

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

CARLOS AUGUSTO FELIPE DE SOUSA

**PESQUISA DA RESISTÊNCIA À OFLOXACINA E SUA RELAÇÃO COM A
RESPOSTA CLÍNICA PARA HANSENÍASE NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
DE BRASÍLIA**

BRASÍLIA-DF
2019

FICHA CATALOGRÁFICA

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

FS0725p Felipe de Sousa, Carlos Augusto
PESQUISA DA RESISTÊNCIA À OFLOXACINA E SUA RELAÇÃO COM A
RESPOSTA CLÍNICA PARA HANSENÍASE NO HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA / Carlos Augusto Felipe de
Sousa; orientador Ciro Martins Gomes. -- Brasília, 2019.
76 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Ciências da Saúde) -
Universidade de Brasília, 2019.

1. Hanseníase. 2. Resistência medicamentosa. 3.
Diagnóstico. 4. Tratamento. I. Gomes, Ciro Martins, orient.
II. Título.

**PESQUISA DA RESISTÊNCIA À OFLOXACINA E SUA RELAÇÃO COM A
RESPOSTA CLÍNICA PARA HANSENÍASE NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
DE BRASÍLIA**

CARLOS AUGUSTO FELIPE DE SOUSA

Dissertação de Mestrado 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: Ciências Aplicadas
em Saúde.

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

BRASÍLIA
2019

**PESQUISA DA RESISTÊNCIA À OFLOXACINA E SUA RELAÇÃO COM A
RESPOSTA CLÍNICA PARA HANSENÍASE NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
DE BRASÍLIA**

BANCA EXAMINADORA

Presidente

Professor Dr. Ciro Martins Gomes

Universidade de Brasília – UnB

Membros

Professor Dr. Kleyton de Carvalho Mesquita

Tribunal Regional do Trabalho

Professora Dra. Carla Nunes de Araújo

Universidade de Brasília - UnB

Suplente

Professor Dr. Agenor de Castro Moreira dos Santos Júnior

Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal – LACEN DF

Junho de 2019

AGRADECIMENTOS

Ao dar por concluída mais esta etapa em minha vida queria suficientemente ter meios para agradecer:

A Deus por me dar forças para seguir quando tudo parecia difícil e mostrar que Seus desígnios não falham, sei que sem Tua misericórdia nada seria possível. Tu és Senhor digno de louvor.

À minha esposa, Sílvia Ester Bonfim Coutinho de Sousa e aos meus filhos, Murilo e Henrique, razão de minha vida, por me concederem o privilégio em fazer parte do grande projeto que Deus desenhou para mim, constituir uma família.

Aos meus pais, Augusto e Elza, exemplos de sabedoria, paciência, fé e determinação, apoiando-me incondicionalmente. Sempre me deram sábias lições e fizeram de tudo para que eu tivesse o maior dos bens que eles poderiam me dar e que ninguém pudesse me tirar, o conhecimento.

A todos os meus familiares em especial às minhas irmãs, Ana Cláudia e Cristina, por me incentivarem.

Aos amigos do grupo ágape pela alegria de tê-los em minha vida.

Aos amigos e colegas, Dr. Fabiano José Queiroz Costa grande incentivador deste projeto e Célio de Faria Júnior, pela colaboração e ensinamentos no dia a dia de trabalho, e aos demais colegas do Núcleo de Bacteriologia do LACEN-DF pela compreensão pela paciência e ajuda constante.

Ao Dr. João Morelo Sobrinho, Clarinete e Bernadete Maria Pereira que muito contribuiu para o meu crescimento profissional.

Ao prof. Dr. Ciro Martins Gomes, por sua paciência em partilhar do seu conhecimento a este neófito. Mais que eu mesmo, ele sempre acreditou neste trabalho apresentando-me à Profa. Dra. Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio para que esse momento se concretizasse. A ela também sou muito grato. Quero pedir os seus favores para que continuem com seu conhecimento e prestígio, como sempre fizeram, em favor destes que tanto necessitam.

*Os sonhos são como uma bússola, indicando os caminhos que seguiremos e
as metas que queremos alcançar.
São eles que nos impulsionam, nos fortalecem e nos permitem crescer.*

Augusto Cury

RESUMO

Introdução: A hanseníase é uma doença infecciosa causada pelo *Mycobacterium leprae* e que resulta em importantes sequelas aos pacientes acometidos. O tratamento precoce é essencial para prevenção das incapacidades. Mecanismos moleculares e experimentais de resistência do *M. leprae* à ofloxacina vêm sendo descritos. O principal objetivo do presente estudo foi monitorar variáveis para instituição do tratamento substitutivo contendo ofloxacina e associar à identificação de resistência molecular como preditor de insucesso terapêutico. **Métodos:** Trata-se de um estudo de coorte prospectivo com variável independente principal a presença ou não de mutações genéticas de resistência à ofloxacina e variável dependente principal a presença de cura clínica. A resistência medicamentosa foi testada por meio do kit Genotype LeptraeDR® (Hain Lifescience, Nehren, Alemanha). **Resultados:** Foram avaliados 53 pacientes. Vinte e um pacientes estavam em curso de retratamento por recidiva ou insuficiência terapêutica. Trinta e um pacientes utilizaram esquema substitutivo com ofloxacina. Não foram encontrados marcadores moleculares de resistência ao tratamento neste estudo. O tipo de medicação utilizada não influenciou a taxa de cura no curto prazo (de 6 a 8 meses) para a hanseníase, uma doença de evolução lenta. Os pacientes que estavam em retratamento tiveram menor porcentagem de cura do que os pacientes em primeiro tratamento ($p=0,034$). **Conclusões:** Conclui-se que a resistência bacteriana à ofloxacina, aparentemente, não é um fator limitante para o tratamento da hanseníase no Hospital Universitário de Brasília.

Palavras chave: Hanseníase; Resistência medicamentosa; Diagnóstico; Tratamento.

ABSTRACT

Introduction: Leprosy is an infectious disease caused by *Mycobacterium leprae* and results in important sequelae. Early treatment is essential for preventing deformities. Molecular and experimental mechanisms of *M. leprae* resistance to ofloxacin have been described. The main objective of the present study was to monitor variables for the institution of alternative treatment containing ofloxacin and to associate the identification of molecular resistance to therapeutic failure. **Methods:** We conducted a prospective cohort study considering the presence of genetic mutations related to treatment resistance to ofloxacin as the main independent variable and the presence of clinical cure as the main outcome. Drug resistance was tested using the commercial kit Hain LepraeDR® (Hain Lifescience, Nehren, Germany). **Results:** Fifty-three patients were included. Twenty-one patients were being retreated due to relapse or insufficiency of therapy. Thirty-one patients used a substitute regimen with ofloxacin. No molecular markers of resistance to treatment were found in this study. The type of medication used did not influence the cure rate in the short term (6 to 8 months). Patients who were in retreatment had a lower percentage of cure than patients on first treatment ($p = 0.034$). **Conclusions:** We can conclude that bacterial resistance to ofloxacin is probably not a limiting factor for the treatment of leprosy in the Hospital Universitário de Brasília.

Keywords: Leprosy; Drug resistance; Diagnosis; Treatment.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Distribuição geográfica de casos novos da hanseníase, 2015.....	17
Figura 2: Taxa de Detecção de novos casos de hanseníase,2016.	18
Figura 3: Espectro clínico da hanseníase baseado na classificação de Ridley e Jopling.....	20
Figura 4: Hanseníase indeterminada	21
Figura 5: Hanseníase tuberculóide.....	22
Figura 6: Hanseníase Dimorfa.....	23
Figura 7: Hanseníase Virchowiana.....	24
Figura 8: Estrutura molecular das principais drogas utilizadas na poliquimioterapia para hanseníase.....	28
Figura 9: Quadro: Apresentação das cartelas para PQT PB e MB.....	28
Figura 10: Curva de calibração	44
Figura 11: Curva de amplificação das amostras	46
Figura 12: Figura demonstrando um conjunto de fitas Hain LepraeDR após revelação.....	49
Figura 13: Fluxograma de pacientes com Hanseníase tratados no HUB.....	52
Figura 14: Correlação entre os valores de baciloscopia e qPCR.	58
Figura 15: Quadro: Diferenças clínicas entre Reação hansênica e Recidiva. .	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Reagentes para detecção e quantificação do <i>M. leprae</i>	40
Tabela 2: Sequência de primers e sondas utilizados clonagem do gene RLEP.	42
Tabela 3: Sequência de primers e sondas utilizados na PCR em tempo-real do <i>M. leprae</i>	44
Tabela 4: Dados demográficos e esquema terapêutico utilizado.	53
Tabela 5: Frequência de casos e forma clínica dos pacientes de hanseníase diagnosticados no ano de 2018.....	54
Tabela 6: Número e proporção de casos de hanseníase no HUB quanto ao domicílio.	54
Tabela 7: Influência das variáveis demográficas e de tratamento na cura dos pacientes com hanseníase.....	55
Tabela 8: Influência das variáveis demográficas e de tratamento numéricas na cura dos pacientes com hanseníase.	56
Tabela 9: Concordância entre as metodologias de qPCR e baciloscopia	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BB	Borderline Boderline
BL	Borderline Lepromatosa
BT	Borderline Tuberculóide
CC	Controle do Conjugado
CFZ	Clofazimina
Cq	Quantification cycle
DDS	Dapsona
DF	Distrito Federal
DNA	Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)
FM	Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília
IB	Índice Baciloscópico
LACEN	Laboratório do Centro de Saúde Pública do Distrito Federal
LL	Hanseníase lepromatosa
MB	Multibacilar
MgCL ₂	Cloreto de magnésio
ML	<i>Mycobacterium leprae</i>
MUT	Banda Mutada
OMS	Organização Mundial da Saúde
Pb	Pares de base
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)
PQT	Poliqumioterapia
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real
RFM	Rifampicina
RLEP	Sequência Repetitiva do <i>Mycobacterium leprae</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UC	Controle Universal
UnB	Universidade de Brasília
WT	Sonda Tipo Selvagem

Sumário

INTRODUÇÃO.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Histórico da hanseníase.....	14
1.2 Aspectos epidemiológicos.....	15
1.3 Agente Etiológico.....	18
1.4 Transmissão.....	18
1.5 Classificação e Formas Clínicas.....	19
1.5.1 Hanseníase Indeterminada (paucibacilar).....	21
1.5.2 Hanseníase tuberculóide (paucibacilar).....	21
1.5.3 Hanseníase dimorfa (multibacilar).....	22
1.5.4 Hanseníase virchowiana (multibacilar).....	23
1.6 Diagnóstico.....	24
1.7 Baciloscopia de Raspado Intradérmico.....	25
1.8 Reação em cadeia da polimerase.....	26
1.9 Tratamento.....	27
JUSTIFICATIVA.....	31
2. JUSTIFICATIVA.....	32
OBJETIVOS.....	33
3. OBJETIVOS.....	34
3.1 OBJETIVO GERAL.....	34
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
MÉTODOS.....	35
4. MÉTODOS.....	36
4.1 Local do estudo.....	36
4.2 Delineamento.....	36
4.3 População estudada.....	37
4.4 Critérios de exclusão.....	37
4.5 Aspectos éticos.....	37
4.6 Exames e procedimentos realizados.....	38

4.6.1 Amostras analisadas	38
4.6.2 Raspado intradérmico	38
4.6.3 Biópsia de pele	39
4.7 Extração do DNA	39
4.8 Detecção e Quantificação do <i>M. leprae</i>.....	40
4.9 Clonagem do gene RLEP e confecção de curva padrão para qPCR	41
4.10 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	43
4.11 Hibridização Reversa.....	45
4.12 Tamanho amostral	48
4.13 Análise estatística	49
5 RESULTADOS	51
5.1 Análise demográfica	51
Exames diagnósticos.....	56
DISCUSSÃO.....	58
6. DISCUSSÃO.....	59
CONCLUSÃO	64
7. CONCLUSÃO	65
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Histórico da hanseníase

A hanseníase, conhecida desde os tempos bíblicos como lepra é doença com evidências há mais de três mil anos na China, Japão e Índia, já existindo no Egito quatro mil e trezentos anos antes de Cristo. A África era considerada como foco original da hanseníase, pois era gravemente afetada pela doença. A hanseníase foi levada ao continente europeu oriental pelos exércitos romanos e persas. A disseminação da doença na Europa deu-se pelas expedições sarracenas e pelas cruzadas. Os fenícios a expandiram em toda a costa do Mediterrâneo e depois deles as expedições de Alexandre, o Grande, contribuíram para a sua difusão na bacia oriental (Torres Muñoz, 2013).

A história da hanseníase no continente americano se confunde com a história da colonização, uma vez que os nativos não tinham essa doença e uma vez que os primeiros relatos de suas manifestações estão entremeadas com a chegada de portugueses e espanhóis ao continente (Torres Muñoz, 2013). Torres Muñoz, Montoya e Flores, assinalam que os primeiros doentes de hanseníase observados na Colômbia eram de origem espanhola. Ainda segundo Torres Muñoz, Virchow e Ehlers atribuíram à hanseníase as mutilações encontradas em figuras e vasos da época pré-colombiana, dando a entender que a chegada de escravos, por meio do tráfico, foi a grande responsável pela entrada da hanseníase no continente americano.

