

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

ANA CLAUDIA NEGRET SCALIA

**ACURÁCIA DA REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE EM TEMPO
REAL PARA O DIAGNÓSTICO DA HANSENÍASE EM DIFERENTES FASES
DO SANGUE PERIFÉRICO: UM MODELO DIAGNÓSTICO E DE
DISSEMINAÇÃO DO *Mycobacterium leprae***

BRASÍLIA

2022

**ACURÁCIA DA REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE EM TEMPO
REAL PARA O DIAGNÓSTICO DA HANSENÍASE EM DIFERENTES FASES
DO SANGUE PERIFÉRICO: UM MODELO DIAGNÓSTICO E DE
DISSEMINAÇÃO DO *Mycobacterium leprae***

ANA CLAUDIA NEGRET SCALIA

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:

Orientador: Prof. MD. PhD. Ciro
Martins Gomes

BRASÍLIA

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

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

NN385a Negret Scalia, Ana Claudia
ACURÁCIA DA REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE EM TEMPO REAL
PARA O DIAGNÓSTICO DA HANSENIASE EM DIFERENTES FASES DO
SANGUE PERIFÉRICO: UM MODELO DIAGNÓSTICO E DE DISSEMINAÇÃO DO
Mycobacterium leprae / Ana Claudia Negret Scalia;
orientador Ciro Martins Gomes. -- Brasília, 2022.
75 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Ciências Médicas) --
Universidade de Brasília, 2022.

1. Mycobacterium leprae. 2. PCR em tempo real. 3.
Acurácia Diagnóstica. 4. Sensibilidade. 5. Saúde Pública. I.
Martins Gomes, Ciro, orient. II. Título.

**ACURÁCIA DA REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE EM TEMPO
REAL PARA O DIAGNÓSTICO DA HANSENÍASE EM DIFERENTES FASES
DO SANGUE PERIFÉRICO: UM MODELO DIAGNÓSTICO E DE
DISSEMINAÇÃO DO *Mycobacterium leprae***

BANCA EXAMINADORA

Presidente

Professor Dr. Ciro Martins Gomes

Universidade de Brasília – UnB

Membros

Dra. Thais Montezuma – Membro Titular

Hospital Alemão Oswaldo Cruz

Dr. Daniel Holanda Barroso – Membro Titular

Universidade de Brasília

Dr. Alexandre Casimiro de Macedo – Membro Suplente

Ministério da Saúde do Brasil

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, irmãos e namorado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Prof. Ciro Martins Gomes, por ter sido o grande incentivo para entrar nessa nova jornada e encarar mais uma etapa acadêmica em minha vida. O apoio e estímulo oferecidos foram, sem dúvida, parte crucial para que este trabalho fosse iniciado e finalizado. A atenção, conhecimento e complacência serão qualidades sempre reconhecidas.

Agradeço ao meu chefe, Dr. Gustavo Adolfo Sierra Romero, que sempre me proporcionou ferramentas para possibilitar a execução do meu trabalho da melhor forma possível, buscando a aliança com o estudo para permitir evolução e aprimoramento profissional.

Agradeço imensuravelmente às minhas amigas Viviane Medeiros Silva e Laís Sevilha por todo o suporte, paciência, conforto e ajuda a mim oferecidos na reta final deste trabalho. A segurança e carinho por vocês providos seguramente permitiram com que este processo fosse mais leve.

Agradeço às minhas colegas de trabalho, Ana Paula Sampaio Cardoso e Ranielly Lemes de Queiroz, por terem sempre me oferecido alento e suporte nos momentos em que precisei de auxílio na minha profissão, para que eu pudesse conciliar com os estudos.

Agradeço à Renata Velôzo Timbó, técnica do laboratório de Dermatologia e colega de profissão, por todas as orientações, a assistência e a atenção a mim oferecidas nos momentos de trabalho de bancada.

Agradeço à minha mãe por sempre me oferecer apoio, ânimo e colo em todos os momentos que precisei. A imagem de mulher inteligente, trabalhadora, guerreira, determinada e perseverante, sem dúvidas é e sempre será motivo de inspiração para continuar almejando crescimento intelectual, pessoal e espiritual.

