniques for leprosy. Available at: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/61778/WHO_CDS_LEP_86.4_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Ridley DS, Hilson GRF. A logarithmic index of bacilli in biopsies. *Int J Lepr.* (1967) 25:184–6.
- Benjak A, Avanzi C, Singh P, Loiseau C, Girma S, Busso P, et al. Phylogenetics and antimicrobial resistance of the leprosy bacillus *Mycobacterium leprae*. *Nat Commun.* (2018) 9:352–62. doi: 10.1038/s41467-017-02576-z
- Frade MAC, Rosa DJF, Bernardes Filho F, Spencer JS, Foss NT. Semmes-Weinstein monofilament: a tool to quantify skin sensation in macular lesions for leprosy diagnosis. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* (2021) 87:807–15. doi: 10.25259/IJDVL_622_19
- Lehman L.F., Orsini M.B.P., Fuzikawa P.L., Lima R.C., Gonçalves S.D. (1997). Avaliação neurológica simplificada. Available at: http://bvms.saude.gov.br/bvms/publicacoes/avaliacao_neuro_hanseniase.pdf
- Barreto JG, Guimarães LD, Leão MRN, Ferreira DVG, Lima RADA, Salgado CG. Anti-PGL-I seroepidemiology in leprosy cases: household contacts and school children from a hyperendemic municipality of the Brazilian Amazon. *Lepr Rev.* (2011) 82:358–70. doi: 10.47276/lr.82.4.358
- Donoghue HD, Holton J, Spigelman M. PCR primers that can detect low levels of *Mycobacterium leprae* DNA. *J Med Microbiol.* (2001) 50:177–82. doi: 10.1099/0022-1317-50-2-177
- Fite GL, Cambre PJ, Turner MH. Procedure for demonstrating lepra bacilli in paraffin sections. *Arch Pathol.* (1947) 43:624.
- Schuenemann VJ, Singh P, Mendum TA, Krause-Kyora B, Jäger G, Bos KI, et al. Genome-wide comparison of medieval and modern *Mycobacterium leprae*. *Science.* (2013) 341:179–83. doi: 10.1126/science.1238286
- Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev.* (2006) 19:338–81. doi: 10.1128/CMR.19.2.338-381.2006
- Gama RS, Gomides TAR, Gama CFM, Moreira SJM, Manta FSDN, De Oliveira LBP, et al. High frequency of *M. leprae* DNA detection in asymptomatic household contacts. *BMC Infect Dis.* (2018) 18:153. doi: 10.1186/s12879-018-3056-2
- Cole ST, Supply P, Honoré N. Repetitive sequences in *Mycobacterium leprae* and their impact on genome plasticity. *Lepr Rev.* (2001) 72:449–61.
- WHO. (2023). *Leprosy*. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leprosy>
- Neto FBDA, Feitosa RDB, Da Silva MS. Daily moxifloxacin, clarithromycin, minocycline and clofazimine in nonresponsive leprosy cases to recommended treatment regimen. *Int J Trop Dis.* (2020) 3:035. doi: 10.23937/2643-461X/1710035