“A lepra aportou ao Brasil com os primeiros colonizadores portugueses, principalmente açorianos, e para sua disseminação bastante contribuíram os escravos africanos. Entretanto, outros povos posteriormente concorreram para a sua expansão.” (Torres Muñoz, 2013).

1.2 Aspectos epidemiológicos

A hanseníase é uma doença infecciosa causada pelo *Mycobacterium leprae* e tem evolução crônica. Em populações de alta endemicidade, poucos expostos desenvolvem a doença, seja devido a uma resistência genética ou à aquisição de resposta imunológica protetora (Almeida et al. 2004).

Apesar de décadas de pesquisa intensiva sobre a imunologia da hanseníase, o mecanismo pelo qual *M. leprae* é capaz de gerar toda a gama de respostas imunológicas ainda não foi elucidado. A maioria dos inquéritos clínicos concentraram-se no "defeito imunológico" dos doentes lepromatosos, ou seja, na sua anergia aparentemente específica ao *M. leprae*. Os amplos esforços de pesquisa dos últimos anos, no entanto, forneceram uma descrição cada vez mais detalhada dos componentes imunológicos das lesões cutâneas em todo o espectro da hanseníase.

A hanseníase tem um período médio de incubação de cinco anos, embora os sintomas possam demorar 20 anos a aparecer (OMS, 2016). A doença afeta principalmente a pele, os nervos periféricos, as membranas mucosas do trato respiratório e os olhos. É curável e a deficiência que ela cria pode ser prevenida se a doença for diagnosticada e tratada adequadamente. Quando os casos não são tratados precocemente, a doença e as reações que ocorrem podem causar sequelas progressivas e permanentes, incluindo deformidades e mutilações, redução da mobilidade, perda de membros, e até mesmo a cegueira (OMS, 2016).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define a hanseníase como um problema de saúde pública, principalmente naqueles países cujas taxas de

prevalência ultrapassam 1/10.000 habitantes. Apesar de o número de casos mundialmente estar abaixo deste ponto, há vários países onde o número de casos de hanseníase permanece acima deste limiar. Além disso, apesar do uso quase universal da poliquimioterapia (PQT), o número anual de novos casos detectados, incluindo crianças, manteve-se relativamente constante, em torno de 200.000 a 300.000 casos/ano (Bratschi et al. 2015; Gomes et al. 2007).

De acordo com relatórios oficiais recebidos de 138 países de todas as regiões da OMS, a prevalência global registrada de hanseníase no final de 2015 era de 176.176 casos, 0,2 casos/ 10.000 habitantes. O número de casos novos notificados globalmente em 2015 foi de 211.973 (2,9 casos novos por 100.000 pessoas) (OMS, 2016). O número de casos novos indica o grau de transmissão contínua da infecção. Estatísticas globais mostram que 199.992 (94%) dos novos casos de hanseníase em 2015 foram notificados em 14 países. Estes relataram mais de 1.000 novos casos cada, dentre eles estão Índia e Brasil, e apenas 6% dos novos casos foram notificados no resto do mundo (OMS, 2016). Alguns destes apresentam taxas de notificação muito elevadas para casos novos e podem ainda testemunha uma transmissão intensa (Figura 1).

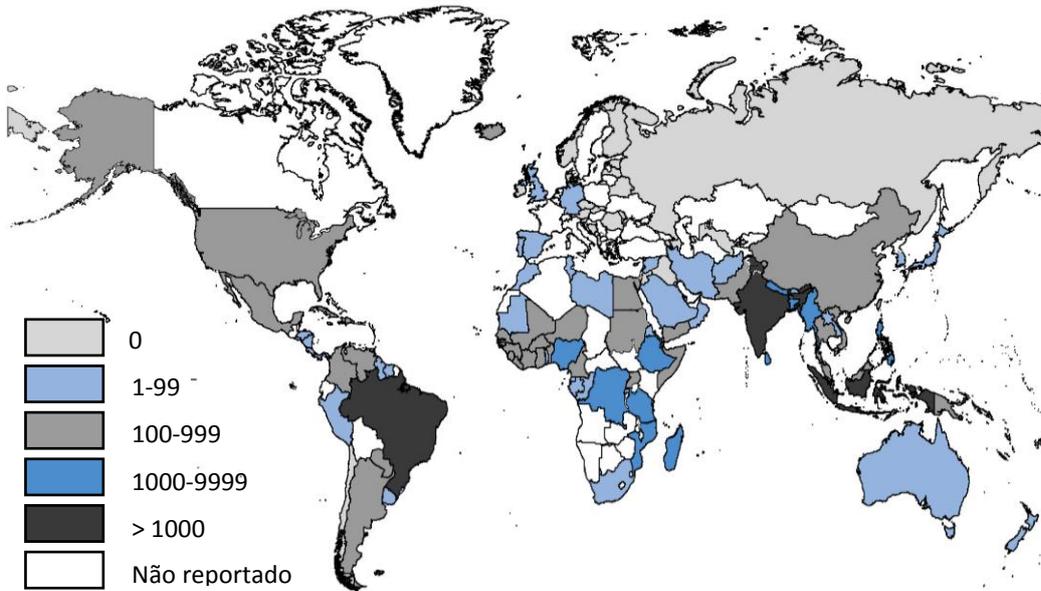


FIGURA 1: DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE CASOS NOVOS DA HANSENÍASE, 2015.

Fonte: OMS,2016

A OMS mostra que em 2017 o Brasil detectou 26.875 novos casos de hanseníase, ou seja, uma taxa de detecção acima de 10 novos casos por 100.000 habitantes, desmonstrando ser uma área de alta endemicidade como mostra a figura 2.

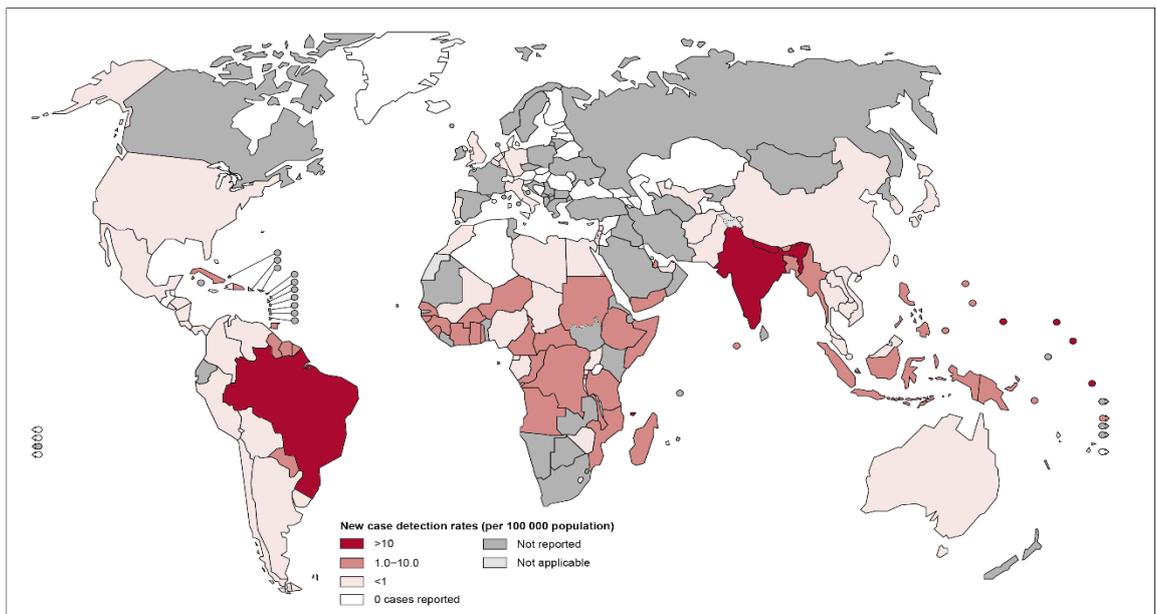


FIGURA 2: TAXA DE DETECÇÃO DE NOVOS CASOS DE HANSENÍASE,2016.

Fonte: OMS,2017

1.3 Agente Etiológico

O *M. leprae* é um parasita intracelular obrigatório, tem afinidade por células cutâneas (histiócitos e macrófagos) e dos nervos periféricos (células de Schwann), podendo afetar outros órgãos também como o fígado e os testículos. Instala-se no organismo da pessoa infectada, podendo se multiplicar. O bacilo tem metabolismo lento levando de 11 a 16 dias para se multiplicar, tem alta infectividade e baixa patogenicidade. O homem é, provavelmente, o único reservatório, embora tenham sido identificados animais infectados (*Brasil, 2002*).

O *M. leprae* não é cultivável *in vitro*, o que o diferencia de outras bactérias, inclusive de outras micobactérias. O maior avanço no diagnóstico laboratorial da hanseníase nos últimos anos tem sido o desenvolvimento de métodos para a extração, amplificação e identificação do DNA do *M. leprae* em espécimes clínicos utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR) e outras técnicas moleculares. Este é um acréscimo inestimável ao diagnóstico laboratorial e aos estudos da epidemiologia deste microrganismo sem a necessidade de cultivo *in vivo*, embora, ainda não esteja disponível como teste laboratorial de rotina (Scollard et al., 2006).

1.4 Transmissão

A transmissão da hanseníase por meio das secreções das vias respiratórias (nariz e boca) entre seres humanos tem sido proposta como a mais provável forma de transmissão da doença. O contato íntimo e prolongado com os pacientes que apresentam as formas multibacilares da doença é um fator importante para a transmissão do bacilo. A interrupção da transmissão da hanseníase é um dos

principais desafios dos programas de controle da doença. As fontes de infecção são principalmente pessoas com altas cargas bacterianas com ou sem sinais clínicos de hanseníase. Os pacientes MB, principais fontes de infecção, têm um poder de infectividade 11 vezes maior que os pacientes PB (Almeida et al., 2004; Noordeen et al., 1994).

1.5 Classificação e Formas Clínicas

A hanseníase apresenta uma ampla gama de manifestações clínicas e histopatológicas. Essa grande variabilidade genética determinada pela modulação de diferentes vias biológicas pelo *M. leprae* intrigou e frustrou clínicos e investigadores até que se percebeu que essa diversidade era baseada na capacidade do hospedeiro de desenvolver uma resposta imune celular ao bacilo (Scollard et al., 2006).

Ridley e Jopling (1966), de acordo com a resposta imunológica do paciente infectado, classificaram a hanseníase em formas clínicas espectrais. Desta forma tem-se a hanseníase lepromatosa (LL), uma forma clínica na qual os indivíduos apresentam uma intensa resposta imune humoral com resposta imune celular deficiente e alta carga bacilar. Na hanseníase tuberculóide (TT), os pacientes apresentam uma resposta imune humoral baixa, com forte imunidade celular adquirida, além de desenvolverem uma hipersensibilidade frente ao *M. leprae*, com carga bacilar tipicamente baixa e reação positiva à lepromina. A maioria dos pacientes hansenianos está posicionada entre essas duas formas clínicas, constituindo o grupo “*borderline*”, que inclui as formas resistente (*borderline tuberculóide*, BT) ou suscetível (*borderline lepromatoso*, BL). O grupo *borderline-*

borderline (BB) situa-se entre os dois grupos intermediários (Ridley & Jopling 1962; Gomes et al. 2007).

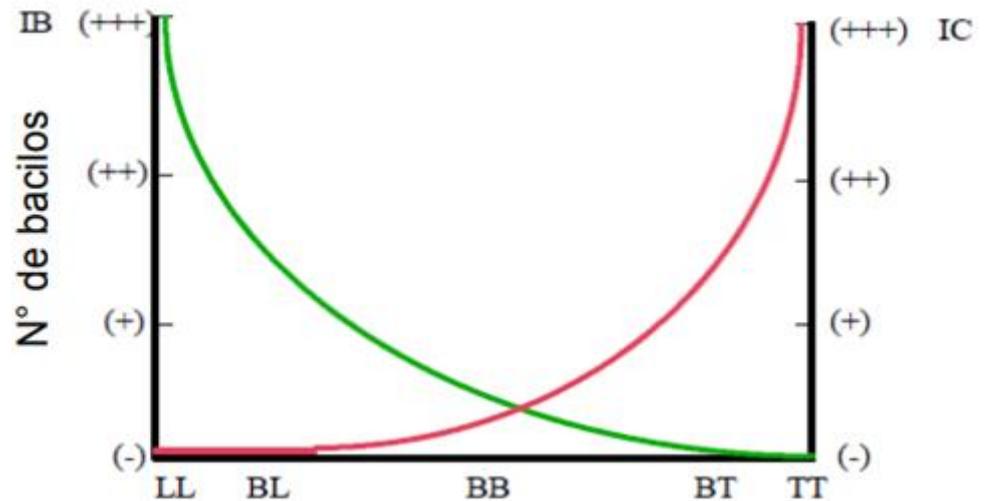


FIGURA 3: ESPECTRO CLÍNICO DA HANSENÍASE BASEADO NA CLASSIFICAÇÃO DE RIDLEY E JOPLING.

Fonte: Goulart (2002). A imunidade celular (IC) é inversamente proporcional à carga bacilar, medida pelo índice baciloscópico (IB). TT - pólo tuberculóide; LL – pólo virchowiano ou lepromatoso; BL, BB, BT – formas borderline (instáveis).