Agradeço ao meu namorado, Felipe Carpes Stahelin, por ser motivo de inspiração diária, por me incentivar a crescer e ser sempre alguém melhor. Agradeço por acreditar em mim e por ser estímulo para meu crescimento pessoal, profissional e acadêmico. Agradeço por ter me proporcionado os melhores dias da minha vida, possibilitando me manter sempre em harmonia e com a mente tranquila para a finalização deste projeto.

Agradeço ao meu pai que, como dedicado profissional e eterno estudante, me ensinou desde pequena que o conhecimento é o único bem que não nos pode ser tirado. Obrigada por todo o suporte moral durante estes últimos anos.

Agradeço ao meu irmão, Juan Felipe Negret Scalia, por sempre acreditar em mim e me presentear com palavras de conforto e de entusiasmo para sempre alcançar meus objetivos.

Agradeço à minha irmã, Yamá Garajau Castilho, que assim como eu, bióloga, compartilhou e compartilha comigo conhecimentos, opiniões e sugestões dentro da nossa área de atuação. Agradeço também pelo apoio seja com falas, gestos e atitudes para engrandecer meu saber e pelo olhar que ela tem por mim, que sempre me faz acreditar que eu sou a pessoa mais incrível deste mundo.

Agradeço à Universidade de Brasília por me acolher em seu quadro de funcionários e em seu quadro discente. É nesta Instituição que tenho passado grande parte dos meus últimos anos e que tem me permitido alcançar metas e traçar objetivos mais altos.

*A verdadeira viagem de descobrimento
não consiste em procurar novas paisagens,
mas em ter novos olhos.*

(Marcel Proust)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados brasileiros sobre a Hanseníase em 2020	26
Tabela 2 - Reagentes utilizados na reação em cadeia da polimerase em tempo real .	44
Tabela 3 - Programa utilizado para a reação em cadeia da polimerase em tempo real	44
Tabela 4 - Programa utilizado para a curva de dissociação	45
Tabela 5 - Características demográficas dos pacientes incluídos no estudo	47
Tabela 6 - Características relacionadas à forma da hanseníase	48
Tabela 7 - Características relacionadas à reação da hanseníase	48
Tabela 8 - Características relacionadas ao GIF da hanseníase ao diagnóstico.....	48
Tabela 9 - Características relacionadas à baciloscopia da hanseníase	49
Tabela 10 - Quantificação do número de bacilo por amostra (Números representados pela média padrão $P=0,261$)	49
Tabela 11 - Propriedade dos testes diagnósticos nos materiais avaliados.....	51
Tabela 12 - Sensibilidade dos testes diagnósticos nos materiais avaliados de acordo com a classificação multi ou paucibacilar.	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Número de casos novos de Hanseníase, por país, em 2020	27
Figura 2 - Proporção de casos novos de hanseníase segundo escolaridade e região de residência	28
Figura 3 - Mapa de Casos de Hanseníase no Brasil	29
Figura 4 - Número Total de casos novos de Hanseníase e em menores de 15 anos segundo Unidade da Federação de residência	30
Figura 5 - Microscopia eletrônica (esquerda) e de varredura (direita) do <i>Mycobacterium leprae</i>	31
Figura 6 - O Espectro da Hanseníase (Classificação de Ridley-Jopling).....	33
Figura 7 - Fases de separação dos componentes do sangue periférico	42
Figura 8 - Curva padrão para quantificação	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.D.	Anno Domini
BCG	<i>Bacillus Calmette-Guérin</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
cDNA	<i>Complementary Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido Desoxirribonucléico Complementar)
Cq	Ciclo de Quantificação
Ct	Threshold Cycle
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido Desoxirribonucléico)
EUA	Estados Unidos da América
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
g	Força G
GIF	Grau de Incapacidade Física
HUB	Hospital Universitário de Brasília
H ₂ O	Água
IC	Índice de Confiança
IB	Índice Bacteriológico
ITIS	<i>Integrated Taxonomic Information System</i>
LOD	Limite de Detecção
LOQ	Limite de Quantificação
mg	Miligrama
ml	Mililitro
μl	Microlitro
<i>M. leprae</i>	<i>Mycobacterium leprae</i>
MS	Ministério da Saúde
μm	Micrometro
μM	Micromolar
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAHO	Pan American Health Organization (Organização Pan-americana da Saúde)
pb	Pares de Bases
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i> (Célula Mononuclear do Sangue Periférico)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia de Polimerase)
PGL-1	Glicolípido Fenólico-1
PQTU	Poliquimioterapia Única
qPCR	Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real
rRNA	<i>Ribosomal Ribonucleic Acid</i> (Ácido ribonucléico ribossômico)
RLEP	<i>Repetitive Element</i> (Elemento Repetitivo)
rpm	Rotações Por Minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
SYBR	<i>Synergy Brands Inc</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
THELEP	<i>The Scientific Working Group on Chemotherapy of Leprosy</i>
UDG	Uracil-DNA Glicosilase
UnB	Universidade de Brasília
WHA	<i>World Health Assembly</i>

