



UnB

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE MEDICINA

PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

DANIELLE COSTA AQUINO

**DETECÇÃO DA RESISTÊNCIA BACTERIANA À RIFAMPICINA, DAPSONA E
OFLOXACINA EM PACIENTES HANSÊNICOS COM BAIXO ÍNDICE
BACILOSCÓPICO**

BRASILIA

2021

**DETECÇÃO DA RESISTÊNCIA BACTERIANA À RIFAMPICINA, DAPSONA E
OFLOXACINA EM PACIENTES HANSÊNICOS COM BAIXO ÍNDICE
BACILOSCÓPICO**

DANIELLE COSTA AQUINO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília para obtenção do título de mestre em Ciências Médicas, na área de concentração: Medicina.

Orientador: Prof. MD. PhD. Ciro Martins Gomes

BRASÍLIA

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

Cd Costa Aquino, Danielle
Detecção da resistência bacteriana à rifampicina, dapsona e ofloxacina em pacientes hansênicos com baixo índice baciloscópico / Danielle Costa Aquino; orientador Ciro Martins Gomes. -- Brasília, 2021.
63 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Ciências Médicas) -- Universidade de Brasília, 2021.

1. Hanseníase. 2. Teste de sensibilidade microbiana. 3. Reação em cadeia de polimerase. 4. Terapêutica. 5. Leprosy. I. Martins Gomes, Ciro, orient. II. Título.

DANIELLE COSTA AQUINO

**DETECÇÃO DA RESISTÊNCIA BACTERIANA À RIFAMPICINA, DAPSONA E
OFLOXACINA EM PACIENTES HANSÊNICOS COM BAIXO ÍNDICE
BACILOSCÓPICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médica da Universidade de Brasília para obtenção do título de mestre em Ciências Médicas, na área de concentração: Medicina.

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ciro Martins Gomes- Orientador

Universidade de Brasília

Profª. Dra. Fabíola Cristina Ribeiro Zucchi

Universidade de Brasília

Prof. Dr Alexandre Casimiro de Macedo

Ministério da Saúde do Brasil

Profª. Dra. Leticia Fernandes Barroso

Suplente Universidade Católica de Brasília

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho `a Deus e minha família, em especial aos meus pais e irmã, por conhecerem e fazerem parte da minha trajetória e ao meu eterno namorado pelo apoio e paciência. Eles fazem parte da minha trajetória e me permitiram viver esse grande momento de realização pessoal e profissional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por manter minha perseverança e fé;

Aos meus pais, Juarez Dantas de Aquino e Francisca Pontes da Costa Aquino, pelos exemplos de luta e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida

A minha irmã, Marina Costa Aquino, pelo companheirismo, amizade e pelas palavras de motivação em cada momento dessa jornada;

Ao orientador Prof. Dr. Ciro Martins Gomes, por compartilhar sua experiência, pela lealdade e confiança;

Ao meu companheiro de vida, Edson Vilela da Rocha, pelo companheirismo e compreensão por minha ausência na construção desse trabalho.

Aos residentes de Dermatologia e equipe multidisciplinar que atendem os pacientes do ambulatório de hanseníase do HuB-DF.

Aos colegas de trabalho, pelo apoio e ajuda nos laboratórios e coletas de matérias: Selma Regina Penha Silva pelo apoio nas coletas da baciloscopia, Laís Sevilha pela dedicação em todos os momentos nos ambulatórios, pelo apoio dos colegas do Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal – LACEN – DF, Carlos Augusto de Sousa, Fabiano José Queiroz Costa e Agenor de Castro Moreira dos Santos Júnior

RESUMO

Introdução: A resistência antimicrobiana na hanseníase é um problema crescente, e o impacto de pacientes com baixos índices baciloscópicos (IBs) na sensibilidade dos testes moleculares é desconhecido. Objetivamos avaliar a sensibilidade do sequenciamento genético para a detecção de mutações relacionadas à resistência antimicrobiana do *Mycobacterium leprae* em pacientes com baixos IBs por meio de um modelo analítico. **Métodos:** Pacientes com hanseníase foram incluídos e divididos em dois grupos dependendo do Bis ($\geq 2+$ e $< 2+$). As sensibilidades dos dois métodos de extração de DNA foram comparadas após amplificação e sequenciamento do elemento repetitivo (RLEP), folP1, rpoB e gyrA do *M. leprae*. **Resultados:** Incluímos 56 pacientes com hanseníase: 35 tinham IBs menor que 2+ (22 tinham baciloscopia negativa) e 21 pacientes com IBs maior ou igual a 2+. A sensibilidade da amplificação do alvo RLEP e do sequenciamento gênico de folP1, rpoB e gyrA foi de 50 a 70% menor em pacientes com IB menor que 2+ e foi significativamente reduzida em pacientes com IBs mais baixos para todos os alvos ($p < 0,001$). Um paciente apresentava uma mutação no gene folP1 e 14 pacientes tinham mutações no gene gyrA, mas nenhuma mutação relacionada à resistência antimicrobiana foi encontrada. **Conclusões:** Podemos concluir que a sensibilidade dos testes moleculares está diretamente relacionada ao IB, mas esses testes ainda podem detectar até 20% dos alvos em pacientes com IBs $< 2+$. Devem ser desenvolvidas novas estratégias para facilitar a detecção da resistência antimicrobiana em pacientes com hanseníase e critérios clínicos razoáveis para o acompanhamento e a introdução de tratamentos alternativos.

Palavras-chave: Hanseníase; Teste de sensibilidade microbiana; Reação em cadeia da polimerase; terapêutica.

ABSTRACT

Introduction: Antimicrobial resistance in leprosy is an emerging problem, and the quantitative impact of low bacilloscopic indexes (BIs) on the sensitivity of molecular tests is unknown. We aimed to evaluate the sensitivity of gene sequencing for the detection of mutations related to antimicrobial resistance in *Mycobacterium leprae* in patients with low BIs using an analytical model. **Methods:** Leprosy patients were included and divided into two groups depending on their Bis ($\geq 2+$ and $< 2+$). The sensitivities of the two DNA extraction methods were compared after amplifying and sequencing the repetitive element (RLEP), folP1, rpoB and gyrA in *M. leprae*. **Results:** We included 56 leprosy patients: 35 had Bis less than 2+ (22 had negative slit-skin smear [SSS] results) and 21 patients with BIs greater than or equal to 2+. The sensitivity of the amplification of the RLEP target and the gene sequencing of folP1, rpoB and gyrA was 50 to 70% lower in patients with a BI less than 2+ (Table 5) and was significantly reduced in patients with lower BIs for all targets ($p < 0.001$). One patient had a mutation in the folP1 gene, and 14 patients had mutations in the gyrA gene, but no mutations related to antimicrobial resistance were found. **Conclusions:** We can conclude that the sensitivity of molecular tests is directly related to the BI, but these tests can still detect up to 20% of the targets in patients with BIs $< 2+$. New strategies to facilitate the more sensitive detection of antimicrobial resistance in leprosy patients and reasonable clinical criteria for follow-up and the introduction of alternative treatments must be developed.

Keywords: Leprosy; Microbial Sensitivity Tests; Polymerase Chain Reaction; Therapeutics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Epidemiologia da hanseníase no ano de 2019.....	18
Figura 2 – Taxa de detecção geral de casos novos de hanseníase.	19
Figura 3- Proporção de casos novos de hanseníase segundo sexo e faixa etária 2015-2019....	20
Figura 4- Proporção de casos novos de hanseníase segundo escolaridade e região de residência. Brasil, 2015 a 2019.	20
Figura 5- Demonstração clínica da hanseníase indeterminada.....	25
Figura 6 - Demonstração clínica de acometimento neurológico localizado em paciente com hanseníase tuberculóide – Garra ulnar.	26
Figura 7 - Demonstração clínica da hanseníase dimorfo-tuberculóide.....	27
Figura 8 - Demonstração clínica da hanseníase dimorfo-virchowiana.	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Pares de Iniciadores usados em todas as reações em cadeia da polimerase	40
Tabela 2 - Tabela comparando as características demográficas de cada grupo estratificado conforme o índice bacilosópico.	45
Tabela 3 - Tabela comparando as diversas formas de classificação da hanseníase em grupos estratificados pelo índice baciloscópicos.	47
Tabela 4 - Diferenças relacionadas ao tratamento prescrito em pacientes estratificados pelo índice bacilosópico.	48
Tabela 5 - Sensibilidade e intervalo de confiança de 95% das técnicas diagnósticas e de detecção da resistência por grupos estratificados de acordo com o índice bacilosópico.	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA – Ácido desoxirribonucleico

MB – Multibacilar

OMS – Organização Mundial da Saúde

PB – Paucibacilar

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PQT – Poliquimioterapia

RLEP – Elemento repetitivo

LISTA DE SÍMBOLOS

°C – Graus Celsius

(\geq) - Maior ou igual

< - Menor que

+ - Cruzes

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Histórico da hanseníase.....	16
1.2. Epidemiologia da Hanseníase.....	17
1.3. Fisiopatologia da hanseníase e microbiologia do <i>M. leprae</i>	21
1.4. Imunologia da hanseníase.....	22
1.5. Classificação da hanseníase	23
1.6. Hanseníase Indeterminada (paucibacilar).....	24
1.7. Hanseníase tuberculóide (paucibacilar).....	25
1.9. Hanseníase Virchowiana (multibacilar).....	28
1.10. Diagnóstico da hanseníase	29
1.11. Tratamento da hanseníase	32
1.12. Resistência medicamentosa na hanseníase.....	33
2. JUSTIFICATIVA	35
4. OBJETIVOS	36
4.1 Geral.....	36
4.2 Específicos	36
5. METODOLOGIA	37
Recrutamento	37
Coleta de amostra e extração do DNA.....	38
PCR para <i>M. Leprae</i>	38
Amplificação dos Alvos Genéticos De Resistência folP1, rpoB e gyra (<i>nested PCR</i>).....	41
Sequenciamento genético dos alvos de resistência.....	41
6. RESULTADOS	44
7. DISCUSSÃO	52
8. CONCLUSÃO	56
8.1 Geral.....	56
8.2 Específicos	56

1. INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença infecciosa contagiosa, transmissível, de evolução lenta causada por uma micobactéria denominada *Mycobacterium leprae*. A doença acomete preferencialmente o sistema nervoso periférico para depois acometer a pele, interessando a qualquer especialidade médica, por acometer diversos órgãos e sistemas, levando a incapacidade inestéticas e funcionais. A hanseníase também denominada como *leprosy* (inglês), *lèpre* (francês), mal de Hansen (MH), foi eliminada em diversos países do mundo, mas ainda é endêmica nos países em desenvolvimento. No Brasil, o termo lepra deixou de ser adotado por conta do seu teor estigmatizante, sendo assim, substituído por hanseníase (LIMEIRA, Omesina Maroja e colab., 2013) e (Belda e Junior, e colab.,2014) e (Lei que dispõe sobre a terminologia oficial relativa `a hanseníase e dá outras providências, número 9.010, de 29 de março de 1995.)