O Ministério da Saúde do Brasil preconiza um modelo de classificação em paucibacilar (PB) e multibacilar (MB), para pacientes com baciloscopia negativa e positiva, respectivamente. A OMS sugere uma classificação clínica com base no número de lesões cutâneas, naqueles locais endêmicos onde não estão disponíveis métodos diagnósticos laboratoriais. Desta forma temos a hanseníase paucibacilar (PB), nos casos com até cinco lesões cutâneas e a hanseníase multibacilar (MB), em casos com mais de cinco lesões cutâneas ou acometimento neural (WHO, 2008).

1.5.1 Hanseníase Indeterminada (paucibacilar)

Primeira forma da doença que ocorre após infecção. Pode evoluir espontaneamente para a cura, mas em $\frac{1}{4}$ dos pacientes, aqueles que apresentam susceptibilidade evoluem para as formas polares. Caracteriza-se clinicamente por lesão única, hipocrômica com redução da sensibilidade, podendo ou não ser acompanhada por alopecia e anidrose. Trata-se de uma forma mais comum em crianças (Figura 4) (Brasil, 2017b).



FIGURA 4: HANSENÍASE INDETERMINADA (SETA BRANCA MOSTRANDO LESÃO)

Fonte: Instituto Lauro de Souza Lima (Brasil, 2017)

1.5.2 Hanseníase tuberculóide (paucibacilar)

Nesta forma clínica, o sistema imune destrói os bacilos, mas não é suficiente para cura espontânea. Pode acometer crianças, com tempo de incubação de cerca de cinco anos, podendo se manifestar até em crianças de colo. É denominada hanseníase nodular da infância (figura 5) (Brasil, 2017b). Manifesta-se

frequentemente, por uma placa totalmente anestésica ou por placa com bordas elevadas na face ou tronco, bem delimitadas e centro claro. Pode apresentar-se como espessamento de tronco nervoso único, com perda total ou parcial de sensibilidade. Nesses casos, a baciloscopia é negativa e a biópsia de pele não demonstra bacilos. Sempre há perda de sensibilidade, associada ou não à alteração de função motora.



FIGURA 5: HANSENÍASE TUBERCULÓIDE (LESÃO COM BORDA ELEVADA).

Fonte: Acervo pessoal (2018)

1.5.3 Hanseníase dimorfa (multibacilar)

A lesão pode assemelhar-se à encontrada na hanseníase tuberculóide, mas ocorre em múltiplas lesões e com bordos mal definidos. (figura 6) (Brasil, 2017b). Nas lesões há hipoestesia ou até anestesia, com redução de funções autonômicas. Os nervos periféricos tendem a ser acometidos de forma assimétrica. Esta forma da doença ocorre após período de incubação acima de 5 anos, devido à lenta

multiplicação do bacilo. A baciloscopia é frequentemente positiva e deve ser coletada da borda infiltrada das lesões. Esta é considerada a forma mais comum da hanseníase e pode ser encontrada em até 70% dos pacientes diagnosticados.



FIGURA 6: HANSENÍASE DIMORFA (VÁRIAS LESÕES DE PELE AVERMELHADAS)

Fonte: Acervo pessoal (2018)

1.5.4 Hanseníase virchowiana (multibacilar)

O paciente com hanseníase virchowiana pode apresentar-se sem lesões reconhecíveis ao exame clínico, principalmente nas formas iniciais. Com a evolução da doença, a proliferação livre do bacilo resulta em pele com turgor alterado, seca, avermelhada, com poros dilatados. O paciente pode apresentar-se infiltrado com queda dos supercílios. A doença poupa áreas do corpo com temperatura mais elevada como couro cabeludo, axilas e topografia da coluna vertebral. Podem

aparecer pápulas e nódulos (hansenomas) (Figura 7) (Brasil, 2017b). Disestesias das mãos e pés, dores articulares são queixas comuns. O diagnóstico é facilmente confirmado pela baciloscopia dos lóbulos das orelhas e cotovelos (Brasil, 2017a). Esta é a forma mais contagiosa da doença.



FIGURA 7: HANSENÍASE VIRCHOWIANA (LESÕES AVERMELHADAS E SECAS NO TRONCO)

Fonte: Acervo pessoal (2018)

1.6 Diagnóstico

O diagnóstico da hanseníase é baseado na lesão clínica, na epidemiologia e no exame físico. A definição de caso se dá por 3 achados simultâneos ou isolados: 1. Lesões cutâneas com redução de sensibilidade, 2. Espessamento de nervos periféricos, 3. Baciloscopia positiva (Brasil, 2002). Em algumas situações a biópsia

de pele pode ser necessária para auxiliar o diagnóstico clínico (Brasil, 2002). O resultado positivo da baciloscopia classifica o caso como MB, porém o resultado negativo não exclui o diagnóstico da hanseníase, e nem classifica o paciente como PB (Brasil, 2017b).

1.7 Baciloscopia de Raspado Intradérmico

A baciloscopia é o exame microscópico que consiste na pesquisa do *M. leprae* por raspados intradérmicos das lesões ou dos lóbulos auriculares e cotovelos. É o único exame complementar que entra na definição de caso de hanseníase e também é útil para pesquisa de recidiva em situações nas quais a suspeita clínica está presente. É um exame que tem boa especificidade, mas, baixa sensibilidade (Brasil, 2002).

Como já dito, o diagnóstico da hanseníase deve ser baseado, essencialmente, no quadro clínico. Quando disponíveis, os exames subsidiários (baciloscopia e biópsia de pele) podem ser feitos. Quanto aos exames subsidiários é importante lembrar que toda técnica laboratorial apresenta resultados falso positivos e falso negativos. No paciente MB (hanseníase dimorfa e virchowiana), a baciloscopia normalmente é positiva. A dificuldade está em diagnosticar o paciente paucibacilar (PB), ou seja, com hanseníase indeterminada ou tuberculóide, onde a baciloscopia é negativa (Brasil, 2017b). O resultado deste exame baseia-se na enumeração semiquantitativa de organismos ácido-resistentes em pele infectada, é útil no acompanhamento de pacientes durante e após o tratamento, tendo-se o índice baciloscópico (IB), representado por uma escala logarítmica com variação entre 0 a 6+, conforme descrito abaixo (Brasil,2010).

Escala Logarítmica de Ridley

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

1.8 Reação em cadeia da polimerase

A PCR em tempo real (qPCR) vem se tornando um método bem estabelecido para a detecção, quantificação e tipagem de diferentes agentes microbianos nas áreas de diagnóstico clínico (Kralik & Ricchi, 2017). Essa metodologia é capaz de amplificar um fragmento específico de DNA, e tem sido usada em diagnósticos de diversos agentes patogênicos. Com a crescente quantidade de dados de sequenciamento disponíveis, é possível projetar ensaios de qPCR para cada microrganismo de interesse, além de detectar e quantificar de forma rápida e com alto rendimento de sequências de DNA alvo em diferentes amostras (Kralik & Ricchi, 2017). Estes ensaios são usados não apenas para a detecção, mas também para determinar a presença de genes e alelos específicos, por exemplo, tipagem de cepas e isolados, perfil de resistência antimicrobiana, etc., (Kralik & Ricchi, 2017).

Não sendo o *M. leprae* um microrganismo cultivável *in vitro* e não havendo possibilidade de crescimento em meios de isolamento padrão de micobactérias, o maior avanço no diagnóstico laboratorial da hanseníase tem sido o desenvolvimento de métodos para a identificação do DNA do *M. leprae* em espécimes clínicos utilizando PCR e outras técnicas moleculares. Este é um acréscimo inestimável ao diagnóstico laboratorial e aos estudos da microbiologia básica deste organismo, embora seja dispendioso e ainda não esteja disponível como teste clínico de rotina (Scollard et al., 2006).

1.9 Tratamento

O tratamento da hanseníase, conforme recomendações da OMS emprega uma PQT, composta pelas drogas clofazimina (CFZ), dapsona (DDS) e rifampicina (RFM). Adota-se a terapia multidroga por 6 meses em pacientes com doença paucibacilar, e 12 meses em pacientes com doença multibacilar (Figura 8) (Brasil, 2016). Esses regimes podem, no entanto, não ser suficientes para pacientes com doença lepromatosa e alta carga bacteriana. Apesar da resistência às drogas não ser vista como um grande problema devido a instituição da PQT, o monitoramento desta situação é essencial (Sekar et al. 2011).

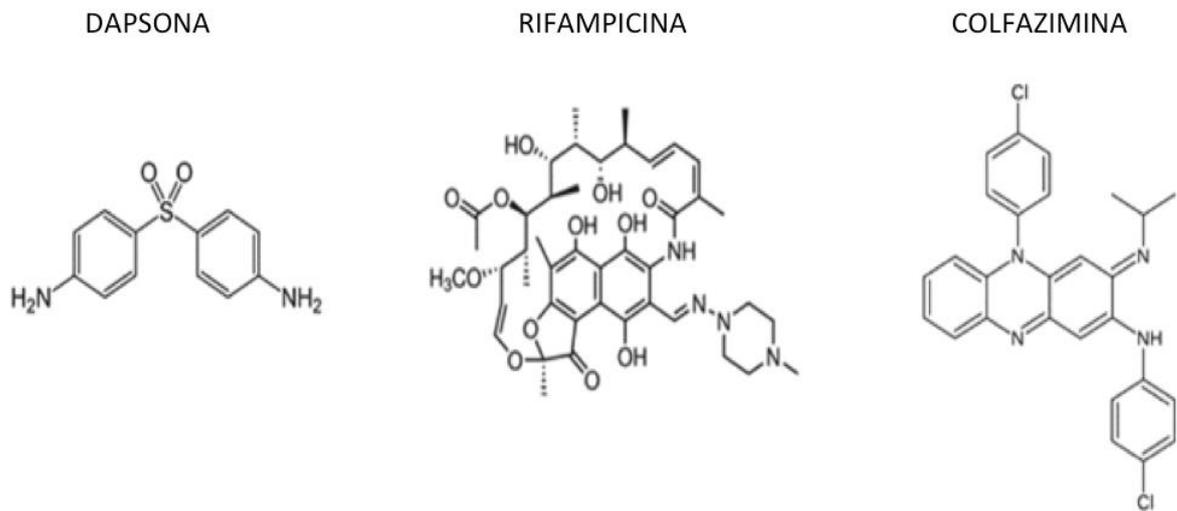


FIGURA 8: ESTRUTURA MOLECULAR DAS PRINCIPAIS DROGAS UTILIZADAS NA POLIQUIMIOTERAPIA PARA HANSENÍASE. ADAPTADO DE [HTTPS://INTERNATIONALTEXTBOOKOFLEPROSY.ORG/CONTENT/PRIVACY-POLICY](https://internationaltextbookofleprosy.org/content/privacy-policy).

FAIXA	CARTELA PB	CARTELA MB
Adulto	Rifampicina (RFM): cápsula de 300 mg (2)	Rifampicina (RFM): cápsula de 300 mg (2)
	Dapsona (DDS): comprimido de 100 mg (28)	Dapsona (DDS): comprimido de 100 mg (28)
	-	Clofazimina (CFZ): cápsula de 100 mg (3) e cápsula de 50 mg (27)
Criança	Rifampicina (RFM): cápsula de 150 mg (1) e cápsula de 300 mg (1)	Rifampicina (RFM): cápsula de 150 mg (1) e cápsula de 300 mg (1)
	Dapsona (DDS): comprimido de 50 mg (28)	Dapsona (DDS): comprimido de 50 mg (28)
	-	Clofazimina (CFZ): cápsula de 50 mg (16)

QUADRO 9: APRESENTAÇÃO DAS CARTELAS PARA PQT PB E MB.

Fonte: (Brasil, 2017)

Os esfregaços cutâneos são utilizados para distinguir entre hanseníase PB ou MB. Quando as baciloscopias estão disponíveis todo paciente com baciloscopia positiva deve ser classificado e tratado com o esquema de PQT para hanseníase MB.

A PQT padrão inviabiliza o bacilo e se iniciada precocemente previne incapacidades. A terapia interrompe ainda a cadeia de transmissão. Essa associação evita a resistência medicamentosa do bacilo que pode ocorrer quando se utiliza apenas um medicamento, impossibilitando a cura da doença. Caso ocorra intolerância a alguma droga que compõe o esquema padrão ou suspeita de resistência medicamentosa, drogas substitutivas estão disponíveis (Brasil, 2017a).

A principal dificuldade para a determinação da efetividade de esquemas terapêuticos substitutivos na hanseníase reside em fatores como o longo tempo de evolução da doença, difícil manuseio do bacilo em laboratórios e a presença de reações hansênicas reentrantes durante e após o tratamento. Isto dificulta a detecção de resistência ao esquema de tratamento padrão de poliquimioterapia da Organização Mundial de Saúde (PQT/OMS).