WHO *World Health Organization*

RESUMO

Acredita-se que a hanseníase é a doença infectocontagiosa mais antiga da humanidade e até os dias de hoje, é um problema público de saúde mundial. Segundo a OMS, 161 países relataram dados sobre a doença em 2019 e o total de novos casos atingiu 202.256. O Brasil, país englobado no grupo prioritário de controle à doença, no mesmo ano, notificou 27.864 incidentes, sendo destes 2.351 classificados com Grau de Incapacidade Física - GIF 2 e 1.545 casos infantis. Uma vez que o diagnóstico da enfermidade é exclusivamente clínico e que os exames laboratoriais hoje existentes servem apenas como instrumento de auxílio, é importante desenvolver uma ferramenta diagnóstica que seja menos invasiva, pouco onerosa para os cofres públicos e que possibilite a confirmação do quadro clínico relatado pelo médico. Este estudo propõe a detecção do *Mycobacterium leprae* nos diferentes componentes do sangue total periférico, por meio da Reação em Cadeia de Polimerase em tempo real e a quantificação da bactéria. A população de estudo consistiu nos pacientes com suspeita de hanseníase, atendidos no Hospital Universitário de Brasília, compreendidos no período de um ano entre junho de 2020 e junho de 2021, totalizando 111 pacientes, sendo 55 diagnosticados positivamente para hanseníase, conforme orientações do Ministério da Saúde, e 56 suspeitos, mas não diagnosticados, como sendo controles. Após a obtenção do soro, plasma, concentrado de hemácias e células mononucleares do sangue periférico, os mesmos foram submetidos à extração de DNA por meio de kit comercial Purelink Genomic da ThermoFisher Scientific. Para a padronização dos controles positivos e reação da curva padrão de quantificação, foi confeccionado o alvo genético RLEP do genoma da micobactéria. A qPCR foi feita de forma qualitativa e quantitativa utilizando os *primers* RLEPBR F -5' – CTTGCACCATTTCTGCCGCT – 3' e RLEPBR R – 5' – TGCGCTAGAAGGTTGCCGTA – 3'. Dos participantes diagnosticados clinicamente com hanseníase, 52,73% eram do sexo feminino, a idade média foi de 44,33 anos e nenhum era contactante. Dos participantes do grupo controle, 50% eram do sexo masculino, a idade média foi de 45,11 e 48 eram contactantes. Pela classificação do quadro clínico, 1 participante era indeterminado, 5 tuberculóide-tuberculóide, 8 dimorfo-tuberculóide, 18 dimorfo-dimorfo, 11 dimorfo-virchowiana, e 12 virchowiana-virchowiana. Quanto ao GIF, 17 pacientes eram GIF 1, 15 GIF 2 e 23 GIF 0. Quanto aos resultados biomoleculares, a sensibilidade foi baixa correspondendo a 11,54% no soro, 7,31% no plasma, 9,26% nas células mononucleares do sangue periférico, 9,80% no concentrado de hemácias e na baciloscopia de 38,18%. Entre os pacientes paucibacilares, a maior sensibilidade foi para o soro e para o concentrado de hemácias e entre os multibacilares a maior sensibilidade foi encontrada no soro. A baixa sensibilidade encontrada nos resultados indica que o sangue periférico não é um material consistente para diagnosticar a hanseníase.