É uma patologia que apesar de ser vista como ramo da dermatologia, ela deve ser de interesse de qualquer especialidade na área da saúde, por tratar-se de uma doença que independe da classe social, pode comprometer vários órgãos e sistemas, além de causar incapacidades físicas e inestéticas nos pacientes que não foram precocemente tratados. A hanseníase é um grave problema de saúde pública pois pode resultar na incapacidade física permanente, além de apresentar altos níveis endêmicos com distribuição variada nas diferentes regiões do país, fatores que geram dificuldades para o seu controle epidemiológico (Diretrizes para vigilância, atenção e eliminação da hanseníase como problema de saúde pública, Ministério da Saúde, 2016).

1.1. Histórico da hanseníase

Acredita-se que as micobactérias surgiram há cerca de 150 milhões de anos, mas a época do aparecimento exato da hanseníase não é conhecida, porém foi identificada em múmias de cristãos no Egito da História Antiga do século V e VI antes de Cristo (BARBERIS e colab., 2017). O *Micobacterium leprae* foi a primeira bactéria descrita como patógena para o homem, descoberta por Hansen em 1873. Documentos históricos já relacionaram a hanseníase como castigos divinos, o que fortalece a constante segregação social e o preconceito enfrentado pelos pacientes acometidos (LASTÓRIA e DE ABREU, 2014).

No Brasil, os primeiros relatos da hanseníase são provenientes da época da colonização, a hanseníase foi trazida para as Américas pelos colonizadores espanhóis e portugueses e, ainda pelos escravos africanos. Condições sanitárias desfavoráveis e a falta de recursos econômicos enfrentados por grande parte da população brasileira culminam na manutenção da doença como problema grave de saúde pública, até os dias atuais. Até o século XX, a política de controle da doença era baseada no isolamento compulsório dos pacientes acometidos visando assim, o controle da transmissão. Esta política de isolamento mostrou que, além de violar de forma irreversível os direitos humanos dos pacientes acometidos, não tinha efetividade científica comprovada. Cabe aqui lembrar que países desenvolvidos como os países do bloco europeu reduziram dramaticamente a incidência da hanseníase com políticas de saúde pública, mesmo antes do advento do tratamento antibioticoterápico efetivo (Organização Mundial da saúde-OMS, 2016).

Até meados do século XX, não existia tratamento efetivo contra a hanseníase. Diversas descrições podem ser encontradas incluindo o uso de plantas medicinais e de óleos para injeção subcutânea. Nenhum destes tratamentos mostrou-se realmente benéfico para os

pacientes acometidos. Na década de 1940, a sulfona foi introduzida como monoterapia para o tratamento da hanseníase e persistiu como o tratamento padrão até a década de oitenta (SAGA e YAMAGUCHI, 2009). O desenvolvimento de estratégias para antibioticoterapia representou uma grande mudança para o histórico da hanseníase que a partir deste momento tornou-se uma doença curável (ANDRADE e colab., 2021).

1.2. Epidemiologia da hanseníase

A hanseníase afeta mais de 120 países e anualmente tem 200.000 novos casos reportados mundialmente (ORGANIZATION, 2020). Por ser uma doença que pode resultar em incapacidades físicas torna-se estigmatizante e discriminativa. Fatores climáticos, nutricionais, econômicos, movimentos migratórios, e, principalmente, terapia inadequada, facilitam a propagação da endemia. Estes fatores justificam a atual epidemiologia e concentração de casos reportados mundialmente. Brasil, Índia e a Indonésia são os países que em 2019 apresentaram uma incidência de mais de 10.000 novos casos de hanseníase, evidenciado na Figura 1 (Organização Mundial da Saúde, 2020). No ano de 2020, a pandemia da COVID-19 prejudicou muito as já difíceis estratégias de detecção e controle da doença (Figura 1).

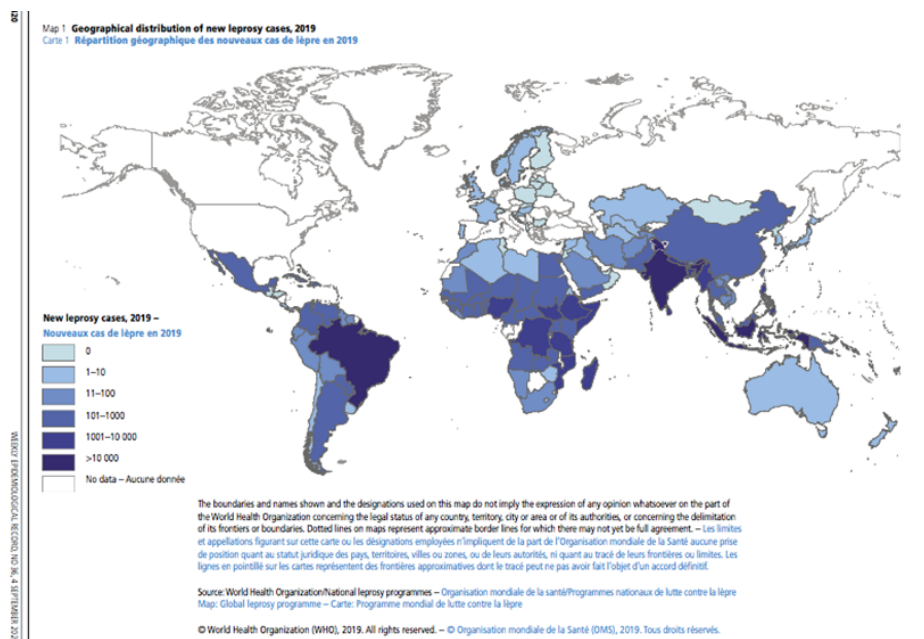


Figura 1 - Epidemiologia da hanseníase no ano de 2019

Fonte: Organização Mundial da Saúde (OMS).

Conforme os dados apresentados pela OMS, o Brasil é o país com maior concentração de casos pela população total e especialistas ainda acreditam que a subnotificação é um problema existente. Entre os anos de 2015 e 2019 o Brasil detectou 137.385 novos casos de hanseníase. No ano de 2019 somente, o Brasil reportou à OMS 27.864 novos casos de hanseníase (Organização Mundial da Saúde, 2019) . Esta taxa de detecção vem se mantendo relativamente estável nos últimos 5 anos, apesar dos grandes esforços de educação realizados pelo governo brasileiro como evidenciada na figura 2.

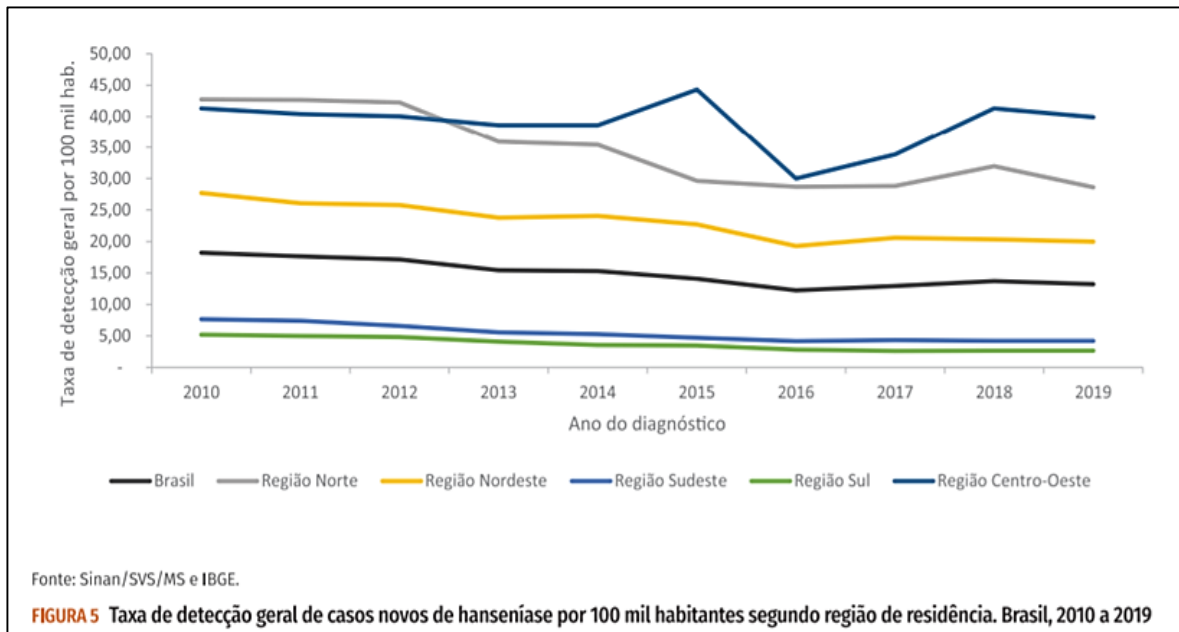


Figura 2 – Taxa de detecção geral de casos novos de hanseníase.