A ofloxacina é uma fluoroquinolona de segunda geração. Estudos *in vitro* demonstram que este antibiótico tem ação bactericida contra o *M. Leprae* (Burgos 2011). A droga vem sendo usada como uma das principais escolhas substitutivas em casos de resistência ou contraindicação a uma ou mais drogas do esquema padrão. Mecanismos moleculares e experimentais de resistência do *M. leprae* à ofloxacina, rifampicina e dapsona vêm sendo descritos (Matsuoka et al. 2010). A resistência a estes medicamentos pode ser detectada através de mutações mais prevalentes dos genes *rpoB* (codificando para a subunidade-B da RNA polimerase),

gyrA (codificando para a subunidade-A da DNA girase) e folp1 (codificando para a dihidropteroato sintase).

Apesar do exposto acima, é notória a necessidade de monitoramento do uso de novos medicamentos para o tratamento da hanseníase, já que o uso em maior escala, a prescrição inadequada e a falta de abastecimento do sistema de saúde podem ocasionar falhas no tratamento e estes fatores são reconhecidamente causadores de resistência.

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

A hanseníase ainda hoje é um grande problema de saúde pública no Brasil, sendo importante tanto o tratamento adequado como também o diagnóstico precoce. De acordo com dados da OMS, a integração dos serviços de saúde de controle e tratamento da hanseníase com outros serviços e programas de saúde gerais leva a uma perda de capacidade e habilidade em lidar com questões específicas da hanseníase, levando a falhas no diagnóstico e tratamento da doença (Rodrigues & Lockwood 2011). Por isso ações e serviços específicos para o combate à doença são desejáveis.

A preocupação com a falência dos esquemas terapêuticos padrão e substitutivo no tratamento da hanseníase é frequente. Isto mostra a necessidade de constante vigilância com critérios clínicos e, se possível, moleculares do advento de resistência bacteriana na hanseníase.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Monitorar variáveis para instituição do tratamento substitutivo contendo ofloxacina como indicação, adesão ao tratamento e efetividade em pacientes tratados para hanseníase no HUB e associar a identificação de resistência molecular como preditor de insucesso terapêutico.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a taxa de cura clínica em pacientes que usaram esquema substitutivo contendo ofloxacina, minociclina e moxifloxacina;
- Avaliar a presença de mutações genéticas entre isolados de *M. leprae* de pacientes hansenianos em tratamento no HUB;
- Investigar resistência à ofloxacina e a outras fluorquinolonas por meio da detecção de mutações mais significantes no gene *gyrA* (codifica para a subunidade A da DNA gyrase);
- Avaliar a adequabilidade do uso de esquemas substitutivos contendo ofloxacina prescritos no Hospital Universitário de Brasília (HUB) por exames clínicos e laboratoriais;
- Detectar fatores clínicos que possam influenciar no desenvolvimento de resistência genética ou clínica ao esquema substitutivo contendo ofloxacina, moxifloxacina e minociclina.

MÉTODOS

4. MÉTODOS

4.1 Local do estudo

Os pacientes foram recrutados de janeiro a dezembro de 2018 no HUB, que é um hospital terciário onde casos suspeitos de Hanseníase, e aqueles com sequelas da doença são encaminhados para procedimentos de diagnóstico e tratamento.

As amostras foram coletadas por médicos do ambulatório de Dermatologia do HUB e processadas no Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal (LACEN).

4.2 Delineamento

Trata-se de um estudo de coorte prospectivo com variável independente principal a presença ou não de mutações genéticas de resistência à ofloxacina e variável dependente principal a presença de cura clínica. Demais covariáveis analisadas incluíram sexo, idade, motivo da instituição do esquema substitutivo, droga padrão substituída, tempo de uso da ofloxacina, adequabilidade da indicação do esquema substitutivo, adesão ao esquema de doses supervisionadas, número de doses supervisionadas, sinais de toxicidade à PQT, presença de reações hansênicas.

4.3 População estudada

Foram incluídos, consecutivamente, pacientes com diagnóstico de hanseníase ativa, antes ou até o 3º mês de tratamento. Os critérios diagnósticos de Hanseníase seguiram critérios do Ministério da Saúde do Brasil e da OMS com baciloscopia positiva, com lesões cutâneas visíveis e/ou áreas com alteração de sensibilidade além de espessamento dos nervos periféricos. Considerou-se cura terapêutica aquele paciente que completou o esquema terapêutico proposto e que não teve indicação de novo esquema terapêutico, conforme avaliação clínica dos médicos responsáveis.

4.4 Critérios de exclusão

Foram excluídos pacientes menores de 18 anos, pertencentes a comunidades indígenas ou que não assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

4.5 Aspectos éticos

Este estudo está de acordo com a Declaração de Helsinque e sua revisão de 2013. Este projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da FM-UnB (CAAE: 71029717.1.0000.5558) (Anexo 2). Todo paciente foi incluído após assinatura e concordância com TCLE.

4.6 Exames e procedimentos realizados

4.6.1 Amostras analisadas

As seguintes amostras, a depender da indicação clínica realizada em atendimento assistencial, foram analisadas:

4.6.2 Raspado intradérmico

O raspado intradérmico foi coletado conforme orientações prestadas pelo Guia de Procedimentos Técnicos Baciloscopia em Hanseníase do Ministério da Saúde do Brasil (Brasil, 2002).

Em pacientes com lesões cutâneas visíveis ou áreas com alteração de sensibilidade, a coleta foi feita em lóbulo auricular direito (LD), lóbulo auricular esquerdo (LE), cotovelo direito (CD) e lesão (L). Nas lesões planas, a amostra foi coletada no limite interno. Nos nódulos, tubérculos e placas eritematosas marginadas por microtubérculos, as amostras foram coletadas no centro. Em pacientes que não apresentam lesões ativas visíveis, o material foi colhido no lóbulo auricular direito (LD), lóbulo auricular esquerdo (LE), cotovelo direito (CD) e cotovelo esquerdo (CE).

A realização da coleta, foi conforme o Guia de Procedimentos Técnicos Baciloscopia em Hanseníase do Ministério da Saúde do Brasil (Brasil, 2002):

- a) O paciente foi acomodado em sala apropriada e o procedimento foi explicado ao mesmo.
- b) Em seguida, foi realizada antissepsia com álcool a 70% dos sítios indicados na solicitação médica.

- c) Com o auxílio da pinça Kelly, foi realizada uma prega no sítio de coleta, pressionando a pele o suficiente para obter a isquemia, evitando o sangramento. A pressão foi mantida até o final da coleta sem travar a pinça.
- d) Foi realizado um corte na pele de aproximadamente 5mm de extensão por 3mm de profundidade e o esfregaço foi adequadamente inserido na lâmina e fixado para posterior análise.

4.6.3 Biópsia de pele

Biópsia incisional circular com diâmetro de 4mm foi realizada após assepsia, antissepsia e anestesia local com solução de lidocaína a 2%. O local escolhido para obtenção da amostra foi a periferia da lesão suspeita de Hanseníase. A biópsia foi utilizada para extração de DNA conforme descrito abaixo.

4.7 Extração do DNA

A amostra foi imersa em solução de etanol a 70% e mantida em temperatura ambiente até proceder a extração do DNA. Centrifugou-se o tubo contendo a amostra em solução conservante por 5 min. a 10.000 x g. Desprezou-se o sobrenadante. Colocou-se 100 µL de tampão de lise celular 10 mM (Tris pH 7,5; 1 mM EDTA pH 8,0; 1% SDS). Deixou-se sob agitação por 5 minutos a 95°C. Adicionou-se 30 µL de solução de precipitação. Homogeneizou-se por inversão 10 vezes. Centrifugou-se por 3 minutos a 10.000 x g. Passou-se o sobrenadante para outro tubo. Adicionou-se 130 µL de isopropanol ao sobrenadante. Centrifugou-se por 5 minutos a 10.000 x g. Desprezou-se o sobrenadante. Lavou-se o pellet com álcool à 70% (500 µL). Inverteu-se o tubo por 10 vezes. Centrifugou-se por 5

minutos a 10.000xg. 10.000xg. Desprezou-se o sobrenadante. Esperou-se secar e hidratou-se com tampão TE (30 µL) por 24 horas. Armazenou-se o DNA a 2-8 °C.

4.8 Detecção e Quantificação do *M. leprae*

Para a detecção e quantificação do *M. leprae* pela PCR em tempo real fez-se uma curva padrão utilizando a região da sequência repetitiva do *M. leprae* (RLEP) baseada em protocolo previamente proposto por Truman e colaboradores (2008). No protocolo em questão foram empregados iniciadores e sondas do sistema Taqman® (PE Applied Biosystems), marcadas com o fluoróforo HEX sob as concentrações descritas abaixo. Cada reação com volume final de 15 uL contém:

TABELA 1: REAGENTES PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO *M. LEPRAE*.

Reagente	Concentração	Volume (µL)
Master mix	5x	3,0
Primer Forward	10 nM	0,45
Primer Reverse	10 nM	0,45
Probe HEX	10 nM	0,3
Água DNase Free	-	7,8
DNA	-	3,0

A padronização se deu por volume 3 µL (150ng) de DNA para a realização do exame dada necessidade de atribuir a negatividade do teste a ausência do *M.*

leprae e não a uma falha do processo de extração de DNA, amplificou-se um gene humano (RNase P) como controle de amplificação com primers forward 5'-AGATTTGGACCTGCGAGCG-3', reverse 5'-GAGCGGCTGTCTCCACAAGT-3' e sonda FAM BHQ1 TTCTGAGAAGGCTCTGCGCG.

4.9 Clonagem do gene RLEP e confecção de curva padrão para qPCR

O gene RLEP foi amplificado em PCR convencional usando os primers forward 5'-GCAGTATCGTGTTAGTGAA-3' e reverse 5'-GCACATACGGCAACCTTCTAGCG-3' que originou um fragmento de 481 pares de bases. A integridade e o tamanho do fragmento foram confirmados por uma eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo. Posteriormente a banda correspondente ao gene RLEP foi excisada do gel de agarose e o DNA eluído para separar a mistura com auxílio do *kit* QIAquick *Gel Extraction* (QUIAGEN), segundo recomendado pelo fabricante. Esse gene foi clonado no laboratório do Instituto de Biologia da UNB.

O produto da PCR eluído do gel foi clonado no vetor pGEM-T *easy* (Promega). Posteriormente, esse vetor foi usado para transformar bactérias competentes da cepa *Escherichia coli* JM109, que foram selecionadas por resistência à ampicilina. Todas as etapas deste processo seguiram as instruções do fabricante. Dez colônias resistentes foram cultivadas em 3 ml de meio LB (Kasvi) a 37 °C sob agitação a 300 RPM por 18h na presença de Ampicilina. Posteriormente, as culturas foram centrifugadas a 3500 g, por 5 min e as bactérias sedimentadas foram usadas para a extração de DNA plasmidial usando QIAprep Spin Miniprep (KiaGen) conforme instrução do fabricante.

A presença do inserto RLEP foi confirmada através da PCR usando os primers forward 5'-GCAGTATCGTGTATGAACAGTGCA3', e reverse: 5'-CGCTAGAAGGTTGCCGTATGTGC-3' (conforme Tabela 2) por eletroforese em gel de agarose. Finalmente, os plasmídeos cujo o inserto do gene RLEP foi positivo foram quantificados, usando NanoDrop (Thermo) e diluídos para solução estoque de 10^8 cópias de RLEP em 1 μ L de DNA. Imediatamente antes das PCR, o DNA estoque foi homogeneizado e diluído de forma seriada originando 6 diferentes pontos (10^7 ; 10^6 ; 10^5 ; 10^4 ; 10^3 ; 10^2 cópias de RLEP em 1 μ L de DNA, eficiência = 2,006; slope = -3,308). As diluições compõem os pontos da curva padrão para quantificação absoluta por qPCR conforme figura 9.

TABELA 2: SEQUÊNCIA DE PRIMERS E SONDAS UTILIZADOS CLONAGEM DO GENE RLEP.