Palavras-chave: *Mycobacterium leprae*, qPCR, hanseníase, sensibilidade, quantificação, saúde pública

ABSTRACT

It is believed that leprosy is the oldest infectious and contagious disease of the humanity and until today it is a public health problem worldwide. According to WHO, 161 countries reported data on the disease in 2019 and the total of new cases reached 202.256. Brazil, a country included in the priority group for the disease control, in the same year reported 27.864 incidents, of which 2.351 were classified as Disability Degree 2 and 1.545 were child cases. Since the diagnosis of the disease is exclusively clinical and the laboratory tests that exist today are used only as an aid tool, it is important to develop a less invasive tool, a less costly for the public coffers and that allows the confirmation of the clinical condition reported by the doctor. This study proposes the detection and quantification of *Mycobacterium leprae* in the different components of peripheral whole blood through real-time Polymerase Chain Reaction (qPCR). The study population consisted of leprosy suspected patients, treated at the University Hospital of Brasília, during the one-year period between June 2000 and June 2021, totaling 111 patients, of which 55 were positively diagnosed and 56 were controls. After obtaining the serum, plasma, red blood cells and peripheral blood mononuclear cells, they were subjected to DNA extraction using a commercial Purelink Genomic kit from ThermoFisher. For the standarization of the positive controls and the reaction of the quantification standard curve, the RLEP genetic target of the mycobacterial genome was made. The qPCR was performed qualitatively and quantitatively using the primers RLEPBR F -5' – CTTGCACCATTTCTGCCGCT – 3' e RLEPBR R – 5' – TGCGCTAGAAGGTTGCCGTA – 3'. Of the participants clinically diagnosed with leprosy, 52,73% were female, the average age was 44.33 years and none were household contacts. Of the control participants, 50% were male, the average age was 45.11 and 48 were household contacts. By the classification of the clinical condition, 1 participant was indeterminate, 5 were tuberculoid, 8 borderline-tuberculoid, 18 borderline, 11 borderline-lepromatous and 12 lepromatous. As for the disability degree, 17 were classified as degree 1, 15 patients as degree 2 and 23 with none degree. As for the biomolecular results, the sensitivity was low corresponding to 11.54% in serum, 7.31% in plasma, 9.26% in peripheral blood mononuclear cells, 9.80% in red blood cells and 38.18% in smear microscopy. Among paucibacillary patients, the highest sensitivity was found in both serum and red blood cells and among multibacillary patients the highest sensitivity was found in serum. The low sensitivity found in the results suggests that peripheral blood is not a consistent material for diagnosing leprosy.

Keywords: *Mycobacterium leprae*, qPCR, leprosy, sensibility, quantification, public health

SUMÁRIO

1. Introdução.....	16
1.1 Histórico da Hanseníase	16
1.2 Hanseníase no Brasil.....	22
1.3 Distribuição Geográfica da Hanseníase	26
1.3.1 Distribuição Geográfica da Hanseníase no mundo.....	26
1.3.2 Distribuição Geográfica da Hanseníase no Brasil	27
1.4 <i>Mycobacterium leprae</i>	30
1.5 Aspectos Clínicos da Hanseníase	32
1.6 Tratamento	35
2. Justificativa.....	36
3. Objetivos.....	38
3.1 Objetivo Geral	38
3.2 Objetivos Específicos	38
4. Metodologia.....	39
4.1 População.....	39
4.2. Padrão de referência (Padrão ouro)	39
4.3 Critérios de exclusão.....	39
4.4 Procedimentos.....	40
4.4.1 Coleta das amostras de sangue:	40
4.4.2 Procedimentos da Separação:	40
4.4.3 Extração do DNA:	41
4.4.4 Detecção do DNA do <i>M. leprae</i> :	42
4.5 Ética	45
4.6 Tamanho amostral:	46
4.7. Análise estatística:	46

5. Resultados.....	47
6. Discussão.....	53
7. Conclusão	60
8. Referências Bibliográficas	61

1. INTRODUÇÃO

1.1 Histórico da Hanseníase

A hanseníase é uma enfermidade que assolou várias populações e que, por falta de entendimento, era confundida com outras doenças venéreas e de pele, o que causava preconceito com seu portador, levando-o até mesmo ao seu isolamento (CAVALIERE, 2021). É provável que a doença tenha se originado no Leste, uma vez que foi lá que a primeira descrição autêntica, de suas diversas formas, foi encontrada. Escritas antigas descrevem a existência da hanseníase em 300 a.C., na China, Índia e Egito. Um documento escrito na Índia, por volta de 600 a.C., nomeou a enfermidade por “Kushtka”, derivado do sânscrito “Kushnati” que significa “devorar”. Um dos mais clássicos médicos da China, o Nei Jing datado de 400 a.C., descreve a hanseníase sob a denominação de “Da Feng” e uma referência similar aparece da mesma época em achados japoneses. Restos de esqueletos de uma múmia, do segundo século a.C., com vestígios da doença, foram encontrados no Egito (WHO, 1996).