Fonte: Sinan/SVS/MS e IBGE

Dados nacionais mostram que a hanseníase acomete principalmente homens (Sinam, IBGE e Ministérios da saúde de 2020). Esta população vem sendo cada vez mais alvo de atenção das autoridades públicas, uma vez que a população masculina tem a tendência de procurar menos por atenção em saúde. Pouco sabe-se sobre essa preferência da hanseníase para o sexo masculino, mas fatores hormonais não podem ser excluídos e fica como uma das possíveis hipóteses. (CERQUEIRA e colab., 2020).

O gráfico anterior, mostra a taxa de detecção de novos casos de hanseníase no Brasil por regiões entre os anos de 2010 a 2019 (figura 2), e os gráficos abaixo, a proporção de novos casos de hanseníase de 2010 a 2019 segundo o sexo e a faixa etária (figura 3) e a proporção de novos casos de hanseníase de acordo com a escolaridade e a região de residência entre 2010 e 2019 (figura 4). Conclui-se que a hanseníase no Brasil, acometeu pessoas com menor nível de escolaridade e que possuíam condições sociais desfavoráveis, mantendo a cadeia de transmissão para os mais próximos e com convívio mais íntimo.

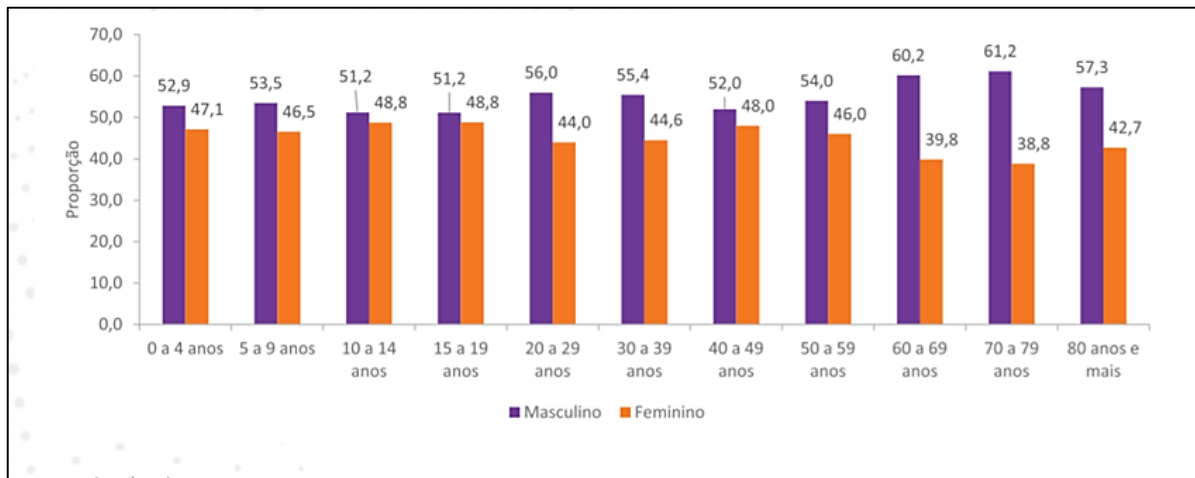


Figura 3 - Proporção de casos novos de hanseníase segundo sexo e faixa etária 2015-2019.

Fonte: Sinan/SVS/MS e IBGE

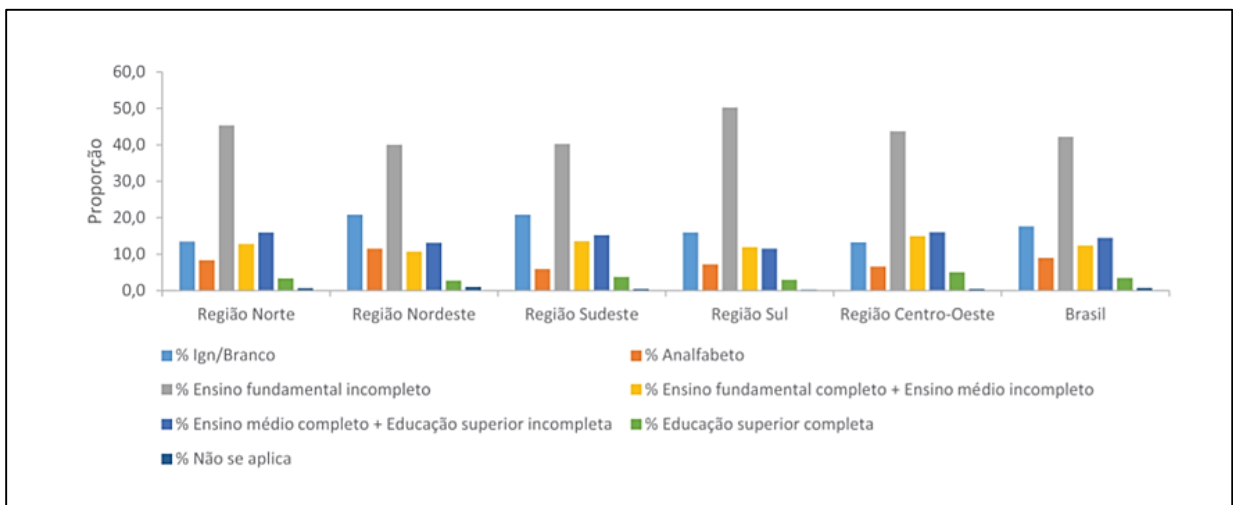


Figura 4 - Proporção de casos novos de hanseníase segundo escolaridade e região de residência. Brasil, 2015 a 2019.

Fonte: Sinan/SVS/MS

1.3. Fisiopatologia da hanseníase e microbiologia do *M. leprae*

Atualmente, a hanseníase é uma doença endêmica dos países tropicais coincidindo com o subdesenvolvimento e a pobreza dessas populações (NERY e colab., 2019). Para que ocorra a infecção é fundamental a interação entre fatores intrínsecos ao indivíduo (suscetibilidade genética) e fatores ambientais (SHU KURIZKY e colab., 2020). NA literatura atual, há um déficit sobre informações as características genéticas do hospedeiro em relação a imunidade ao patógeno. Ao que parece, a maioria (cerca de 90%) da população é geneticamente resistente, por mecanismos ainda desconhecidos. Parte dos suscetíveis desenvolve a doença após tempo prolongado de contato, que geralmente é intradomiciliar. (Diretrizes para vigilância, atenção e eliminação da hanseníase como problema de saúde pública, Ministério da Saúde, 2016).

Aqueles que desenvolvem a doença passam por longo período de incubação (3 a 5 anos) e a seguir, pela fase inicial da hanseníase (3 a 5 anos) e não contagiosa, sem sequelas. Posteriormente, alguns pacientes desenvolverão as formas ditas paucibacilares representadas por poucas lesões e intenso dano neurológico enquanto outros desenvolverão as formas multibacilares caracterizadas por intensa infiltração bacilar e pela transmissão da doença (Guia prático sobre hanseníase-Ministério da saúde, 2017).

A hanseníase é causada pelo *Micobacterium leprae*, um parasita intracelular obrigatório, com alta infectividade e baixa patogenicidade. Apresenta-se sob a forma de um bastão álcool-ácido-resistente (BAAR), cora-se em vermelho pela fucsina (Ziehl-Neelsen) em esfregaço de lesões habitadas, tem reprodução muito lenta (12 a 14 dias) e afinidades por células do tecido cutâneo e nervos periféricos. O bacilo não é cultivado em meios artificiais, mas apenas em culturas de tecidos vivos (ANDRADE e colab., 2021). O bacilo tem preferência por áreas

mais frias do corpo como nariz, testículos e locais onde os nervos se encontram muito próximos a pele.

Por ser um bacilo que não cresce em meios de culturas artificiais possui uma dificuldade para comprovar a infecção nos tecidos e nos experimentos para avaliar a efetividade das medicamentos usados para o seu tratamento.

1.4. Imunologia da hanseníase

O *M.leprae* é um bacilo gram-positivo, álcool ácido resistente, com tropismos para os macrófagos e células de Schwann. Sua parede celular é rica em lipídios, particularmente o ácido micólico e o glicolípido fenólico 1 (PGL-1) (TABOURET e colab., 2010). O PGL-1 tem a função de mediar a entrada do bacilo nos macrófagos, ao ligar-se a proteína C3 do complemento, pela via de receptores CR1, CR3 e CR4, ajudando ao escape dos fagolisossomo. O PGL-1 dentro dos monócitos desempenham um papel de imunossupressão, colaborando para a sobrevivência do bacilo no meio intracelular (TABOURET e colab., 2010).

Na imunologia humana, os macrófagos são classificados em 2 grandes grupos M1 e M2, de acordo com a resposta imune Th (Th1 e TH2, respectivamente). O M2 associa-se aos receptores Th2 que estão em quantidades elevadas presentes nos quadros de hanseníase virchowiana. Nesse processo ocorre a estimulação de CD68 e CD163, arginase 1 além de citocinas pro inflamatórias como a IL-10 e o TGF- β (SHU KURIZKY e colab., 2020).

A resposta imunológica à infecção é o melhor preditor para a forma clínica de apresentação da doença. O balanço entre a resposta imune celular (Th1) e a resposta imune humoral (Th2), apesar de explicar de forma muito simplista toda a resposta imunológica existente, ainda explica de forma didática as manifestações clínicas (GURUNG e colab., 2019).

Pacientes que após desenvolvimento da doença apresentam resposta imune baseada em células do polo Th1 (predomínio da resposta imune celular) vão desenvolver lesões restritas tanto na pele quanto nos nervos. Por outro lado, pacientes que desenvolvem uma resposta humoral no polo Th2, considerada inefetiva para a luta contra o bacilo, terá doença difusa com grande quantidade de parasitas. Entre estes dois polos estão os pacientes dimorfos com características dos dois polos descritos.

1.5. Classificação da hanseníase

De acordo com a OMS e com o Ministério da Saúde do Brasil para fins operacionais de tratamento, os doentes são classificados em paucibacilares (PB – presença de até cinco lesões de pele com baciloscopia de raspado intradérmico negativo, quando disponível) ou multibacilares (MB – presença de seis ou mais lesões de pele ou baciloscopia de raspado intradérmico positiva) O Brasil também utiliza essa classificação. Entretanto, alguns pacientes não apresentam lesões facilmente visíveis na pele, e podem ter lesões apenas nos nervos (hanseníase primariamente neural), ou as lesões podem se tornar visíveis somente após iniciado o tratamento. Por isso a introdução do tratamento PQT deve ser feita com bastante atenção e não deve ser postergado em caso de caso clínico confirmado. (Diretrizes para vigilância, atenção e eliminação da hanseníase como problema de saúde pública, Ministério da Saúde, 2016).