Gene		Oligonucleotídeo 5'-3'	Fragmento amplificado
RLEP	Forward	GCTTCGTGTGCTTTGCCGCA	481
	Reverse	GGTGTGTGGTGGGCTGGTG	481
RLEP3	Forward	GCAGTATCGTGTATGAACAGTGCA	129
	Reverse	CGCTAGAAGGTTGCCGTATGTGC	129
	Sonda	TCGATGATCCGGCCGTCGGCG	

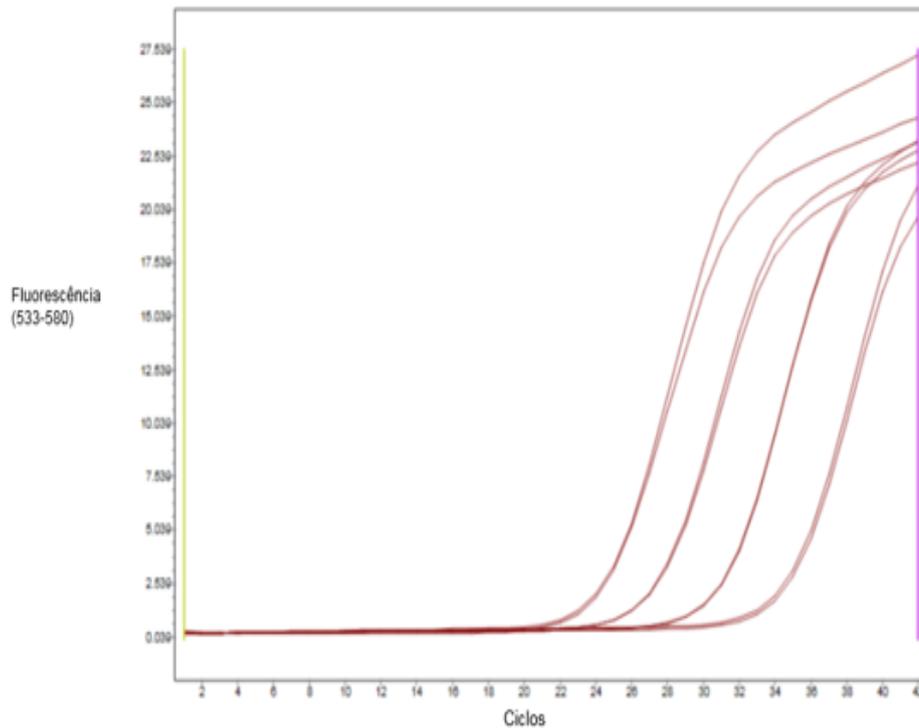


FIGURA 10: CURVA DE CALIBRAÇÃO

4.10 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Os ensaios para avaliar a presença de DNA do *M. leprae* no raspado dérmico e biópsia de pele pela técnica de qPCR foram realizados em um sistema de PCR em tempo real (LC 480 da Roche), utilizando-se primers e sonda TaqMan®, marcadas com o fluoróforo HEX segundo protocolo de **Truman e colaboradores (2008)**. A sequência dos primers e sonda foi a seguinte: 5' - **GCAGTATCGTGTTAGTGAA CAGTGCA** *tcgatgatccggccgctcggcg* GCA **CATACG GCAACCTTCTAGCG-3'** (tabela 3).

TABELA 3: SEQUÊNCIA DE PRIMERS E SONDAS UTILIZADOS NA PCR EM TEMPO-REAL DO *M. LEPRAE*.

Gene		Oligonucleotídeo 5'-3'	Fragmento amplificado
RLEP	Forward	GCAGTATCGTGTTAGTGAA	129
	Reverse	GCA CATAACGGCAACCTTCTAGCG	129
	Sonda	TCGATGATCCGGCCGTCGGCG	

O protocolo de amplificação constituiu-se de uma fase inicial de desnaturação a 95 °C por 10 min, seguida por 45 ciclos a 95°C por 15 segundos e a 60°C por 1 minuto para amplificação do RLEP e identificação do *M. leprae* nas amostras para posteriormente ser feita a hibridização reversa somente das amostras positivas. Os resultados foram obtidos de acordo com a primeira detecção de sinal fluorescente do Cycle Threshold (CT) e a amostra foi considerada positiva quando mostrou CT menor que 40, adotado como ponto corte, enquanto amostras com CT's superiores foram consideradas negativas (figura 10).

Para verificar o limite de detecção, uma curva padrão foi preparada a partir do DNA purificado do *M. leprae*, pela detecção do RLEP, do qual plotou-se uma curva padrão com sete pontos com diluição seriada (1:10) com diluição inicial e pontos finais 0,3ng e 3 fg, respectivamente. Essa curva foi realizada em triplicata para confirmar a reprodutibilidade, sendo os resultados dos CT's das amostras comparados à curva padrão para se determinar o número de cópias detectados. Neste caso, 3 fg do gene RLEP foram consideradas equivalentes a um bacilo.

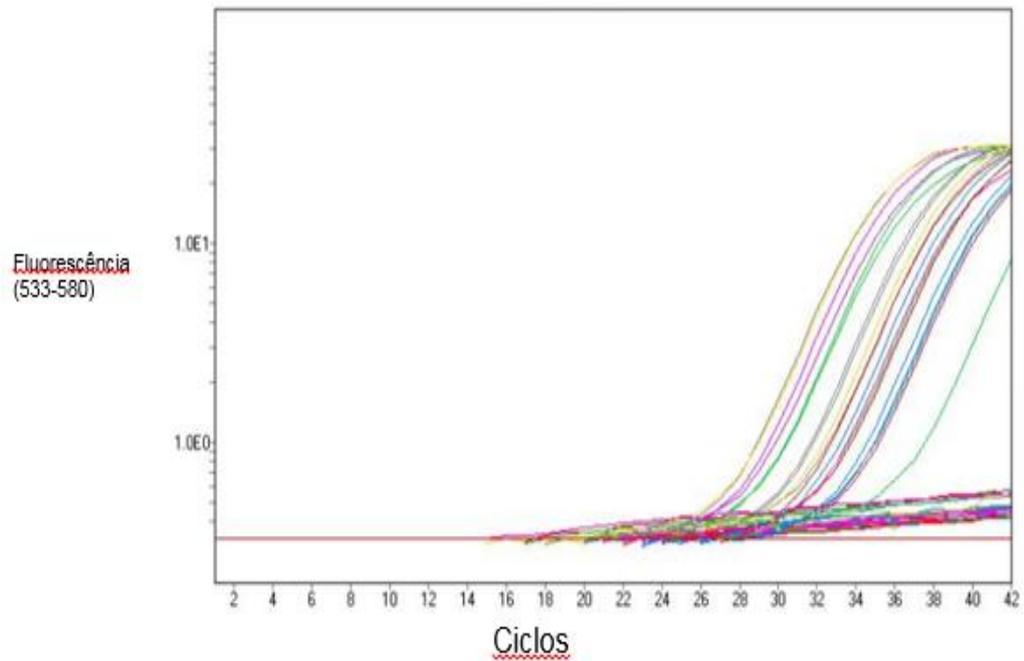


FIGURA 9: CURVA DE AMPLIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS

4.11 Hibridização Reversa

4.11.1 Amplificação do DNA

Foi utilizado o Kit Genotype LeptraeDR® (Hain Lifescience GmbH, Germany) para detecção de resistência nos genes *rpoB*, *gyrA* e *folp1* para rifampicina, ofloxacina e dapsona respectivamente em amostras clínicas. No qual cada reação continha 35 μ l de PMN (Polinucleotídeos), 5 μ l de 10x Tampão de PCR Buffer para HotStar Taq (Contém 15mM de $MgCl_2$), 2 μ l 25mM de solução de $MgCl_2$, 0,2 μ l (1U) Hot Star Taq, 3 μ l de água ultrapura e 5 μ l de solução de DNA. A concentração final de $MgCl_2$ nesta

mistura de amplificação é de 2,5mM. A amplificação feita em termociclador seguiu os seguintes passos fornecidos pelo fabricante do kit Genotype LepraeDR: 15 minutos a 95°C (1ciclo), 30 segundos a 95°C e 2 minutos a 58°C (10 ciclos), 25 segundos a 95°C, 40 segundos a 53°C e 40 segundos a 70°C (30 ciclos) e 8 minutos a 70°C (1 ciclo).

4.11.2 Hibridização

Nesta etapa foi utilizado o Twincubator, pré-aquecendo as soluções HYB e STR a 37 a 45 °C antes de usar, somente para as amostras positivas na qPCR, como o protocolo a seguir:

- Dispensando 20 µl da solução de desnaturação (DEN) num canto de cada poço a ser usado.
- Em seguida adicionou-se 20 µl da amostra amplificada, homogeneizando por 5 minutos.
- Em seguida colocou-se 1mL do tampão de hibridização (HYB, verde).
- Colocou-se as tiras em cada poço. Incubando as tiras no Twincubator por 30 minutos a 45°C.
- Aspirou-se completamente o tampão de hibridização.
- Adicionou-se 1mL de solução de lavagem adstringente (STR, vermelho) a cada tira por 15 minutos a 45°C.

- Removeu-se completamente essa solução.
- A partir deste passo o aparelho de incubação trabalhou em temperatura ambiente.
- Lavou-se cada tira com 1mL de solução Rinse (RIN) durante 1 minuto. - Adicionou-se 1mL do conjugado diluído a cada tira durante 30 minutos. ‘
- Removeu-se a solução lavando as tiras duas vezes, durante 1 minuto, com 1mL de RIN e uma vez, durante 1 minuto, com 1mL de água destilada. Desprezando a solução a cada lavagem.
- Adicionou-se 1mL de substrato diluído e incubou-se. Parando a reação após enxaguar as tiras por duas vezes com água destilada. Após esta etapa as fitas revestidas com oligonucleotídeos específicos, contendo as sondas para hibridização foram interpretadas conforme o padrão de bandas reveladas para cada tipo de sonda. A avaliação das bandas positivas e negativas, para cada tira de DNA foi feita comparando com uma ficha modelo de avaliação após a hibridização, alinhado à respectiva tira, com no topo a banda de controle de conjugado e bandas de controle positivo, ou seja, que devem aparecer para tornar o teste válido, continha também controle de conjugado, controle de amplificação, controle de identificação para a espécie *M. leprae* e controles de amplificação dos genes *rpoB*, *folP1* e *gyrA* para detecção de resistência à rifampicina, dapsona e ofloxacina, respectivamente.

A interpretação para cada gene / antibiótico era dada como suscetível quando todas as bandas WT foram positivas e todas as bandas MUT foram negativas; o resultado

era dado como resistente quando pelo menos uma banda MUT fosse positiva ou pelo menos uma banda WT fosse negativa, conforme mostrado abaixo:

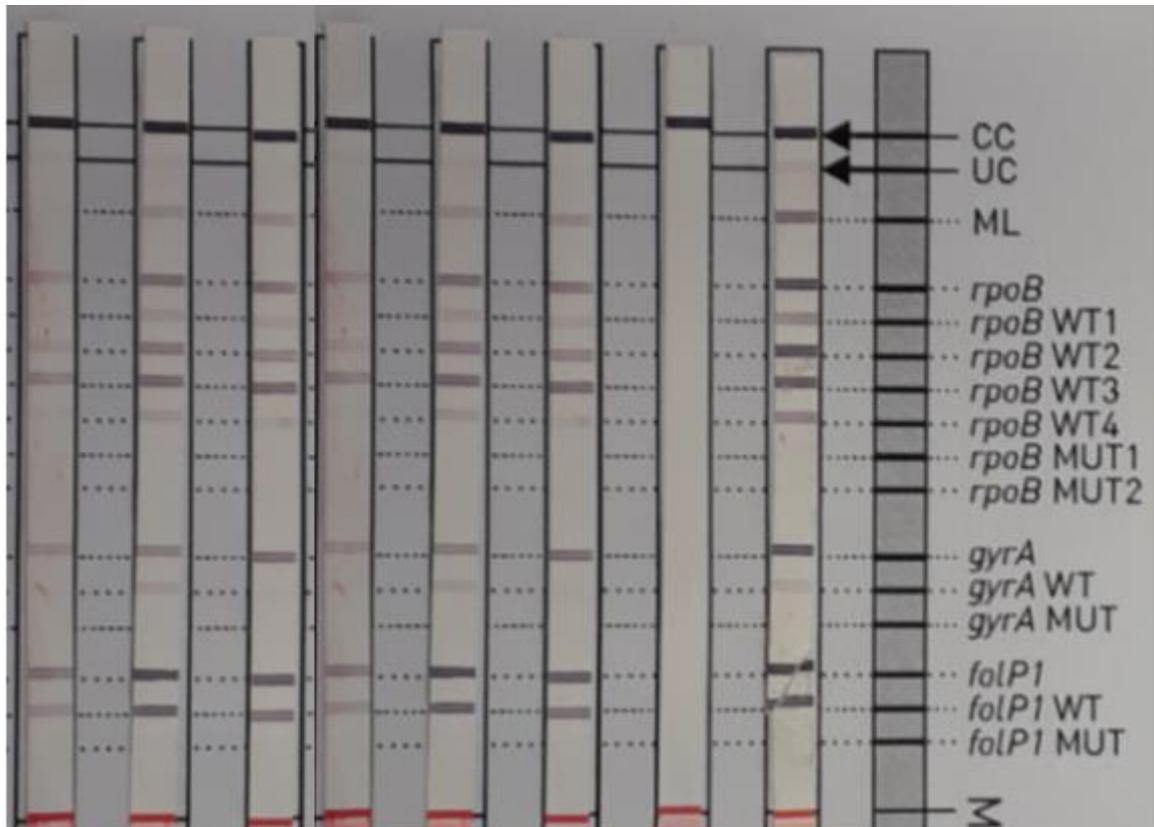


FIGURA 12: FIGURA DEMONSTRANDO UM CONJUNTO DE FITAS HAIN LEPRAEDR APÓS REVELAÇÃO

4.12 Tamanho amostral

O tamanho amostral foi calculado com base em dados demográficos. Coletados no ambulatório de Hanseníase do HUB, que registra cerca de 70 casos de pacientes com alguma contra-indicação à rifampicina, clofazimina ou dapsona em um período de 1 ano, tempo previsto para o estudo. Destes, cerca de 70% apresentarão cura clínica com o esquema substitutivo. Utilizando-se uma precisão absoluta de 5%, um efeito de desenho igual a 1 e um intervalo de confiança de 95%, calcula-se um mínimo de 58 pacientes a serem avaliados. O cálculo amostral

foi realizado pelo ambiente virtual OpenEpi® version 3.01 (Emory University, Rollins School of Public Health, Atlanta, Georgia, Estados Unidos da América).