Acredita-se que a doença foi introduzida na Europa, por meio da Grécia, pelos soldados de Alexandre O Grande, após retornarem da conquista da Índia em 326 a.C., pelo rio Indo. Da Grécia, a hanseníase espalhou-se por todo o mediterrâneo, sendo os romanos os portadores da enfermidade ao ocidente europeu (MONOT, 2021).

Segundo Trautman (1984), alguns historiadores especulam que soldados do exército persa de Darius foram a porta de entrada da hanseníase na Grécia durante o século IX a.C. e que as tropas de Alexandre tenham levado a doença da Índia para o Egito, um século depois. Alguns acadêmicos indicam que trabalhos de Aristóteles, datados de 345 a.C., e de Hipócrates, o qual o precede, descrevem a doença, mas o consenso dos estudiosos sobre a hanseníase é de que nenhum deles tivesse conhecimento sobre a enfermidade.

Na época da vivência de Cristo, a Bíblia descreve em Levítico, capítulo 13, o aparecimento de manchas brancas na pele que, analisadas por um sacerdote, determinaria se o portador seria considerado imundo ou se seria encerrado por alguns dias para ser examinado novamente (BÍBLIA, 2021). Segundo Chuoraqui (1978), citado por Cunha (2002, p.236):

“Os sacerdotes tinham a missão de diagnosticar e tratar a doença, visto que se relacionava com uma fraqueza oriunda de pecados e devia ser combatida através de sacrifícios, purificações e rituais que incluíam desde a queima de objetos pessoais até o contato direto do doente com o que se julgava puro, assim como um pássaro, a manjerona, a água ou a madeira de cedro”.

Conforme Pinto (1995), a hanseníase se instalou como endemia na Europa apenas nos séculos VI e VII. A Igreja e a Realeza, detentores do poder à época, não tardaram em demonstrar preocupação com a doença e produziram um Concílio de 549 a.D. e um texto legislativo lombardo datado de 635-652 a.D.. É por consequência das cruzadas que a estabilidade da enfermidade sofre desequilíbrio e acaba ocorrendo um aumento em sua incidência. Em virtude dos grandes deslocamentos populacionais, com o intuito de conquistar as terras do Oriente Médio, é que a hanseníase acaba se espalhando pelos povos islâmicos.

A menção da hanseníase no Alcorão é desconhecida e, diferentemente da Bíblia, que referenciava a doença como sendo castigo ou pecado sexual e como consequência era imposto o isolamento, o livro islâmico pregava que os seguidores da religião islâmica deveriam cuidar dos doentes. Sendo assim, existe a indicação de que os muçulmanos não cometeram práticas de exclusão e estigmatização para com os acometidos pela hanseníase. Pelo contrário, a oportunidade de cuidar dos hansenianos permitiu que os médicos muçulmanos descobrissem as placas de insensibilidade na pele, levando a uma descrição mais detalhada sobre a doença na Idade Média (MACIEL, 2018).

Na Espanha, a partir do século XI, ocorreram as invasões árabes, às quais foi imputada a propagação da hanseníase pelas regiões de Levante, Murcia, Albacete, Andalucía e Extremadura. A doença era combatida, mas sem hospitalização nem isolamento dos pacientes (ECHEVARRÍA, 2012). O primeiro centro de confinamento para hansenianos do país foi instaurado em 1037, situado em Valência e, em 1284, Don Sancho IV decretou que os acometidos pela hanseníase deveriam permanecer isolados. Os Reis Católicos, por volta de 1477, criaram “*Los Alcaldes de La Lepra*”, um grupo cujo objetivo era o de assumir as prerrogativas, antes designadas aos sacerdotes e juízes eclesiásticos, de determinar o isolamento dos portadores da hanseníase para impedir o crescimento da doença (GARGANTILLA, 2011).