A apresentação clínica da hanseníase dependerá da resposta imunológica Th1/Th2 apresentada pelo hospedeiro. A grande maioria dos pacientes terá as formas instáveis que perfazem formas espectrais entre os dois distintos polos. Para auxiliar no seu diagnóstico foi criado no congresso em Madri de 1953 a Classificação de Madrid: hanseníase indeterminada (PB), tuberculóide (PB), dimorfa (MB) e virchowiana (MB). Posteriormente, Ridley e Jopling

pormenorizaram as formas dimorfas em tuberculóide-dimorfa, dimorfa-dimorfa e dimorfa-virchowiana (FRADE e colab., 2017).

1.6. Hanseníase Indeterminada (paucibacilar)

De acordo com registros históricos a hanseníase indeterminada é a fase inicial de qualquer forma espectral da hanseníase. Nos dias atuais uma minoria dos pacientes apresenta esta forma clínica no momento do diagnóstico (Diretrizes para vigilância, atenção e eliminação da hanseníase como problema de saúde pública, Ministério da Saúde, 2016). Trata-se de uma forma considerada paucibacilar e inicial que acomete, de forma mais frequente, crianças e adultos jovens, sugerindo um menor tempo de contato com a fonte infectante.

A forma clínica é caracterizada por lesão única, hipocrômica com redução da sensibilidade térmica e dolorosa. A doença faz diagnóstico diferencial com a pitíriase alba, patologia pediátrica benigna e auto-limitada, sem resultar em dano para o paciente. Acomete pacientes atópicos e visualmente a lesão apresenta-se como mácula hipocrômica com a presença de folículos pilosos evidentes e, naturalmente, sensibilidade preservada.



Fonte: Instituto Lauro Souza Lima.

Figura 5- Demonstração clínica da hanseníase indeterminada.

Fonte: Guia prático sobre a hanseníase / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2017. 68

1.7. Hanseníase tuberculóide (paucibacilar)

Apresenta-se clinicamente, por máculas ou placas de contornos bem delimitados, hipocrômicas, eritematosas ou acastanhadas com contornos circulares, anulares, circinadas ou geográficas. Podem ser únicas ou em pequeno número, com distribuição assimétrica. Os distúrbios de sensibilidade são bem acentuados além dos distúrbios vasomotores e alterações na sudorese (hipoidrose ou anidrose). Os troncos nervosos podem ser acometidos em pequeno número, de maneira assimétrica, resultando em incapacidade física permanente. (Belda e Junior, 2014). Caracteriza-se por intensa resposta imune celular, Th1, nesses pacientes acometidos que são incapazes, na maioria dos casos, em controlar a infecção espontaneamente.



Figura 6 - Demonstração clínica de acometimento neurológico localizado em paciente com hanseníase tuberculóide – Garra ulnar.

Fonte: Acervo pessoal,2019.

1.8. Hanseníase dimorfa

As formas de hanseníase dimorfa foram pormenorizadas pela classificação de Ridley e Jopling pois são consideradas as formas instáveis da doença que podem, por vezes, mimetizar características tuberculóides e apresentam alta infiltração de bacilos, contribuindo para a cadeia de transmissão.

A forma clássica da hanseníase dimorfa consiste na apresentação de diversas placas eritematosas com centro relativamente poupado, configurando o aspecto de queijo suíço. As

lesões podem ser mais localizadas e com baciloscopia negativa representando a forma dimorfo-tuberculóide (Figura 7) ou podem ser menos proeminentes e mais infiltradas representando a forma dimorfo-virchowiana (Figura 8). Trata-se da forma mais comum da doença em nosso país.



Figura 7 - Demonstração clínica da hanseníase dimorfo-tuberculóide.

Fonte: Acervo pessoal,2019.



Figura 8 - Demonstração clínica da hanseníase dimorfo-Virchowiana.

Fonte: Acervo pessoal,2019

1.9. Hanseníase virchowiana (multibacilar)

Trata-se da forma que mais contribui para a cadeia de transmissão. Nesta apresentação clínica da doença há uma completa ou parcial anergia aos antígenos bacilares. Estes pacientes podem passar por anos como assintomáticos. (LIMEIRA, O.M. e colab., 2013).

Apresenta grande polimorfismo das lesões. Inicialmente, são manchas muito discretas, hipocômicas, múltiplas e de limites imprecisos, que progressivamente tornam-se eritematosas, eritemato-pigmentadas, vinhosas, ferruginosas e espessadas. Após tempo variável, podem surgir lesões sólidas: pápulas, papulonodulares, nodulares, placas isoladas, agrupadas e/ ou confluentes, simetricamente distribuídas, em geral poupando axilas, inguinais, perineais e coluna vertebral. (BELDA JUNIOR, e colab, 2014)

Com o evoluir da infecção, ocorre perda dos supercílios (madarose) e o desenvolvimento de hansenomas caracterizados pela presença de tumores colonizados por bacilos situados em macrófagos espumosos. Nestes casos, a baciloscopia é fortemente positiva.

1.10. Diagnóstico da hanseníase

O diagnóstico de casos de hanseníase é essencialmente clínico e epidemiológico, realizado por meio de anamnese, exame clínico para identificar lesões ou áreas de pele com alteração de sensibilidade e/ou comprometimento de nervos periféricos, com alterações sensitivas e/ou motoras e/ou autônomas (GURUNG e colab., 2019; TORRES e colab., 2021; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

Segundo as diretrizes para vigilância, atenção e eliminação da hanseníase do Ministério da saúde de 2016, a definição de caso de hanseníase, considera a apresentação de um ou mais dos seguintes sinais cardinais, a qual necessita de tratamento com Poliquimioterapia (PQT) (Diretrizes para vigilância, atenção e eliminação da hanseníase como problema de saúde pública, Ministério da Saúde, 2016).:

- lesão(ões) e/ou área (s) da pele com alteração de sensibilidade térmica e/ou dolorosa e/ou tátil; ou
- Espessamento de nervo periférico, associado a alterações sensitivas e/ou motoras e/ou autonómicas; ou
- Presença de bacilos *M. leprae*, confirmada na baciloscopia de esfregaço intradérmico ou na biopsia de pele.

A fim de avaliar e diagnosticar melhor e mais precisamente a hanseníase, os testes são divididos em dois grandes grupos. O primeiro identifica diretamente o bacilo, como o esfregaço de pele e os testes moleculares (GURUNG e colab., 2019). O segundo grupo identifica as reações imunológicas do indivíduo ao bacilo, o que permitiu o desenvolvimento de várias técnicas sorológicas, mas que apresentam resultados muito controversos (RAJU e colab., 2014). Por ser um bacilo não cultivável em meios de cultura artificiais, acaba por dificultar a sua investigação, sendo a cultura *in-vivo* útil para a detecção de resistência a drogas e para o estudo de reservatórios em animais (SHEPARD, 1971).

Os exames histopatológicos são uteis no diagnóstico e na classificação das formas clínicas. O local escolhido para a biopsia cutânea deve ser de uma lesão espessada, pápula ou nódulo, ou a borda de uma mancha ou placa por serem locais mais ativos. A colheita do material cutâneo se faz por *punch* de 4 mm, após a assepsia e anestesia prévia do local a ser biopsiado. As biopsias são processadas e os cortes histológicos são corados por corantes comuns (hematoxilina e eosina) e específicos para o bacilo. (BELDA JUNIOR, 2014). A biópsia do nervo é uma ferramenta usada para o diagnóstico de casos mais raros de hanseníase neural pura, com certas restrições para evitar sequelas e exames falso-negativos (PIMENTEL e colab., 2004).

O exame microscópico de um esfregaço de pele, conhecida no Brasil como baciloscopia, é um teste que está incluído na definição de caso da OMS, entretanto cerca de 50% de todos os pacientes com hanseníase apresentarão resultados negativos para esse exame (Guia de procedimentos técnicos: baciloscopia em hanseníase. ,Ministério da saúde, 2010). A baciloscopia é um procedimento de fácil execução, mas que necessita de profissional capacitado para a leitura da lâmina, algo que não o impede de ser realizado em unidades básicas de saúde, no primeiro momento da suspeita da hanseníase, não devendo, porém, ser considerada como critério de diagnóstico da hanseníase em caso de exame negativo (Organização mundial da

saúde-OMS, 2016). O resultado positivo apesar de definidor de caso, não deve ser esperado para o início do tratamento em um paciente com apresentação clínica clássica.

Para realização do exame de baciloscopia, as áreas selecionadas irão depender da presença de lesões visíveis ou áreas com alteração de sensibilidade, incluir as áreas do lóbulo auricular direito, lóbulo auricular esquerdo, cotovelo direito e cotovelo esquerdo. A técnica consiste na realização do pregueamento do sítio de coleta, a fim de uma isquemia momentânea, com uma lâmina de bisturi é feito um corte na pele de 5 mm extensão por 3 mm de profundidade. Com uma lâmina, faz-se o raspado das intradérmico das bordas e do fundo da incisão, retirando quantidade suficiente e visível de material.

O Índice Baciloscópico (IB), proposto por Ridley em 1962, baseia-se em uma escala logarítmica com variação entre 0 a 6. É o método de avaliação quantitativo mais correto e utilizado na leitura da baciloscopia em hanseníase (Guia de procedimentos técnicos: baciloscopia em hanseníase. ,Ministério da saúde, 2010).