4.13 Análise estatística

Para as variáveis expressas em média \pm desvio padrão e que apresentaram distribuição gaussiana, a comparação se deu pela utilização do teste *t* de student, ou pelo teste de Mann-Whitney para aquelas que não apresentaram distribuição gaussiana. Para as variáveis expressas em frequência, a comparação entre as formas se deu pelo uso do teste de qui-quadrado, ou pela sua versão exata quando mais de 20% das caselas apresentaram frequência esperada inferior a 5. Para efeito de análise empregou-se o nível de significância de 5%. Foi utilizado o programa (RStudio Team (2018). RStudio: Integrated Development for R. R Studio, Inc., Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>.)

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Análise demográfica

Foram recrutados 58 pacientes conforme cálculo amostral, mas foram excluídos 5 (<10%) pacientes por perda de dados relacionados aos exames de diagnóstico e resistência.

Foram incluídos 53 pacientes, 25 do sexo masculino e 28 do sexo feminino. A média de idade da população foi de 47,5 anos (desvio padrão = 16,41). Vinte e um pacientes estavam em curso de retratamento por recidiva ou insuficiência terapêutica. Trinta e um pacientes utilizaram esquema substitutivo com ofloxacina, 3 utilizaram minociclina e 6 utilizaram moxifloxacina.

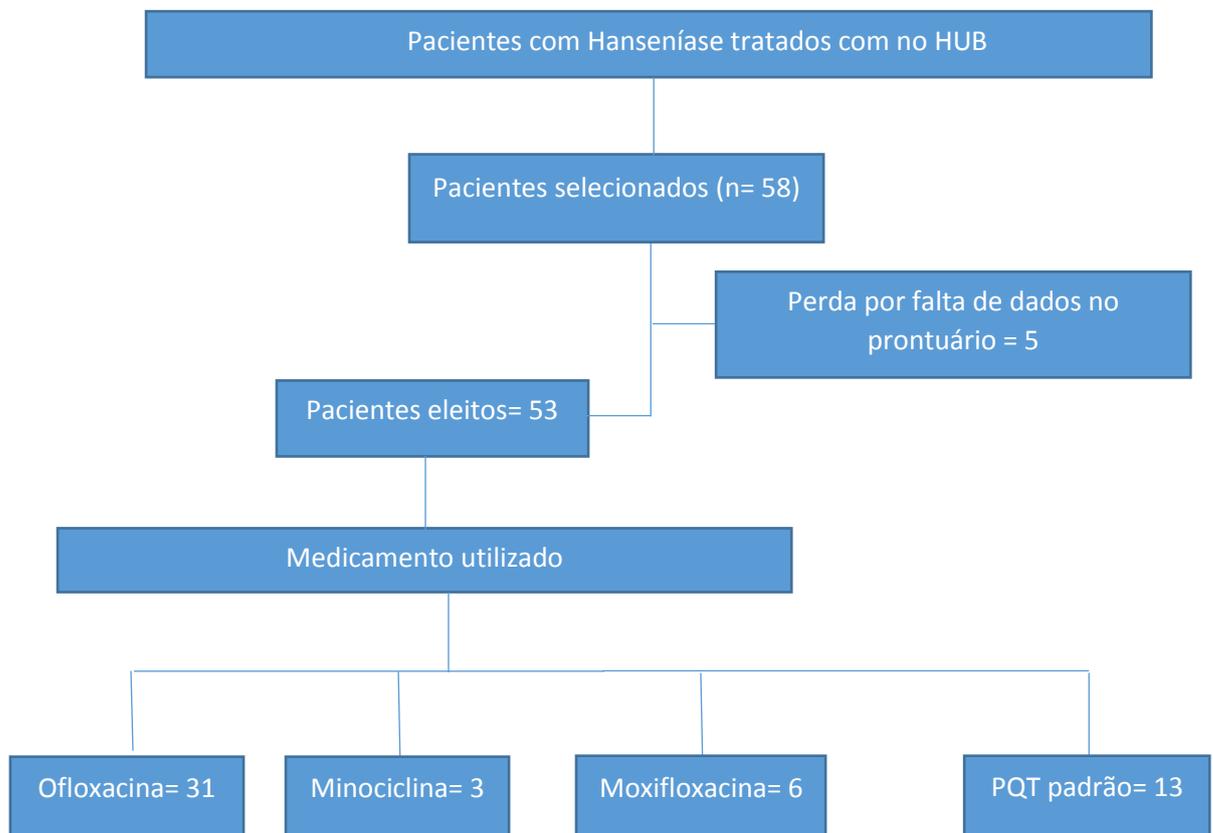


Figura 13: Fluxograma de pacientes com Hanseníase tratados no HUB.

Treze pacientes apresentaram estados reacionais do tipo I e do tipo II concomitantes durante o tratamento. Treze pacientes apresentaram ainda reação do tipo I isolada durante o tratamento e apenas 1 paciente apresentou reação do tipo II isolada durante o tratamento. Os efeitos adversos às drogas que constituem a PQT padrão foram descritos em 24 pacientes. Quatorze pacientes apresentaram hemólise significativa pelo uso da dapsona e 1 caso apresentou metahemoglobinemia pela mesma droga. Quatro pacientes apresentaram hepatopatia medicamentosa (tabela 4).

TABELA 4: DADOS DEMOGRÁFICOS E ESQUEMA TERAPÊUTICO UTILIZADO.

	n	%
Idade (Anos)		
Mais de 30	44	83,1
Menos de 30	9	16,9
Gênero		
Masculino	25	47,2
Feminino	28	52,8
Baciloscopia(IB)		
0	27	50,9
0,25 - 2	9	17,0
>2	9	17,0
Esquema Terapêutico		
PQT Padrão	13	25,0
Substitutivo	40	75,0
Ofloxacina	31	77,5
Minociclina	3	7,5
Moxifloxacina	6	15,0
Reação Hansênica		
Reação tipo I	13	24,5
Reação tipo II	1	1,9
Reações tipos I e II	13	24,5
Reações Adversas		
Hemólise	14	26,4
Metahemoglobinemia	1	4,17
Hepatopatia	4	16,67
Outras Reações	5	20,83

Em relação à forma clínica da hanseníase desses pacientes (tabela 5), a forma predominante foi LL com 31%, BL 29%, BB 27%, BT 4%, TT 2% com 7% não definidos por incompletude dos dados. Não houve influência da classificação de Ridley & Joplin na frequência de pacientes considerados curados após o tratamento (0,517). Todos os pacientes foram classificados como portadores de forma MB segundo a classificação operacional. Todos os pacientes inicialmente considerados como portadores das formas indeterminada, TT e BT apresentaram mais de um tronco nervoso acometido à avaliação neurológica simplificada.

TABELA 4: FREQUÊNCIA DE CASOS E FORMA CLÍNICA DOS PACIENTES DE HANSENÍASE TRATADOS NO HUB NO ANO DE 2018.

Classificação	Período (2018)(%)
LL	31
BL	29
BB	27
BT	4
TT	2
ND	7

LL: Lepromatoso-lepromatoso; BL: Borderline-lepromatoso; BB-: Borderline- Borderline; BT- Borderline - tuberculóide; TT- Tuberculóide-tuberculóide; ND- Não definido.

Quanto ao domicílio do paciente incluído neste estudo, a maioria é do DF com 26 (49%), observando que os estados vizinhos também contribuem com muitos casos: Goiás 16 (30%), Minas Gerais 2 (4%), tendo 1 (2%) da Paraíba e outros 8 (15%) sem domicílio definido, como pode ser visto na tabela 6.

TABELA 5: NÚMERO E PROPORÇÃO DE CASOS DE HANSENÍASE EM ESQUEMA SUBSTITUTIVO NO HUB QUANTO AO DOMICÍLIO.

Domicílio	N	%
Distrito Federal	26	49
Goiás	16	30
Minas Gerais	2	4
Paraíba	1	2
Não Definido	8	15

Quarenta e três pacientes foram considerados curados após tratamento avaliado, enquanto em 4 pacientes a falência terapêutica foi detectada. Em 6 pacientes o estado de cura não pôde ser averiguado por falta de dados no prontuário. Os pacientes que estavam em retratamento tiveram menor porcentagem de cura do que os pacientes em primeiro tratamento ($p=0,034$) (Tabelas 7 e 8).

TABELA 6: INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS DEMOGRÁFICAS E DE TRATAMENTO NA CURA DOS PACIENTES COM HANSENÍASE.

Variável analisada	Pacientes curados n/total (%)	Risco Relativo	p-valor
Sexo Feminino	22/24 (91,67)	1,00	1,000
Sexo Masculino	21/23 (91,30)	1,00	
Retratamento	17/21 (80,95)	0,82	0,034
Tratamento Primário	26/26	1,00	1,00
Minociclina	2/3 (66,67)	0,69	0,187
Moxifloxacina	5/6 (83,33)	0,87	0,349
Ofloxacina	29/31 (93,55)	1,07	0,597
Efeitos adversos	23/24 (95,83)	1,10	0,348
Uso de corticosteróides	24/26 (92,31)	1,02	1
Uso de talidomida	13/14 (92,86)	1,02	1

TABELA 7: INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS DEMOGRÁFICAS E DE TRATAMENTO NUMÉRICAS NA CURA DOS PACIENTES COM HANSENÍASE.

Variável	Curados	Não curados	p-valor
Idade média (desvio padrão)	47,88 (16,76)	45,00 (16,18)	0,74
Número de doses da PQT mediana (intervalo interquartil)	12 (0)	12(0)	0,32
Índice baciloscópico média (desvio padrão)	1,02 (1,57)	0,94 (1,71)	0,92

Exames diagnósticos

A qPCR foi positiva em 23 pacientes. Foi detectada uma média de 245.276 bacilos por 3 uL de DNA extraído, variando de 41 a 4.230.000 bacilos. A baciloscopia foi positiva em 21 pacientes, com IB médio de 2,46, variando de 0,25 a 5,0. Os métodos moleculares apresentaram positividade em 17 pacientes, sendo que 6 desses pacientes apresentavam baciloscopia negativa, mostrando uma sensibilidade 54% maior quando comparada ao exame baciloscópico. Não foram observados indícios de resistência molecular em nenhum dos pacientes avaliados neste estudo.

Em 8 pacientes com baciloscopia negativa, a qPCR resultou positiva com uma média de 39.045 bacilos por 3 uL de DNA extraído, variando de 41 a 311.000. Em 3 pacientes com baciloscopia positiva a qPCR mostrou-se negativa. Em 4 pacientes com IB menor do que 2 o Kit Hain mostrou-se positivo. A concordância da baciloscopia com os exames de qPCR positivos foi de 63,8% (IC95% = 44.89 –

81.19) e a concordância da baciloscopia com os exames de qPCR negativos foi de 82,4% (IC95% = 66.49 – 91.65), resultando em um índice Kappa de 48,4% (IC95% = 0.2236 – 0.7414) (Tabela 9).

TABELA 8: CONCORDÂNCIA ENTRE AS METODOLOGIAS DE QPCR E BACILOSCOPIA

Métodos Diagnósticos	(%)	IC95%
Baciloscopia x qPCR (Positivos)	63,8%	44.89 – 81.19
Baciloscopia x qPCR (Negativos)	82,4%	66.49 – 91.65
Kappa	48,4%	0.2236 – 0.7414

IC95% = Intervalo de confiança de 95%.

Observou-se correlação regular ($r^2 = 0,61$) entre a contagem microscópica direta “padrão-ouro” e as estimativas baseadas na PCR RLEP TaqMan®. (Figura 13).