Segundo Souza-Araújo (1946), a hanseníase se alastrou de tal maneira na França, que no século XIII, a contagem de doentes chegava a um total de cem mil, os quais se encontravam abrigados em 1503 gafarias criadas entre bispos, comunas, senhores e reis. Nos dois séculos subsequentes, havia no país mais de 750 leprosários distribuídos desde a Bretanha até a Normandia. Acredita-se que no século XVI, quando ocorreu o período de conquistas e navegação francesa, vários portadores da hanseníase espalharam a doença para Portugal, Canadá e o sul dos Estados Unidos.

A propagação do mal de Lázaro ocorreu de forma excepcional em Portugal. Devido à sua abstenção no envio de portugueses no alistamento para as Cruzadas, graças a uma ordem do papa Pascoal II, e por ter suas fronteiras limitadas por mar e estáveis com os outros territórios, a enfermidade teve sua disseminação limitada, no início do século X (DORIA, 2014). No entanto, o trânsito de enfermos dentro do território europeu não isentou o país do contágio e, anos depois, o rei Afonso Henriques ordenou a construção dos primeiros leprosários portugueses. Mesmo que esses estabelecimentos tivessem sido criados pela coroa, os regulamentos eram locais, não havendo medidas obrigatórias de isolamento, propiciando que os doentes vagassem pelas ruas para pedir esmolas. Foi apenas em 1505 que as câmaras municipais tornaram o isolamento compulsório em vilarejos leprosos e casas privadas (BALA, 2018).

De acordo com Aguilar (2003), as origens da hanseníase na América são bastante discutidas. Alguns autores asseguram que a doença é autóctone, outros preferem atribuí-las aos colonizadores europeus e outros acusam os africanos, árabes, judeus e chineses. Não obstante, a hanseníase aparece nas Américas de forma bem precoce, levando à implementação em 1514, de uma instituição de confinamento em Cartagena, na Colômbia. A maneira com que a doença é vista na América Colonial diverge da tendência de estigmatização da tradição judeu-cristã, quebrando assim uma continuidade do período medieval. Mesmo com a propensão de discriminação social, esta não ocorre em sua totalidade.

A etiologia da hanseníase ficou conhecida em 1873 quando Gerhard Henrik Armauer Hansen, um médico norueguês, descobriu o agente causador da doença: o bacilo *Mycobacterium leprae*. Essa descoberta foi a primeira evidência a apoiar a teoria de que a doença tinha uma etiologia contagiosa e infecciosa e reafirmou a necessidade de isolamento dos hansenianos, acreditando ser um método eficiente para impedir a disseminação da bactéria (HORWITZ, 2006).

Conforme Pandya (2003), a Primeira Conferência Internacional sobre hanseníase sediada em Berlim, em 1897, foi a primeira tentativa mundial para se tratar sobre a doença. No evento, Hansen reforçou suas propostas: a doença podia ser prevenida por meio de isolamento; o sistema compulsório de registro, controle e segregação adotado na Noruega era recomendado; e que as autoridades sanitárias de cada país deveriam desenvolver regras de acordo com suas particularidades sociais, com a permissão de seus governos. Apesar de vários especialistas no assunto considerarem as recomendações do norueguês como sendo medidas cruciais para o combate da enfermidade, outra vertente defendida pelo renomado

dermatologista francês, Ernest Besnier, reconhecia que a hanseníase era contagiosa, mas discordava quanto ao isolamento dos pacientes. Para ele, a notificação e simples precauções tomadas pelas famílias de hansenianos, já seriam suficientes como processo de profilaxia.

Anteriormente à era dos antibióticos, a hanseníase era tratada com o óleo Chaulmoogra da castanha *Hydnocarpus wightiana*, com sucesso limitado. No início dos anos 40, começou a era moderna no tratamento da doença, quando o Dr. Faget do National Hansen's Disease Center em Carville, nos Estados Unidos, demonstrou benefícios na terapia com Sulfona. Já no final da mesma década, estudos comprovando a toxicidade da substância levaram os médicos a estabelecerem tratamento utilizando a Dapsona (BENNETT, 2008).

No 5º “Congresso Internacional de Hanseníase”, sediado em Havana – Cuba, no ano de 1948, os princípios da terapia com Sulfoterapia, como doses e formas de administração, foram discutidos. O uso da Dapsona tinha diversas vantagens à época, e seu baixo custo, a simplicidade na administração (oral) e seu uso único semanal, ou de duas doses, tornaram-na a melhor opção para tratamento em grande escala (WHO, 1953).