Escala Logarítmica de Ridley:

- | |
|--|
| <p>(0) – Ausência de bacilos em 100 campos examinados.</p> <p>(1+) – Presença de 1 a 10 bacilos, em 100 campos examinados.</p> <p>(2+) – Presença de 1 a 10 bacilos, em cada 10 campos examinados.</p> <p>(3+) – Presença de 1 a 10 bacilos, em média, em cada campo examinado.</p> <p>(4+) – Presença de 10 a 100 bacilos, em média, em cada campo examinado.</p> <p>(5+) – Presença de 100 a 1.000 bacilos, em média, em cada campo examinado.</p> <p>(6+) – Presença de mais de 1.000 bacilos, em média, em cada campo examinado.</p> |
|--|

O segundo grupo que realiza a detecção imunológica do hospedeiro ao bacilo, tem seu representante no teste de reconhecimento do glicolípido-fenólico- 1 (PGL-1), sendo o mais específico para os casos iniciais de hanseníase. (Belda Junior, et colab, 2014)

1.11. Tratamento da hanseníase

O tratamento da hanseníase é realizado através da associação de medicamentos (poliquimioterapia- PQT) conhecidos como rifampicina, dapsona e clofazimina (Diretrizes para vigilância, atenção e eliminação da hanseníase como problema de saúde pública, Ministério da Saúde, 2016). Deve-se iniciar o tratamento já na primeira consulta, após a definição do diagnóstico, se não houver contraindicações formais.

Os pacientes PB e MB receberão uma dose mensal supervisionada de 600 mg de Rifampicina, 100mg de Dapsona e de 300mg de Clofazimina. Em casa, o paciente tomará 100 mg de Dapsona e 50mg de Clofazimina diariamente. O tempo de tratamento é de 6 ou 12 meses (cartelas) para pacientes PB ou MB respectivamente (Organização Mundial da Saúde-OMS, 2018). Caso a dapsona precise ser suspensa, deverá ser substituída pela ofloxacina 400mg (na dose supervisionada diariamente) ou pela Minociclina 100 mg (na dose supervisionada e diariamente).

O Brasil, em 2017, relatou o maior número de casos retratados e supervisionados (6887), seguido pela Índia (5332). Uma análise aprofundada do retratamento para determinar as razões para a descontinuação do tratamento, melhoraria a adesão, o uso eficaz do medicamento e, até certo ponto, impediria o surgimento de resistência aos medicamentos. Os dados disponíveis indicaram que, de 122.172 casos de hanseníase multibacilar na coorte de 2017, 108.668 (89,0%) completaram um curso completo de

tratamento; dos 7.164 casos de hanseníase paucibacilar detectados em 2018, 6.732 (94,5%) completaram o tratamento. As taxas de conclusão do tratamento em alguns países foram, no entanto, abaixo do ideal.

1.12. Resistência medicamentosa na hanseníase

Nas décadas de 1950 e 1960, a dapsona foi o primeiro fármaco eficaz para o tratamento da hanseníase e para prevenir o desenvolvimento de resistência aos medicamentos, a combinação de antibióticos foi padronizada para o tratamento. Em 1981, a resistência à dapsona estava disseminada e surgiram casos de resistência a rifampicina, o que induziu a OMS a padronizar a poliquimioterapia (PQT) para hanseníase combinando a dapsona com a rifampicina para todos os casos, mais a clofazimina para os casos multibacilares (ANDRADE e colab., 2021).

A resistência à dapsona foi evidenciada como falha clínica na monoterapia de longa duração, mas foi detectada por meio de testes laboratoriais apenas com o desenvolvimento do modelo em pata de camundongo, pois o *M. leprae* não pode ser cultivado em nenhum meio artificial, fato esse que dificulta a pesquisa de resistência medicamentosa. (MATSUOKA, 2010; SHEPARD, 1971).

A poliquimioterapia continua sendo o esquema recomendado para o tratamento da hanseníase. Embora as recidivas em pacientes tratados com PQT sejam raras, resistência múltipla foi eventualmente relatada em diferentes regiões do mundo, com a descrição de cepas de *M. leprae* resistentes à dapsona, rifampicina e ofloxacina concomitante à falha do tratamento (ARAÚJO e colab., 2017; KIM e colab., 2003; MANTA e colab., 2020; VEDITHI e colab., 2015). Anteriormente, o modelo de cultivo em pata de camundongo era o único método

disponível para testar a resistência do *M.leprae* aos agentes antimicrobianos. Este método é complicado, demorado (os resultados estão disponíveis somente após 6 a 12 meses), caro e requer uma equipe de laboratório altamente qualificada. Por esses motivos esse era um método usado ocasionalmente.

Com o desenvolvimento da reação em cadeia da polimerase e do sequenciamento de DNA, foram identificados marcadores genéticos de resistência aos medicamentos na hanseníase para rifampicina, dapsona e ofloxacina (antibiótico do grupo das quinolonas), permitindo que os resultados estivessem disponíveis em poucos dias e com menor custo. Até o momento, não há testes moleculares para avaliar a resistência medicamentosa da clofazimina, por esta apresentar um modo de ação e resistência ainda desconhecidos (ANDRADE e colab., 2021). A ofloxacina é um antibiótico de segunda linha, recomendado em casos de resistência a rifampicina ou nos casos de intolerância a esta medicação. O teste molecular para resistência a drogas envolveu a detecção de mutações em loci genômicos definidos (regiões determinantes de resistência a drogas): *folP1* para resistência à dapsona, *rpoB* para rifampicina e *gyrA* para ofloxacina (FORBES e colab., 2018).

2. JUSTIFICATIVA

A hanseníase é uma doença antiga, negligenciada por séculos. Apesar das tentativas de erradicação pela OMS, a doença ainda é endêmica em vários países, como o Brasil e a Índia. A associação de medicamentos para o seu tratamento, a poliquimioterapia, foi uma maneira de evitar a resistência medicamentosa, que pode dificultar ainda mais a eliminação dessa patologia. Outro fato que dificulta a erradicação e a determinação da resistência às medicações é o fato do bacilo de Hansen não ser cultivável em meios de cultura artificiais, necessitando de testes lentos e caros ou mais recentemente das técnicas de PCR e detecção do DNA para a determinação dessa resistência.

A resistência medicamentosa é um problema grave para todas as doenças infecciosas. Sendo mais difícil quando tratamos das micobactérias que são naturalmente resistentes à grande maioria das drogas. Outro ponto limitante consiste no fato de que o agente causal da hanseníase ainda não foi cultivado em meios artificiais. Isso dificulta ainda mais o desenvolvimento de testes diagnósticos para a resistência medicamentosa. Nos dias atuais estes testes são baseados na inoculação em pata de camundongo ou na identificação molecular.

Outro ponto a ser analisado são os pacientes com índice baciloscópio menores que 2+, por necessitarem de uma investigação mais aprimorada para a resistência antimicrobiana. Entretanto, os métodos de detecção de resistência *in vivo* como a cultura e o sequenciamento genético possuem sérias limitações nessa população, pois uma quantidade reduzida de bacilos dificulta a realização de culturas e do sequenciamento genético pelos métodos tradicionais.

4. OBJETIVOS

4.1 Geral

Avaliar o comportamento do teste recomendado pela OMS, o sequenciamento genético, para detecção de resistência microbiana ao *M. leprae* em pacientes com IB (índice baciloscópico) menor do que 2 (<2).

4.2 Específicos

A. Avaliar as características epidemiológicas dos pacientes com hanseníase atendidos no Hospital Universitário de Brasília.

B. Avaliar a sensibilidade comparativa do teste de resistência entre pacientes com índice menor e maior/igual a 2+.

C. Descrever as principais mutações encontradas na população estudada.

D. Tecer comentários sobre métodos para melhorar a sensibilidade da detecção de resistência medicamentosa na hanseníase.

5. METODOLOGIA

Recrutamento

Os pacientes selecionados para o estudo são pacientes do Hospital Universitário de Brasília, Brasília, centro-oeste do Brasil, um ambulatório especializado e referência no diagnóstico e tratamento de pacientes com hanseníase, tendo, no máximo, 3 meses consecutivos de tratamento, durante o período de agosto de 2018 e setembro de 2019. Todos os pacientes foram analisados clinicamente para diagnóstico e classificação da doença. Foram utilizadas a definição de caso utilizada pela OMS e as classificações da doença em operacional, Madri e de Ridley e Jopling (FRADE e colab., 2017).

O recrutamento desses pacientes foi realizado por médicos especialistas em dermatologia. Os exames laboratoriais foram realizados no laboratório de dermatomicologia-UnB e do Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN-DF). Foram excluídos menores de 18 anos ou pacientes que não assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Após a inclusão, os pacientes foram divididos em 2 grupos, a depender dos índices baciloscópicos $\geq 2+$ e menor que 2 (<2).

Baciloscopia

A baciloscopia foi realizada por profissional treinado na coleta da amostra. Foram coletadas, em todos os pacientes, amostras de raspado da derme, por lâmina de bisturi número 15 após pregueamento da região com pinça. Foram escolhidos 4 pontos de coleta incluindo dois lóbulos de orelha, 1 cotovelo e adicionalmente uma lesão cutânea ou outro cotovelo em pacientes sem lesão cutânea. As lâminas foram fixadas por flambagem e após coloração por técnica de Fite-Faraco o índice baciloscópico foi aferido no Laboratório Central do Distrito

Federal – LACEN-DF. A escala logarítmica foi utilizada para extratificação dos grupos (Guia de procedimentos técnicos: baciloscopia em hanseníase. ,Ministério da saúde, 2010).

Coleta de amostra e extração do DNA.

Uma biópsia incisional de 4 mm foi realizada pelo dermatologista especializado, após a realização da assepsia, antissepsia e anestesia local com solução de lidocaína a 2%. O local escolhido para a obtenção da amostra foi a borda de uma lesão cutânea infiltrada. Caso o paciente não apresentasse lesões visíveis, o local selecionado seria a região posterior do lóbulo da orelha direita.

O fragmento coletado foi dividido verticalmente em 2 fragmentos menores para a realização de extração de DNA por 2 *kits* comerciais.: PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) e NucleoSpin Tissue XS (Macherey-Nagel, GmbH & Co. KG, Düren, Alemanha) conforme orientação dos fabricantes.