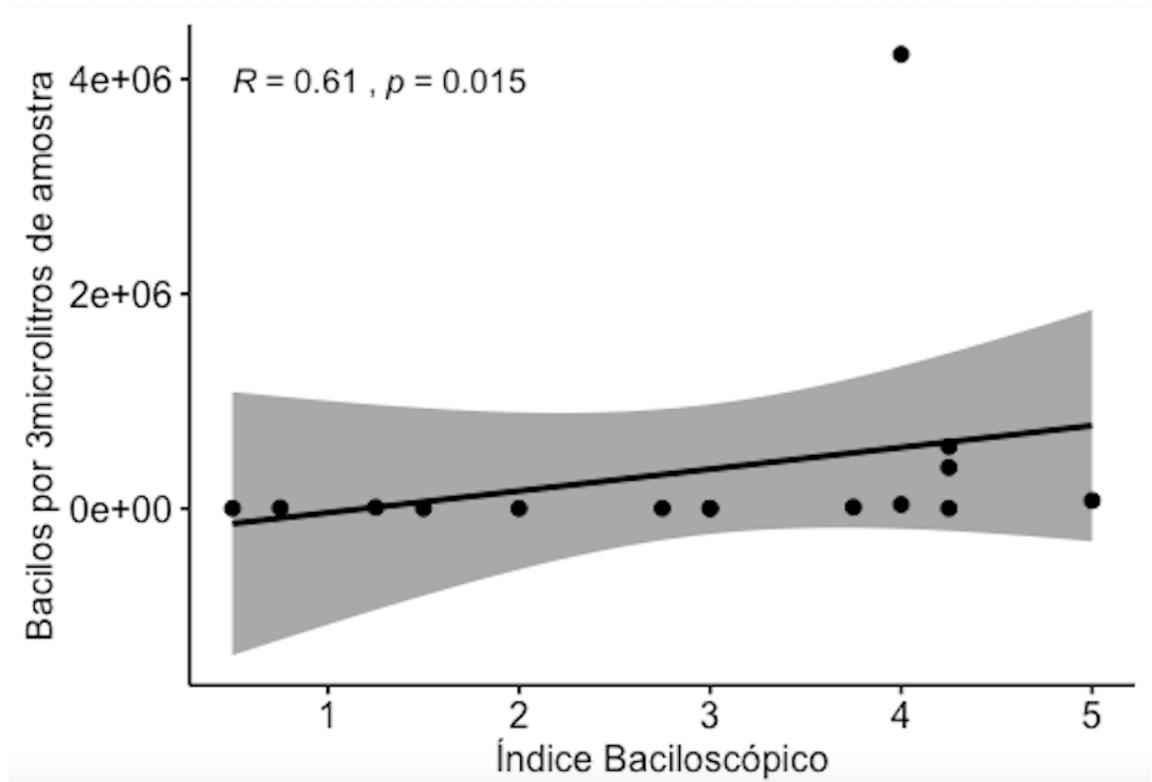


FIGURA 10: CORRELAÇÃO ENTRE OS VALORES DE BACILOSCOPIA E QPCR.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

A introdução da PQT proposta pela OMS provou ser um dos mais importantes avanços na gestão e controle da hanseníase (OMS, 2016). Os excelentes resultados relatados com a PQT validaram sua eficácia, segurança e aceitação. No entanto, descrições de insucesso, reações hansênicas e recidivas por suspeita de possíveis quadros de resistência conduziram este estudo como forma de monitoramento a esquemas de tratamento substitutivo estipulado pelo Ministério da Saúde do Brasil, bem como para averiguar a eficácia em pacientes que não respondem ao esquema de PQT padrão. Vale ressaltar que na prática nem sempre é fácil diferenciar reação de recidiva apesar de didaticamente, como disposto na figura 14, haver diferenças entre um e outro. Muitas vezes os sinais e sintomas cursam de maneira quase análoga confundindo o profissional que assiste o paciente.

CARACTERÍSTICAS	REAÇÃO	RECIDIVA
Período de ocorrência	Frequente durante a PQT e/ou menos frequente no período de dois a três anos após término do tratamento	Em geral, período superior a cinco anos após término da PQT
Surgimento	Súbito e inesperado	Lento e insidioso
Lesões antigas	Algumas ou todas podem se tornar eritematosas, brilhantes, intumescidas e infiltradas	Geralmente imperceptíveis
Lesões recentes	Em geral, múltiplas	Poucas
Ulceração	Pode ocorrer	Raramente ocorre
Regressão	Presença de descamação	Ausência de descamação
Comprometimento neural	Muitos nervos podem ser rapidamente envolvidos ocorrendo dor e alterações sensitivo-motoras	Poucos nervos podem ser envolvidos com alterações sensitivo-motoras de evolução mais lenta.
Resposta a medicamentos antirreacionais	Excelente	Não pronunciada

FIGURA 15: DIFERENÇAS CLÍNICAS ENTRE REAÇÃO HANSÊNICA E RECIDIVA.

Fonte: Coordenação-Geral de Hanseníase e Doenças em Eliminação – CGHDE/DEVIT/SVS/MS.

Não foi detectado caso de resistência molecular dentre os pacientes avaliados, o que impediu conclusão do desfecho primário conforme protocolo de pesquisa, já que este componente analítico não foi possível pela ausência de grupo de casos e controles. É possível inferir que a resistência do *M.leprae* não seja um fenômeno tão comum. O que se pode perceber é que a persistência do quadro de infecção e das manifestações clínicas que envolvem a hanseníase esteja mais ligada à suscetibilidade do paciente ao bacilo.

A dificuldade para a avaliação dos contatos domiciliares do paciente com hanseníase prejudica a quebra da cadeia de transmissão da doença (Ministério da Saúde, 2010). Apesar de tudo o que foi observado, a persistência do quadro de não melhora do paciente pode ser explicada por reinfecção, necessitando que os contatos domiciliares do caso-índice sejam avaliados de forma detalhada pois esses têm papel fundamental na persistência da hanseníase (Brasil, 2017b). Estudos epidemiológicos mostram que no convívio domiciliar, o contato com uma pessoa com a forma multibacilar, não tratada, numa zona endêmica implica um risco de doença até 10%, sendo que as crianças encontram-se em maior risco (Worobec, 2009). A OMS recomenda o exame dos contatos domiciliares no momento do diagnóstico do paciente (Worobec, 2009), mas a reavaliação anual por um período de 5 anos pode detectar casos inicialmente não identificados.

O impacto positivo da PQT tem sido limitado ainda pela difícil adesão ao regime terapêutico, pelo longo período de tratamento a que o paciente deve ser submetido e pela dificuldade no manejo dos efeitos adversos e reações hansênicas que podem surgir durante o tratamento. Apesar de a PQT retardar o surgimento de resistência medicamentosa e proporcionar uma parada mais rápida da transmissão

da doença, ela pode provocar efeitos colaterais como hiperpigmentação da pele causada pela clofazimina (CFZ), que se acentua com o sol, deixando a pele mais seca e mais sujeita a eczemas; gastrite, cefaléia, e anemia hemolítica pela dapsona (DDS), esta última mais frequente em indivíduos com deficiência da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), podendo ainda aparecer metahemoglobinemia e hepatites tóxicas e, distúrbios digestivos, trombocitopenia, síndrome pseudogripal e dispneia pela rifampicina (Opromolla, 1997).

Fica claro que o exame dos contatos intradomiciliares e a adesão ao tratamento, como em outras doenças são fatores indissociáveis na cura do paciente com hanseníase, pois interfere diretamente no sucesso terapêutico. Assim, a não adesão ao tratamento ou a má utilização dos medicamentos afeta e protela a alta por cura. A principal limitação do presente estudo consiste no curto tempo de acompanhamento dos pacientes após fim do tratamento (6 a 8 meses). A falência terapêutica foi dada por critérios clínicos e presença significativa de bacilos viáveis na baciloscopia feita após o tratamento em casos selecionados.

A única variável que influenciou negativamente a cura dos pacientes tratados foi a presença de retratamento durante o período avaliado. Vários motivos podem explicar este achado. A exposição mais prolongada à PQT pode gerar maior resistência medicamentosa, no entanto este achado não foi comprovado neste estudo. Devemos considerar ainda que os pacientes retratados podem apresentar, de forma recorrente, adesão irregular ao tratamento como verificado em alguns casos ou problemas metabólicos de processamento das drogas. Ambos os últimos fatores são de difícil avaliação.

Foi demonstrado que a qPCR é um método importante para o diagnóstico da doença e consequente sucesso do esquema farmacoterápico, uma vez que pode classificar como multibacilar um paciente que outrora fora diagnosticado como paucibacilar apenas pelo exame baciloscópico, mostrando possuir maior sensibilidade. A presença de bacilos detectáveis por qPCR, mesmo na ausência de baciloscopia positiva pode representar uma doença mais disseminada, apenas com menos sintomas.

No presente estudo, observa-se que a baciloscopia permanece como método complementar de escolha para a avaliação inicial dos pacientes com suspeita de hanseníase por ter baixo custo e reduzida complexidade requerida para sua execução apesar da limitação de sensibilidade 39,6% (21/53) para este estudo. A PCR mostrou-se o método mais sensível para o diagnóstico da doença 43% (23/53), com a vantagem de maior sensibilidade se comparada à baciloscopia para os casos paucibacilares. Até o presente momento, não se dispõe de outro método mais efetivo quando há a combinação de achados clínicos e laboratoriais para uma terapia medicamentosa mais efetiva. Apesar disso observamos ainda casos de baciloscopia positiva em pacientes com qPCR negativa. Este resultado mostra que apesar da qPCR ser mais sensível, todo o teste está sujeito a variações intrínsecas explicadas pelo acaso. Logo todo o teste diagnóstico pode apresentar resultados falso positivos e falso negativos.

Não se pode deixar de citar, também, a importância da divulgação para a população de sinais e sintomas da doença, o treinamento de profissionais para detecção e acompanhamento dos novos casos de hanseníase, a sensibilização dos gestores, informando a necessidade de ações e a formulação de estratégias para

o manejo da hanseníase, como elementos importantes para que os novos casos de hanseníase sejam diagnosticados, tratados e curados. Torna-se mister a avaliação dos contatos de pacientes com hanseníase, para que se possa quebrar a cadeia de transmissão dessa doença, pois, parece provável que contatos intradomiciliares de pacientes com hanseníase, possam permanecer clinicamente de forma silenciosa. As ferramentas moleculares são aliadas importantes nessa investigação.

Por isso, a utilização de estratégias como o exame de contatos intradomiciliares dos casos novos detectados e o seguimento de tais contatos dos casos índices tende a ter um impacto positivo na detecção de novos casos da doença, pois, podem ampliar as oportunidades de diagnóstico mais precocemente, contribuindo para a cura, evitando que o paciente seja diagnosticado já nas fases tardias da doença e com incapacidades físicas instaladas. Por fim, é importante reforçar a apropriação, a coordenação por parte do governo, garantindo os recursos adequados, promovendo parcerias e a colaboração intersetorial em níveis nacional e internacional. Esta articulação visa facilitar pesquisas em hanseníase, reforçar os sistemas de vigilância e de informação sanitária para a monitorização além da avaliação dos programas. Estes são alguns dos pilares necessários para controlar a hanseníase e evitar suas complicações (WHO, 2020).

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Após análise cautelosa do estudo pode-se concluir que:

- A Taxa de cura clínica no curto prazo, em pacientes que usaram esquema substitutivo contendo ofloxacina não foi diferente dos pacientes que usaram outros esquemas de tratamento;
- Apesar de todas as dificuldades que permeiam o diagnóstico e, por conseguinte o tratamento do paciente com hanseníase não foi detectado nenhum gene de resistência nas amostras testadas;
- A indicação do uso de esquemas substitutivos contendo ofloxacina prescritos no Hospital Universitário de Brasília – HUB foi aparentemente adequada uma vez que, trata-se de um hospital terciário e uma vez que a taxa de complicações reportadas nos pacientes foi relativamente elevada;
- Apenas a condição de retratamento influenciou o desfecho clínico de cura no curto prazo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, E.C. et al., 2004. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA by polymerase chain reaction in the blood and nasal secretion of Brazilian household contacts. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz*, 99 (0074-0276), pp.509–511.
- Brasil. (2002). Guia para o Controle da Hanseníase. *Guia Para o Controle Da Hanseníase, 3a edição*. Retrieved from http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_de_hanseníase.pdf
- BRASIL. Ministério da Saúde. (2017). *Guia Prático Sobre a Hanseníase*. Retrieved from <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/novembro/22/Guia-Pratico-de-Hanseníase-WEB.pdf>
- Brasil. (2010). *Guia de procedimentos técnicos*. Retrieved from http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_procedimentos_tecnicos_corticosteroides_hanseníase.pdf
- Brasil. (2016). *Diretrizes para vigilância , atenção e eliminação da hanseníase como problema de saúde pública*. <https://doi.org/978-85-334-2348-0>
- Brasil. (2017a). *Guia Prático Sobre a Hanseníase*. Retrieved from <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/novembro/22/Guia-Pratico-de-Hanseníase-WEB.pdf>
- Brasil. (2017b). *Guia prático sobre a hanseníase [recurso eletrônico]*. Retrieved from <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/novembro/22/Guia-Pratico-de-Hanseníase-WEB.pdf>
<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/novembro/22/Guia-Pratico-de-Hanseníase-WEB.pdf>
http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigi
- Kralik, P., & Ricchi, M. (2017). A basic guide to real time PCR in microbial

- diagnostics: Definitions, parameters, and everything. *Frontiers in Microbiology*, 8(FEB), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00108>
- Ministério da Saúde. (2010). Doenças infecciosas e parasitárias. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 33(4), 286–286. <https://doi.org/10.1590/S0036-46651991000400018>
- OMS. (2016). *Estratégia Global para Hanseníase. Estratégia Global para Hanseníase*. <https://doi.org/10.1006/nimg.2001.0923>
- Opromolla, D. . V. A. (1997). Terapêutica da hanseníase, 345–350.
- Scollard, D. M., Adams, L. B., Gillis, T. P., Krahenbuhl, J. L., Truman, R. W., & Williams, D. L. (2006). The continuing challenges of leprosy. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(2), 338–381. <https://doi.org/10.1128/CMR.19.2.338-381.2006>
- Torres Muñoz, P. (2013). Manual de Leprología. *Manual de Leprología*, 289. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- WHO. (2020). *Global Leprosy Strategy 2016–2020*.
- Worobec. (2009). Treatment of leprosy/Hansen’s disease in the early 21st century. *Dermatologic Therapy*, 22(6), 518–537. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8019.2009.01274.x>
- Bratschi, M.W. et al., 2015. Current knowledge on Mycobacterium leprae transmission : a systematic literature review. *Leprosy review*, 86, pp.142–155.
- Burgos J, de la Cruz E, Paredes R, Andaya CR, Gelber RH, 2011. The activity of several newer antimicrobials against logarithmically multiplying M. leprae in mice. *Lepr Rev*. 82(3):253-8.