Efeitos colaterais, da então terapia aceita, como anemia, psicose, dermatite esfoliativa e eritemas nodosos levaram ao questionamento sobre a toxicidade da droga, que teve como consequência a diminuição na quantidade das doses. No entanto, não demorou em que se demonstrassem dados de pacientes cujos resultados na diminuição em 25% da administração da Dapsona, em seus tratamentos, não tinham diferença com pacientes cujo tratamento era de 100% do total de doses, corroborando com a ideia de que, além da Dapsona ser tóxica, a droga não colaborava significativamente na diminuição global da enfermidade (WHO, 1960).

Considerado o terceiro maior evento dentro da história da hanseníase, em 1960, Shepard conseguiu, por meio de lavagens nasais com presença de bacilos álcool-ácido resistentes, o crescimento da micobactéria na pata de camundongos (SHEPARD, 1960). Essa descoberta foi um marco, uma vez que permitiu testar a sensibilidade e resistência do bacilo às drogas já existentes e abriu a possibilidade para que novas fossem testadas.

Nos anos subsequentes, diversas substâncias foram testadas no combate à bactéria. Em 1964, Shepard & Chang (1964) fizeram um estudo experimental em que onze drogas diferentes foram testadas para verificar a supressão da atividade do bacilo em ratos infectados. A multiplicação de *M. leprae* foi completamente suprimida por Sulfona, B663 (um composto rimino), isoniacida, ácido para-aminosalicílico e estreptomicina. Resultados parciais foram obtidos ao se utilizar cicloserina e amitiozona e nenhum resultado foi alcançado com

difeniltioureia, etambutol, dietil-ditiolisofalato e pirazinamida. Rees *et al.* (1970) fizeram ensaios quimioterápicos com a rifampicina utilizando a pata de camundongos infectados pelo *Mycobacterium leprae*. Os estudos comprovaram a eficácia da droga, estabelecendo não apenas a sua atividade anti-hansênica, mas também a capacidade de proporcionar uma grande queda no índice morfológico, comprovando a ação bactericida da substância.

Não levou muito tempo para que se observasse que, mesmo após vários anos de melhoria clínica e bacteriológica, alguns pacientes cujo tratamento regular era feito com dapsona não mostravam evolução. Foi então que, em 1977, a resistência das micobactérias à droga foi documentada pela primeira vez (PEARSON, 1981).

Segundo Noussitou & Sansarricq (1974) a Organização Mundial da Saúde priorizou, portanto, a promoção de atividades no setor de colaboração e pesquisa da quimioterapia contra a hanseníase, envolvendo ensaios clínicos e laboratoriais de drogas que pudessem reduzir drasticamente a incidência da doença. Sendo assim, iniciou-se a corrida para encontrar um medicamento que tivesse as seguintes propriedades:

- Efetividade em suprimir rapidamente a atividade clínica e bacteriológica na grande maioria dos casos;

- Boa tolerância, excluindo efeitos adversos sérios e mantendo as reações induzidas da droga no mínimo possível;

- Inexistência de resistência ou desenvolvimento insignificante da bactéria no curso do tratamento, garantindo resultados, em longo prazo, e uma baixa proporção de reincidência;

- Simplicidade na administração da droga, especialmente para utilizá-la em tratamento de grande escala.

Em abril de 1976, O “Programa de Investigação em Quimioterapia da Lepra – THELEP” foi criado com o objetivo de desenvolver um protocolo padrão para ensaios clínicos controlados de quimioterapias combinadas (poliquimioterapia), entre pacientes acometidos pelo *M. leprae*. No início dos anos 80 a Organização Mundial da Saúde recomendou o uso da poliquimioterapia para o tratamento da hanseníase e seu grupo de estudos desenvolveu dois regimes de multidrogas:

1. Para a hanseníase multibacilar:

- 1.1 Pelo menos dois anos de duração ou até alcançar negatividade baciloscópic, quando possível;

- 1.2 Recomendação padrão de:

- Rifampicina supervisionada de 600 mg, mensal

- Dapsona auto-administrada diariamente de 100 mg
- Clofazimina supervisionada de 300 mg uma vez por mês e 50 mg auto-administrada diariamente

2. Para a hanseníase paucibacilar:

2.1 Recomendação padrão de:

- Rifampicina de 600 mg, mensal, por seis meses;
- Dapsona de 100 mg diariamente, por seis meses. (WHO, 1982).