PCR para *M.Leprae*

Primeiramente, os ensaios de PCR foram realizados com iniciadores para o alvo de elementos de repetição (RELP) do *M.leprae*. Os alvos amplificados resultaram em 148 pares de bases (Tabela 1). Reações foram realizadas em um volume final de 30 µL contendo 1x de tampão, 0.2 mM dNTP's, 1.5 mM MgCl, 1U Platinum Taq DNA Polymerase, 0.2 µM of de cada iniciador (Invitrogen, Waltham, USA), água ultrapura e 50 - 100 ng de DNA genômico. A amplificação foi realizada em T100 Thermal Cycler (Bio Rad, Hercules, USA) com uma

desnaturação inicial por 3 minutos a 94°C seguidos por 15 ciclos de 94°C de 30 segundos, 56°C por 30 segundos, 72°C por 30 s, em seguida 20 ciclos a 94°C por 1 min, 56°C por 30 s, 76°C por 1 min.

Tabela 1 - Pares de Iniciadores usados em todas as reações em cadeia da polimerase

Alvo	Iniciadores	Sequências	Tamanho		
			(pb)	GC%	Tm
RLEP	RLEP-F	5`-TGCGCTAGAAGGTTGCCGTAT-3`	148	52.38	62.17
	RLEP-R	5`-ATTTCTGCCGCTGGTATCGGT-3`		52.38	62.19
folP1	folP1-F1	5` - CTTGATCCTGACGATGCTGT - 3`	254	50.00	57.69
	folP1R1	5` - CCACCAGACACATCGTTGAC - 3`		50.00	58.85
folP1	folP1-F2	5` - GATCCTGACGATGCTGTCCAG - 3`	242	57.14	60.54
	folP1-R2	5` - ACATCGTTGACGATCCGTG - 3`		52.63	57.97
rpoB	rpoB-F1	5` - ACGCTGATCAATTATCCGTCC - 3`	345	47.62	58.24
	rpoB-R1	5` - GTATTCGATCTCGTCGCTGA - 3`		50.00	57.33
rpoB	rpoB-F2	5` - CTGATCAATATCCGTCCGGT - 3`	255	50.00	56.89
	rpoB-R2	5` - CGACAATGAACCGATCAGAC - 3`		50.00	56.65
gyrA	gyrA-F1	5` - ATGACTGATATCACGCTGCCA - 3`	390	47.62	59.59
	gyrA-R1	5` - ATAACGCATCGCTGCCGGTGG - 3`		61.90	65.97
gyrA	gyrA-F2	5` - GATGGTCTCAAACCGGTACATC - 3`	225	50.00	58.80
	gyrA-R2	5` - ACCCGGCGAATTGAAATTG - 3`		47.37	56.89

Legenda: RLEP = Elemento repetitivo do *Mycobacterium leprae*, folP1 = alvo de resistência à dapsona, rpoB = alvo de resistência à rifampicina, gyrA = alvo de resistência às quinolonas, pb = pares de bases, Tm = temperatura de anelamento.

Amplificação dos Alvos Genéticos De Resistência folP1, rpoB e gyra (*nested* PCR)

Após os dois kits apresentarem resultados RLEP positivo, foi realizado PCR para a detecção de mutações que causam resistência com amostras extraídas do Kit PureLink Genomic DNA. Os iniciadores selecionados para cada uma das drogas testadas (folP1 = dapsona; rpoB = rifampicina e gyra = quinolonas) estão descritos na Tabela 1. As reações foram realizadas em duas etapas a primeira com iniciadores mais amplos e a segunda no produto da primeira PCR com alvos mais específicos configurando a técnica de *nested* PCR. A programação para PCR consistiu em 1 ciclo de 2 minutos a 94 °C, seguidos por 3 passos de ciclos de 30 segundos a 94 °C, e 30 segundos a 56 °C, e 30 segundos a 72 °C, em sequência 30 ciclos durante 5 minutos a 72 °C. O produto de todas as reações de PCR foi visualizadas em gel de agarose a 2% corado com GelRED (Biotium, Fremont, USA) e para a purificação da sequência utilizamos NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, GmbH & Co. KG, Düren, Alemanha).

Sequenciamento genético dos alvos de resistência

O sequenciamento de folP1, rpoB e gyra foi realizado utilizando os produtos obtidos na *nested* PCR. Portanto, 5 µL do produto de PCR foram purificados com ExoSAP-IT PCR Product Cleanup Reagent (ThermoFisher Scientific, Waltham, EUA) por 5 min a 37 °C. Para cada gene, uma reação de sequenciamento foi preparada usando 3 µL de produto de PCR purificado, 0,3 µM de primer e BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies), seguindo as instruções do fabricante. As análises de sequenciamento foram realizadas no ABI 3500 Genetic Analyzer (Life Technologies) no LACEN da SES-DF. As sequências obtidas foram analisadas usando Sequencher Alignment Editor Software v. 4.1.4.

(Gene Codes Corporation, Ann Arbor, EUA) e comparadas com sequências conhecidas no GenBank (National Center for Biotechnology Information, EUA).

Análise estatística:

Todos os dados foram coletados e tabulados para planilhas específicas. Estatística descritiva foi feita por medidas de tendência central e dispersão. Comparação das frequências foi realizada com o teste do Qui-quadrado ou por sua versão exata quando cada casela tinha 5 ou menor número de ocorrências. A comparação das variáveis numéricas se deu pelo teste t de student quando a variável apresentou distribuição normal ou pelo teste MannWhitney.

Para as propriedades diagnósticas, a sensibilidade foi calculada pelo número de resultados positivos dentre os pacientes com quadro de hanseníase. Para a comparação entre a concordância entre dois testes diferentes nos mesmos pacientes utilizou-se o teste de McNemar e também o coeficiente de concordância de Kappa. A concordância de Kappa foi interpretada da seguinte forma: menor que zero = insignificante; entre 0 e 0,2 = fraca entre 0,21 e 0,4 = razoável entre 0,41 e 0,6 = moderada, entre 0,61 e 0,8 = forte, entre 0,81 e 1 = quase perfeita.

A significância estatística foi definida como $p < 0.05$ e pelo intervalo de confianças de 95%. Todos os testes foram realizados no *software* RStudio (Integrated Development Environment for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>).

Aspectos éticos:

O presente protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (CAAE: 93119018.7.0000.5558). Todos os pacientes foram incluídos após assinatura de um termo de consentimento livre e esclarecido.

6. RESULTADOS

No total, 56 pacientes foram incluídos no estudo, 35 com IB abaixo de < 2 (22 com baciloscopia negativa) e 21 pacientes com IB ≥ 2 . Os dois grupos foram similares em relação ao sexo, região demográfica, idade e história previa de tratamento para hanseníase (Tabela 2). O número de pacientes que apresentaram reação hansênica foi maior no grupo com maior índice baciloscópico (Tabela 2).

Tabela 2 - Tabela comparando as características demográficas de cada grupo conforme o índice bacilosópico.

Variável	Índice Bacilosópico		Total	p-valor
	≥2	<2		
Sexo				
M, n	17	20	37	0.086
F, n	4	15	19	
Idade: Média	43.24	44.31	43.91	0.802
(DP)	(14.68)	(15.90)	(15.32)	
Tratamento prévio	11	15	25	0.678
	(52%)	(43%)		
Reações				0.001
Tipo I	5	15	20	
	(23.81%)	(42.86%)	(35.71%)	
Tipo II	5	1	6	
	(23.81%)	(2.86%)	(10.71%)	
Tipos I e II	9	5	14	
	(42.86)	(14.29%)	(25.00%)	
Não	2	14	16	
	(9.52%)	(40%)	(28.57%)	

Legenda: n = número de pacientes, DP = desvio padrão.

A classificação operacional, a classificação de Madrid e a classificação de Ridley e Jopling são mostradas na Tabela 3. Como esperado, os pacientes com um IB maior foram

classificados com mais frequência como portadores de hanseníase Virchowiana, indicando que os médicos provavelmente aplicaram os critérios de classificação de forma adequada. O IB não teve relação com o tipo de tratamento prescrito para hanseníase e nem com a prescrição de nenhum tratamento alternativo, provavelmente por se tratar de um instituto terciário em que tem um viés elevado de pacientes com efeitos colaterais das medicações, pacientes com reações hansénicas de difícil controle e paciente retratados, por exemplos. (Tabela 4).

A sensibilidade à amplificação pelo RLEP na PCR convencional para os alvos de *folP1*, *rpoB* e *gyra* mostraram-se reduzidos de 50 a 70% nos pacientes com baciloscopia inferior a 2+. Ambos os kits de extração apresentam sensibilidade similar na detecção do *M.leprae* em pacientes multibacilares (Teste de McNemar p-valor = 0.628), no entanto a concordância dos dois meios de extração não foi adequada para os pacientes com IB <2, o que sugere a necessidade de métodos mais sensíveis para esses casos especiais, que possuem uma índice baciloscópico baixo. (Kappa = 37.86% 95%CI= 0.1183 - 0.6389; p=0.002) (Tabela 5).

Tabela 3 - Tabela comparando as diversas formas clínicas de classificação da hanseníase em grupos de acordo com índice baciloscópicos.

Clacificação	Índice Baciloscópico		p-valor
	≥2	<2*	
Operacional			
Paucibacilar	0	8	0.020
Multibacilar	21	27	
Madri			
Indeterminada	0	2	0.001
Tuberculoide	0	9	
Dimorfa	6	15	
Virchowiana	15	9	
Ridley & Joplin			
Indereminada	0	2	0.001
Tuberculoide-Tuberculoide	0	4	
Tuberculoide-Dimorfa	0	5	
Dimorfa-Dimorfa	3	14	
Dimorfa-Virchowiana	3	2	
Virchowiana-Virchowiana	15	8	

* Incluindo pacientes com baciloscopia negativa.

Tabela 4 - Diferenças relacionadas ao tratamento prescrito em pacientes estratificados pelo índice baciloscópico.