- Donoghue, H.D., Holton, J. & Spigelman, M., 2001. PCR primers that can detect low levels of *Mycobacterium leprae* DNA. *Journal of Medical Microbiology*, 50(2), pp.177–182.
- Gomes, F.G. et al., 2007. Úlceras Cutâneas Na Hanseníase: Perfil Clínico-Epidemiológico Dos Pacientes * . , 82(5), pp.433–437.
- Goulart, I.M.B. et al., 2007. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin lesions of leprosy patients by PCR may be affected by amplicon size. *Archives of dermatological research*, 299(5-6), pp.267–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17530267>.
- Goulart, I.M.B. & Goulart, L.R., 2008. Leprosy: Diagnostic and control challenges for a worldwide disease. *Archives of Dermatological Research*, 300(6), pp.269–290.
- Lechat MF, S.H.N.S.R.M.F.P.S.W.F.P.G.S.J.L.H.-Y.L.K.G.B.-B.M.S.H.R.C., 1994. Eliminating leprosy as a public health problem: a unique opportunity in human history. *Nursing Journal of India*, 85, pp.38–41.
- Matsuoka M1, Suzuki Y, Garcia IE, Fafutis-Morris M, Vargas-González A, CarreñoMartinez C, Fukushima Y, Nakajima C, 2010. Possible mode of emergence for drugresistant leprosy is revealed by an analysis of samples from Mexico. *Jpn J Infect Dis*. 63(6):412-6.
- Ridley, D.S. & Jopling, W.H., 1962. *Classification of Leprosy According to Immunity*.
- Rodrigues, L.C. & Lockwood, D.N.J., 2011. Leprosy now: Epidemiology, progress, challenges, and research gaps. *The Lancet Infectious Diseases*, 11(6), pp.464–470. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70006-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70006-8).

Sekar, B. et al., 2011. Detection of mutations in folp1, rpoB and gyrA genes of *M. leprae* by PCR- direct sequencing--a rapid tool for screening drug resistance in leprosy. *Leprosy review*, 82(1), pp.36–45. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21644470>. WHO. 2008, 2008. Global leprosy situation, beginning of 2008. *World Health Organization*, 87(34), pp.317–328. World Health Organization. Global leprosy situation, 2009. *Wkly Epidemiol Rec* 2010; 8535:337-48.

Torres Muñoz, Pedro. 2013. “Manual de Leprología.” *Manual de Leprología*: 289.

Brasil. (2002). *Guia para o Controle da Hanseníase. Guia Para o Controle Da Hanseníase, 3a edição*. Retrieved from http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_de_hanseniase.pdf

BRASIL. Ministério da Saúde. (2017). *Guia Prático Sobre a Hanseníase*. Retrieved from <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/novembro/22/Guia-Pratico-de-Hanseniase-WEB.pdf>

Brasil. (2010). *Guia de procedimentos técnicos*. Retrieved from http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_procedimentos_tecnicos_corticosteroides_hanseniase.pdf

Brasil. (2016). *Diretrizes para vigilância, atenção e eliminação da hanseníase como problema de saúde pública*. <https://doi.org/978-85-334-2348-0>

Brasil. (2017a). *Guia Prático Sobre a Hanseníase*. Retrieved from <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/novembro/22/Guia-Pratico-de-Hanseniase-WEB.pdf>

Brasil. (2017b). *Guia prático sobre a hanseníase [recurso eletrônico]*. Retrieved from

[http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/novembro/22/Guia-Pratico-](http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/novembro/22/Guia-Pratico-de-Hanseníase-)
[de-Hanseníase-](http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/novembro/22/Guia-Pratico-de-Hanseníase-)

[WEB.pdf%0Ahttp://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/novembro/22/](http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/novembro/22/Guia-Pratico-de-Hanseníase-)
[Guia-Pratico-de-Hanseníase-](http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/novembro/22/Guia-Pratico-de-Hanseníase-)

[WEB.pdf%0Ahttp://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigi](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigi)

Kralik, P., & Ricchi, M. (2017). A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: Definitions, parameters, and everything. *Frontiers in Microbiology*, 8(FEB), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00108>

Ministério da Saúde. (2010). Doenças infecciosas e parasitárias. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 33(4), 286–286.
<https://doi.org/10.1590/S0036-46651991000400018>

OMS. (2016). *Estratégia Global para Hanseníase. Estratégia Global para Hanseníase*. <https://doi.org/10.1006/nimg.2001.0923>

Opromolla, D. . V. A. (1997). Terapêutica da hanseníase, 345–350.

Scollard, D. M., Adams, L. B., Gillis, T. P., Krahenbuhl, J. L., Truman, R. W., & Williams, D. L. (2006). The continuing challenges of leprosy. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(2), 338–381. <https://doi.org/10.1128/CMR.19.2.338-381.2006>

Torres Muñoz, P. (2013). Manual de Leprología. *Manual de Leprología*, 289.
<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

WHO. (2020). *Global Leprosy Strategy 2016–2020*.

Worobec. (2009). Treatment of leprosy/Hansen’s disease in the early 21st century. *Dermatologic Therapy*, 22(6), 518–537. <https://doi.org/10.1111/j.1529->

8019.2009.01274.x

Brasil. (2002). Guia para o Controle da Hanseníase. *Guia Para o Controle Da Hanseníase, 3a edição*. Retrieved from http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_de_hanseniaze.pdf

BRASIL. Ministério da Saúde. (2017). *Guia Prático Sobre a Hanseníase*. Retrieved from <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/novembro/22/Guia-Pratico-de-Hanseniaze-WEB.pdf>

Brasil. (2010). *Guia de procedimentos técnicos*. Retrieved from http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_procedimentos_tecnicos_corticosteroides_hanseniaze.pdf

Brasil. (2016). *Diretrizes para vigilância , atenção e eliminação da hanseníase como problema de saúde pública*. <https://doi.org/978-85-334-2348-0>

Brasil. (2017a). *Guia Prático Sobre a Hanseníase*. Retrieved from <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/novembro/22/Guia-Pratico-de-Hanseniaze-WEB.pdf>

Brasil. (2017b). *Guia prático sobre a hanseníase [recurso eletrônico]*. Retrieved from <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/novembro/22/Guia-Pratico-de-Hanseniaze-WEB.pdf>
<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/novembro/22/Guia-Pratico-de-Hanseniaze-WEB.pdf>
http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigi

Kralik, P., & Ricchi, M. (2017). A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: Definitions, parameters, and everything. *Frontiers in Microbiology*,

- 8(FEB), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00108>
- Ministério da Saúde. (2010). Doenças infecciosas e parasitárias. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 33(4), 286–286.
<https://doi.org/10.1590/S0036-46651991000400018>
- OMS. (2016). *Estratégia Global para Hanseníase. Estratégia Global para Hanseníase*. <https://doi.org/10.1006/nimg.2001.0923>
- Opromolla, D. . V. A. (1997). Terapêutica da hanseníase, 345–350.
- Scollard, D. M., Adams, L. B., Gillis, T. P., Krahenbuhl, J. L., Truman, R. W., & Williams, D. L. (2006). The continuing challenges of leprosy. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(2), 338–381. <https://doi.org/10.1128/CMR.19.2.338-381.2006>
- Torres Muñoz, P. (2013). Manual de Leprología. *Manual de Leprología*, 289.
<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Truman, Richard W. Andrews, P. Kyle Robbins, Naoko Y. Adams, Linda B. Krahenbuhl, James L. Gillis, Thomas P., (2008). Enumeration of Mycobacterium leprae using real-time PCR. *PLoS Neglected Tropical Diseases*
- WHO. (2020). *Global Leprosy Strategy 2016–2020*.
- Worobec. (2009). Treatment of leprosy/Hansen’s disease in the early 21st century. *Dermatologic Therapy*, 22(6), 518–537. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8019.2009.01274.x>

ANEXO I:

Comprovante de aprovação emitido pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

<p>UNB - FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA</p> 
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA
Título da Pesquisa: RELAÇÃO DA IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE RESISTÊNCIA À OFLOXACINA COM A RESPOSTA CLÍNICA AO ESQUEMA SUBSTITUTIVO PARA HANSENIASE EM PACIENTES TRATADOS NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA
Pesquisador: Carlos Augusto Felpe de Sousa
Área Temática:
Versão: 2
CAAE: 71029717.1.0000.5558
Instituição Proponente: Hospital Universitário de Brasília - HUB
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio
DADOS DO PARECER
Número do Parecer: 2.261.950
Apresentação do Projeto:
Reapresentação do Projeto de Pesquisa em resposta a primeiro parecer.
O projeto busca responder a pergunta sobre a RELAÇÃO DA IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE RESISTÊNCIA À OFLOXACINA COM A RESPOSTA CLÍNICA AO ESQUEMA SUBSTITUTIVO PARA HANSENIASE EM PACIENTES TRATADOS NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA.
A metodologia está adequada.
Objetivo da Pesquisa:
GERAL
Monitorar variáveis demográficas, relacionadas à doença e ao tratamento na instituição do esquema substitutivo contendo ofloxacina em pacientes tratados para hanseníase no Hospital Universitário de Brasília – HUB e associar a identificação de resistência molecular como preditor de insucesso terapêutico.
OBJETIVOS ESPECÍFICOS
• Avaliar a taxa de cura clínica em pacientes que usaram esquema substitutivo contendo ofloxacina (Definido como desfecho primário / variável dependente principal);
• Avaliar a presença de mutações genéticas entre isolados de <i>Mycobacterium leprae</i> de pacientes hansenianos do Distrito Federal (Fator de risco / variável independente);
<p>Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina Bairro: Asa Norte CEP: 70.910-900 UF: DF Município: BRASÍLIA Telefone: (61)3107-1918 E-mail: cepfm@unb.br</p>

UNB - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE BRASÍLIA



Continuação do Parecer: 2.201.490

- Investigar resistência a ofloxacino e outras fluorquinolonas através da detecção de mutações mais significantes no gene *gyrA* (codifica para a sub-unidade A da DNA gyrase);
- Avaliar a adequabilidade do uso de esquemas substitutivos contendo ofloxacina prescritos no Hospital Universitário de Brasília – HUB;
- Detectar fatores clínicos que possam influenciar no desenvolvimento de resistência genética ou clínica ao esquema substitutivo contendo ofloxacina;
- Descrever fatores demográficos desta população.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos e benefícios

Os atuais riscos inerentes à pesquisa podem resultar do procedimento de biópsia incisional ou baciloscopia como dor, hematoma, sangramento e infecção. Minimizaremos este risco utilizando apenas amostras já coletadas para realização da identificação do agente etiológico por reação em cadeia da polimerase, exame de rotina no ambulatório de dermatologia. Não serão realizadas biópsias adicionais e sim processamento adicional de biópsia já coletada. Sallentamos ainda o risco de exposição dos dados coletados e de identificação dos pacientes incluídos, fato importante em doenças estigmatizadas. Minimizaremos estes riscos pela adoção de registros de estudo e não do nome do paciente e por nosso compromisso legal com o sigilo médico e da pesquisa.

Os benefícios do estudo consistem em melhor monitorização (molecular) do diagnóstico e do tratamento, bem como possível reconhecimento precoce de casos de falência terapêutica.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa atende os requisitos éticos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE foi revisado e atualizado de forma a cumprir com o disposto nas normativas éticas.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto apreciado na 6ª Reunião Ordinária do CEP-FM-UnB-2017. Após apresentação do parecer do (a) Relator (a), aberta a discussão para os membros do Colegiado. O projeto foi Aprovado.

De acordo com a Resolução 466/2012-CONEP/CNS, itens X.1.- 3.b. e XI.2.d, este Comitê chama a atenção da obrigatoriedade de envio do relatório parcial semestral e final do projeto de pesquisa, contados a partir da data de aprovação do protocolo de pesquisa.

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

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



Continuação do Parecer: 2.201.930

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_851415.pdf	03/08/2017 23:40:48		Aceito
Outros	RESUMO_DO_PROJETO_ATUALIZADO.docx	03/08/2017 23:39:35	Ciro Martins Gomes	Aceito
Outros	RESPOSTA_AO_PARECER_CONSUBSTANCIADO.pdf	03/08/2017 23:38:49	Ciro Martins Gomes	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_atualizado.pdf	03/08/2017 23:38:18	Ciro Martins Gomes	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Atualizado.docx	03/08/2017 23:38:02	Ciro Martins Gomes	Aceito
Outros	Curriculo_Carlos.pdf	10/07/2017 21:44:56	Ciro Martins Gomes	Aceito
Outros	Curriculo_Ciro.pdf	10/07/2017 21:41:42	Ciro Martins Gomes	Aceito
Outros	Declarac_responsabilidade.pdf	10/07/2017 21:40:54	Ciro Martins Gomes	Aceito
Orçamento	orcamento.pdf	10/07/2017 21:40:14	Ciro Martins Gomes	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Concordancia_Institucional.pdf	10/07/2017 21:39:27	Ciro Martins Gomes	Aceito
Outros	Carta_de_Encaminhamento.pdf	10/07/2017 21:38:25	Ciro Martins Gomes	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	10/07/2017 21:35:45	Ciro Martins Gomes	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BRASÍLIA, 06 de Setembro de 2017

Assinado por:
Florêncio Figueiredo Cavalcanti Neto
(Coordenador)

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