Variável	Índice Baciloscópico		Total	p-value
	≥ 2	<2		
Tratamento prévio	11(52%)	15(43%)	25	0.678
Tratamento alternativo	11(52.38%)	16(45.71%)	27(48.21%)	0.136
ROM	2(9.52%)	0	2(3.57%)	
OMS PQT-MB	8(38.10%)	19(54.29%)	27(48.21%)	
Rifampicina	20(95.24%)	34(97.14%)	54(96.43%)	1
Dapsona	14(66.67%)	25(71.43%)	39(69.64%)	0.940
Clofazimina	21(100%)	34(97.14%)	55(98.21%)	1
Ofloxacina	12(57.14%)	16(45.71%)	38(67.86%)	0.581
Minociclina	7(33,33%)	6(17,14%)	13(23,21%)	0.288
Moxifloxacina	2(9.52%)	6(17.14%)	8(14.29%)	0.696

Legenda: ROM = Rifampicina mensal + ofloxacina e minociclina diárias; OMS PQT-MB = Poliquimioterapia padrão definida pela Organização Mundial da Saúde.

Tabela 5 - Sensibilidade e intervalo de confiança de 95% das técnicas diagnósticas e de detecção da resistência por grupos estratificados de acordo com o índice baciloscópico.

Test	Índice Baciloscópico			Total	P-valor
	≥ 2	< 2	0+		
PCR RLEP					
PureLink Kit	19(90.48%) (71.09-97.35)	15(42.86%) (27.98-59.14)	9(40.90%) (23.26-61.27)	34(60.71%) (47.63-72.42)	<0.001
Nucleospin TXS	19(90.48%) (71.09-97.35)	12(34.29%) (20.83-50.85)	7(31.81%) (16.36-52.68)	31(55.35%) (42.41-67.61)	<0.001
Sensibilidade complementar*					
folP1	19(90.48%) (71.09-97.35)	8(22.86%) (12.07-39.02)	5(22.72%) (10.12-43.44)	27(48.21%) (35.67-60.99)	<0.001
rpoB	19(90.48%) (71.09-97.35)	7(20%) (10.04-35.89)	3(13.64%) (4.749-33.34)	26(46.43) (34.02-59.30)	<0.001
gyrA	16(76.19%)	5(14.28%)	2(9.09%)	21(37.50%)	<0.001

(54.91-89.37) (6.26-29.38) (2.529-27.82) (26.01-50.59)

* Legenda: PureLink = PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA);
Nucleospin TXS = NucleoSpin Tissue XS (Macherey-Nagel, GmbH & Co. KG, Düren, Germany); folP1 = alvo de resistência à dapsona,
rpoB = alvo de resistência à rifampicina, gyra = alvo de resistência às quinolonas.

Em pacientes com baciloscopia negativa, embora o PureLink Genomic DNA Mini Kit pareça resultar em uma detecção mais sensível do RLEP (sensibilidade = 40,90%; IC 95% = 23,26-61,27) do que o *kit* NucleoSpin Tissue XS (sensibilidade = 31,81%; IC 95% = 16,36-52,68), essa diferença não foi significativa (valor de p de McNemar = 0,505); a estatística de concordância Kappa também não foi satisfatória para esta comparação (Kappa = 0,1538; IC95% = 0,20-0,75; p = 0,450), significando que as duas técnicas de extração podem ter propriedades complementares.

Também observamos uma redução significativa na sensibilidade da detecção de *folP1*, *rpoB* e *gyrA* em pacientes com um IB menor que 2+. Essa redução na sensibilidade foi ainda maior em pacientes com resultados negativos de baciloscopia. A PCR *nested* foi capaz de amplificar apenas 10 a 40% dos alvos genéticos em pacientes com IB menor que 2+. Nenhuma mutação relacionada à resistência antimicrobiana foi encontrada nas amostras analisadas. Apenas um paciente apresentou mutação de substituição no gene *folP1* ((c.288G>A; p.Ala9). Não encontramos mutações no gene *rpoB*. Quatorze pacientes tiveram mutações de exclusão-inserção no gene *gyrA* (c.352_353delinsAA; p.Gly118Asn), e dez pacientes tiveram uma mutação de substituição no mesmo gene (c.297C>T; p.Arg99=).

7. DISCUSSÃO

O surgimento de cepas de *M. leprae* resistentes a antimicrobianos é considerado uma ameaça à saúde pública. A OMS fez recomendações específicas sobre a vigilância da resistência antimicrobiana, que é um problema sério associado à grande maioria das doenças infecciosas devido ao investimento inadequado no desenvolvimento de novos medicamentos (Organização mundial da saúde-OMS, 2015). Embora uma recente revisão sistemática da literatura com meta-análise demonstrou que a prevalência de resistência antimicrobiana em *M. leprae* não aumentou na última década, devemos considerar que, até o momento, não existe teste já desenvolvido que possa ser considerado como padrão ouro para o reconhecimento de resistência bacteriana na hanseníase (ANDRADE e colab., 2021). Por isso um constante monitoramento por meio de vigilância clínica e laboratorial são recomendados.

Este estudo identificou uma limitação clara dos testes usados para detectar a resistência antimicrobiana na hanseníase: tais testes não foram sensíveis em todos os pacientes com baixos índices baciloscópico. A presença de inibidores da PCR e a baixa carga de DNA das amostras podem reduzir a sensibilidade da PCR. Outros obstáculos que podem reduzir a sensibilidade da PCR incluem a ocorrência de mecanismos de resistência não relacionados a mutações no DNA e a ocorrência de mutações ainda não descritas na literatura. Essas limitações também, em parte, são válidas para a cultura do *M. leprae* na pata de camundongo porque uma baixa concentração da bactéria não produzirá um crescimento satisfatório em modelos animais. Essas limitações não significam que pacientes com IBs baixos não sejam afetados por cepas de *M. leprae* resistentes.

Na verdade, os pacientes com resistência parcial a um ou mais medicamentos ou com infecções simultâneas por cepas resistentes e sensíveis de *M. leprae* podem atingir uma redução significativa em seus IBs com a PQT, mas podem desenvolver recaídas tardias após a

seleção e replicação de cepas resistentes. Acredita-se que a PQT seja parcialmente efetiva para os bacilos de cepas resistentes, negatizando a baciloscopia e posteriormente gerando recidivas tardias. Trata-se de uma ocorrência de difícil monitoramento, uma vez que a definição clínica de cura completa também é imprecisa.

Estratégias mais sensíveis para a detecção de resistência antimicrobiana do *M. leprae* devem ser desenvolvidas e utilizadas para vigilância no nível populacional (GOMES e colab., 2015; SEVILHA-SANTOS e colab., 2018). Técnicas como PCR em tempo real são alternativas interessantes (ARAUJO e colab., 2017). A PCR em tempo real seguida por análise de curva *melting* ou o pelo uso de sondas TaqMan específicas provavelmente resulta em resultados mais sensíveis do que os alcançados pela PCR convencional seguida do sequenciamento genético. No entanto, de acordo com uma recente revisão sistemática da literatura, a validação desses testes ainda é necessária em estudos de acurácia bem delineados (ANDRADE e colab., 2021).

Embora existam estratégias alternativas, é provável que nenhuma técnica atinja 100% de sensibilidade na detecção de resistência antimicrobiana do *M. leprae*. Esse fato aponta para a necessidade de critérios clínicos para orientar a seleção de tratamentos alternativos em casos suspeitos de resistência (CHAGAS e colab., 2021). Antes de iniciar um tratamento alternativo, os clínicos devem primeiro excluir completamente a possibilidade de reinfecção e garantir se a adesão ao tratamento padrão foi adequado (GITTE e colab., 2018; STEFANI e colab., 2017). Portanto, a reavaliação dos contatos domiciliares e uma investigação detalhada da história clínica do paciente são essenciais antes que qualquer tratamento alternativo possa ser considerado para os pacientes com testes inconclusivos para resistência antimicrobiana. Em casos suspeitos de recidiva clínica com resultados de teste de resistência antimicrobiana inconclusivos, sem evidência de reinfecção e adesão adequada ao tratamento anterior, novos critérios clínicos orientando o acompanhamento e o início de tratamentos alternativos devem

ser desenvolvidos. Os critérios tradicionais utilizados antes da introdução da PQT, como infiltração da lesão cutânea e avaliação seriada do IB, podem não ser adequados se utilizados isoladamente devido à sua imprecisão e ao longo tempo necessário para que esses métodos apresentem alterações perceptíveis.

Na presente população, nenhuma mutação relacionada à resistência descrita anteriormente foi encontrada. Esse resultado sugere que a PQT recomendada pela OMS continua sendo uma medida importante e custo-efetiva de controle da doença. A introdução precoce do tratamento é fundamental para prevenir o desenvolvimento de sequelas nos pacientes afetados e para interromper a cadeia de transmissão. Curiosamente, embora nenhum gene de resistência tenha sido encontrado, um número significativamente maior de mutações associadas às quinolonas foi encontrado no gene *gyrA*. Isso pode ser explicado pelo fato de que as quinolonas podem ser mais propensas ao desenvolvimento da resistência antimicrobiana do que outras drogas, devido ao seu uso mais frequente para infecções comuns do que rifampicina e dapsona (GHOSH e colab., 2020; SENEROVIC e colab., 2020). As recomendações sobre a prescrição adequada de fluoroquinolonas e estratégias de farmacovigilância devem ser feitas com cuidado, pois se trata de uma séria ameaça à saúde pública. Recentemente em reunião realizada pela OMS para tratar da vigilância na resistência bacteriana na hanseníase foi levantada a necessidade de criar um banco de dados com todas as mutações encontradas, mesmo que não relacionadas à resistência medicamentosa.

Algumas limitações do presente estudo devem ser levadas em consideração na interpretação dos resultados. Embora as sensibilidades tenham sido semelhantes entre os *kits* de extração testados, a concordância entre as duas técnicas foi insatisfatória. Isso implica que os *kits* por terem propriedades diferentes podem ser usados como técnicas complementares. No entanto, não identificamos nenhuma evidência clínica ou laboratorial que pudesse indicar quando um kit de extração deve ser preferido em relação ao outro. Além disso, conforme

mencionado acima, é possível que existam causas adicionais de resistência antimicrobiana para as quais não haja testes específicos disponíveis (ANDRADE e colab., 2021). Estudos com a inclusão de desenvolvedores, empresas públicas e privadas são necessárias para a otimização destas técnicas.

8. CONCLUSÃO

No presente estudo podemos concluir as seguintes informações com base nos objetivos aqui colocados.

8.1 Geral

Avaliar o comportamento do teste recomendado pela OMS para detecção de resistência microbiana ao *M. leprae* em pacientes com IB (índice baciloscópico) menor do que 2.

O presente estudo demonstrou uma importante limitação para os testes diagnósticos de resistência em uma população com baciloscopia menor do que 2+, mas que, apesar dessa limitação diagnóstica, parte destes pacientes beneficia-se do teste molecular.

8.2 Específicos

Avaliar as características epidemiológicas dos pacientes com hanseníase atendidos no Hospital Universitário de Brasília.

O presente estudo demonstrou que não houve diferença nas características clínicas e demográficas quando comparados os dois grupos de índice baciloscópico alto e baixo. O fato demonstra que as características podem ser resultantes de especificidades do bacilo ou de condições clínicas não medidas por este estudo.

Avaliar a sensibilidade comparativa do teste de resistência entre pacientes com índice $< e \geq 2$.

A sensibilidade dos testes de resistência apresentou uma importante redução em pacientes com baciloscopia baixa.

Descrever as principais mutações encontradas na população estudada.

Não foram encontradas mutações relacionadas à resistência medicamentosa neste estudo. Também foram descritas as exatas mutações detectadas pelo sequenciamento genético.

Tecer comentários sobre métodos para melhorar a sensibilidade da detecção de resistência medicamentosa na hanseníase.

Técnicas que aumentem a sensibilidade da detecção diagnóstica devem ser desenvolvidas. Sugerimos o uso da PCR em tempo real, por exemplo, como técnica de extração do DNA.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, Elaine Silva Nascimento Andrade e colab. **A systematic review and meta-analysis of studies on the diagnostic accuracy and screening of tests to detect antimicrobial resistance in leprosy.** Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, v. in press, 2021.
- ARAUJO, Sergio e colab. **qPCR-High resolution melt analysis for drug susceptibility testing of Mycobacterium leprae directly from clinical specimens of leprosy patients.** PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 11, n. 6, p. 1–18, 2017.
- BARBERIS, I. e colab. **The history of tuberculosis: From the first historical records to the isolation of Koch’s bacillus.** Journal of Preventive Medicine and Hygiene, v. 58, n. 1, p. E9–E12, 2017.
- CAMBAU, Emmanuelle e colab. **Detection of antibiotic resistance in leprosy using GenoType LeptraeDR, a novel ready-to-use molecular test.** PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 6, n. 7, p. e1739, 2012.
- CERQUEIRA, Selma Regina Penha Silva e colab. **The interference of polypharmacy and the importance of clinical pharmacy advice in the treatment of leprosy: A case-control study.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 53, n. March, p. 1–6, 2020.
- CHAGAS, Danielle Ferreira e colab. **Relapse in leprosy and drug resistance assessment in a tertiary hospital of the state of Espírito Santo , Brazil.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 54, p. 1–4, 2021.
- FORBES, Betty A. e colab. **Practice guidelines for clinical microbiology laboratories: Mycobacteria.** Clinical Microbiology Reviews, v. 31, n. 2, p. 1–66, 2018.
- FRADE, M.A.C. e colab. **Unexpectedly high leprosy seroprevalence detected using a**

random surveillance strategy in midwestern Brazil: A comparison of ELISA and a rapid diagnostic test. PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 11, n. 2, p. e0005375, 2017.

GHOSH, Abhirupa e SARAN, N. e SAHA, Sudipto. **Survey of drug resistance associated gene mutations in Mycobacterium tuberculosis, ESKAPE and other bacterial species.** Scientific Reports, v. 10, n. 1, p. 1–11, 2020.

GITTE, Sunil Vilasrao e colab. **Profile of Person Affected by Leprosy with Clinical Relapse among in High Endemic State of India.** Journal of Microbiology and Infectious Diseases, v. 8, n. 3, p. 102–106, 2018.

GOMES, C.M. e colab. **Accuracy of mucocutaneous leishmaniasis diagnosis using polymerase chain reaction: Systematic literature review and meta-analysis.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 110, n. 2, 2015.

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

KIM, Se Kon e colab. **Detection of gene mutations related with drug resistance in Mycobacterium leprae from leprosy patients using Touch-Down (TD) PCR.** FEMS Immunology and Medical Microbiology, v. 36, n. 1–2, p. 27–32, 2003.

LASTÓRIA, Joel Carlos e DE ABREU, Marilda Aparecida Milanez Morgado. **Leprosy: Review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects - Part 1.** Anais Brasileiros de Dermatologia, v. 89, n. 2, p. 205–218, 2014.

LIMEIRA, O.M. e colab. **Active search for leprosy cases in midwestern Brazil: A serological evaluation of asymptomatic household contacts before and after prophylaxis with Bacillus Calmette-Guérin.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo, v. 55, n. 3, p. 173–177, 2013.

LIMEIRA, Omesina Maroja e colab. **Active search for leprosy cases in Midwestern Brazil: a serological evaluation of asymptomatic household contacts before and after prophylaxis with bacillus Calmette-Guérin.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 2013.

LOCKWOOD, Diana N.J. e colab. **Three drugs are unnecessary for treating paucibacillary leprosy—A critique of the WHO guidelines.** PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 13, n. 10, p. 2–5, 2019.

MANTA, Fernanda Saloum de Neves e colab. **Ultra-sensitive detection of Mycobacterium leprae: DNA extraction and PCR assays.** PLoS neglected tropical diseases, v. 14, n. 5, p. e0008325, Maio 2020.

MATSUOKA, Masanori. **The history and characteristics of isolates maintained at the Leprosy Research Center.** Japanese Journal of Leprosy, v. 79, n. 3, p. 247–256, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Diretrizes para a vigilância, atenção e eliminação da Hanseníase como problema de saúde pública: manual técnico-operacional.** [S.l.: s.n.], 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de procedimentos técnicos: baciloscopia em hanseníase.** [S.l.: s.n.], 2010. v. 7 edição.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, MS. **Boletim Epidemiológico Hanseníase 2020.** Boletim Epidemiológico de Hanseníase, v. Jan, p. 52, 2020.

NERY, Joilda Silva e colab. **Socioeconomic determinants of leprosy new case detection in the 100 Million Brazilian Cohort: a population-based linkage study.** *The Lancet Global Health*, v. 7, n. 9, p. e1226–e1236, 2019.

ORGANIZATION, World Health. **Weekly epidemiological record.** *Weekly epidemiological record*, v. 95, n. 36, p. 417–440, 2020.

PIMENTEL, Maria Inês Fernandes e colab. **Neurite silenciosa na hanseníase multibacilar avaliada através da evolução das incapacidades antes, durante e após a poliquimioterapia.** *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 79, n. 2, p. 169–179, 2004.

RAJU, Renuka e colab. **Serological responses to prednisolone treatment in leprosy reactions: Study of TNF- α , antibodies to phenolic glycolipid-1, lipoarabinomanan, ceramide and S100-B.** *Lipids in Health and Disease*, v. 13, n. 1, p. 1–7, 2014.

SAGA, Tomoo e YAMAGUCHI, Keizo. **History of antimicrobial agents and resistant bacteria.** *Japan Medical Association Journal*, v. 52, n. 2, p. 103–108, 2009.

SAÚDE, Ministério Da. **MINISTÉRIO DA SAÚDE GUIA PRÁTICO SOBRE A.** [S.l: s.n.], 2017.

SENEROVIC, Lidija e colab. **Quinolines and quinolones as antibacterial, antifungal, anti-virulence, antiviral and anti-parasitic agents.** *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 14, p. 37–69, 2020.

SEVILHA-SANTOS, L. e colab. **Accuracy of qPCR for quantifying Leishmania kDNA in different skin layers of patients with American tegumentary leishmaniasis.** *Clinical Microbiology and Infection*, v. 25, n. 2, p. 242–247, 2018.

SHEPARD, C. C. **The first decade in experimental leprosy.** Bulletin of the World Health Organization, v. 44, n. 6, p. 821–827, 1971.

SHU KURIZKY, Patrícia e colab. **Opportunistic tropical infections in immunosuppressed patients.** Best Practice and Research: Clinical Rheumatology, p. 101509, 2020.

STEFANI, Mariane M.A. e colab. **Whole genome sequencing distinguishes between relapse and reinfection in recurrent leprosy cases.** PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 11, n. 6, p. 1–13, 2017.

TABOURET, Guillaume e colab. **Mycobacterium leprae Phenolglycolipid-1 Expressed by Engineered M. bovis BCG modulates early interaction with human phagocytes.** PLoS Pathogens, v. 6, n. 10, p. e1001159, 2010.

TORRES, Reginaldo Thuler e colab. **Sensitivity and specificity of multibacillary and paucibacillary leprosy laboratory tests: A systematic review and meta-analysis.** Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, v. in press, 2021.

VEDITHI, Sundeep Chaitanya e colab. **A report of rifampin-resistant leprosy from northern and eastern India: identification and in silico analysis of molecular interactions.** Medical Microbiology and Immunology, v. 204, n. 2, p. 193–203, 2015.

WHO. **Global Leprosy Strategy 2016-2020.** [S.l: s.n.], 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Action Plan on Antimicrobial Resistance.** . [S.l: s.n.], 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for the Diagnosis, Treatment and Prevention of Leprosy**. v. 1, p. 87, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire**. v. 94, p. 389–412, 2019.

**Anexo A – Comprovante de Aprovação do Protocolo de pesquisa no Comitê de Ética em
Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília – UnB.**

UNB - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE BRASÍLIA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DETECÇÃO DA RESISTÊNCIA BACTERIANA À RIFAMPICINA, DAPSONA E OFLOXACINA EM PACIENTES HANSÊNICOS COM BAIXO ÍNDICE

Pesquisador: ELAINE FARIA MORELO

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 93119018.7.0000.5558

Instituição Proponente: EMPRESA BRASILEIRA DE SERVIÇOS HOSPITALARES - EBSEH

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.790.707