Após a introdução da poliquimioterapia para a hanseníase, em meados dos anos 80, a prevalência global diminuiu em 90%, de 5,3 milhões de casos, em 1985, para 192.713 casos, ao final de 2017 (RICCÒ, 2019).

A implementação da poliquimioterapia foi feita de forma gradativa em um período compreendido entre 1982 a 1985 e que abrangeu menos de 1% da cobertura da doença. Subsequentemente foi aplicado em países endêmicos e a cobertura geográfica começou a aumentar significativamente até chegar aos 50%, ao final de 1992 (WHO, 2004).

De acordo com o relatório WHA 44.9 da 40ª Assembleia Mundial de Saúde (WHO, 1991), a Organização Mundial da Saúde declarou seu comprometimento para continuar promovendo todas as medidas de controle existentes para manter a eliminação global da hanseníase como um problema de saúde pública, até o ano de 2000. A Instituição também incentiva os estados, em que a doença é endêmica, a permanecer ou aumentar sua contribuição para o fim da doença; assegurar que a cobertura com poliquimioterapia permaneça no mais alto nível; fortalecer políticas para identificar hansenianos e coordenar fontes financeiras e técnicas para o controle da hanseníase disponibilizadas por organizações internacionais e não governamentais para serem utilizadas da melhor forma possível, entre outros.

O número global registrado de casos de hanseníase para tratamento era de 218.065, em 2008. Comparado aos dados de 2007, 258.133 casos, esse número sofreu redução significativa. A Estratégia Global Aprimorada para Redução Adicional da Carga Da Hanseníase de 2010, que tem base nos mesmos princípios da política mundial de controle da Hanseníase – detecção oportuna de novos casos e no tratamento com quimioterapia eficaz – e cujo objetivo principal permanece sendo a garantia de atendimento de qualidade aos acometidos pela doença, propôs que a taxa de novos casos detentores do grau 2 de incapacidade (GIF) por cada 100.000 habitantes fosse reduzida em pelo menos 35% até o final de 2015, em comparação com a linha base relatada no final de 2010 (PAHO, 2010).

Ao final de 2014, 213.899 era o número de pacientes recém-diagnosticados com a doença; dos casos notificados, 94% pertencia a moradores de 13 países entre os quais constaram Brasil, Índia, Nigéria e Filipinas; 175.554 pacientes estavam em tratamento final; 14.110 dos casos eram pertencentes a GIF 2; 8,8% eram crianças e 36% mulheres. Propôs-se para 2020, portanto, que ocorresse a eliminação de casos infantis de GIF2, a redução total de casos de GIF2 a menos de um caso por milhão de habitantes e a abolição de leis que permitissem a discriminação por hanseníase em todos os países (OMS, 2016).

Segundo a OMS (2021), um total de 161 países relatou dados sobre a doença em 2019. Os novos casos de hanseníase contabilizaram 202.256 em 118 países, sendo 23 países prioritários, dos quais 79% estavam no Brasil, Índia e Indonésia. A quantidade de pacientes portadores do GIF2 chegou a 10.816, reportando uma diminuição comparando-se aos dados do relatório anterior, mas houve um aumento no total de crianças e mulheres infectadas correspondendo, respectivamente, a 7,4% e 38,9%. Estima-se que para 2030, 120 países apresentem zero casos novos autóctones, que o número de casos novos por ano seja reduzido em 70% e que haja redução de 90%, tanto na taxa por milhão de habitantes de novos casos com GIF2, quanto na taxa por milhão de crianças de novos casos de hanseníase.

1.2 Hanseníase no Brasil

Para indagar sobre a origem da hanseníase no Brasil é necessário se questionar sobre as três etnias que primeiramente povoaram o país. A doença já se encontrava em território brasileiro, ela foi trazida pelos colonizadores europeus ou essa incumbência coube aos escravos africanos?

De acordo com tratado sobre a doença (BRASIL, 1950), os historiadores acreditam que a hanseníase não era uma enfermidade que acompanhou os indígenas. Estudos literários apontam para a inexistência de algum termo, na língua nativa, que se referisse à doença, incongruente às populações acometidas pela hanseníase. Por sua vez, os colonizadores europeus nunca comentaram em seus relatos de viagens sobre a presença de doenças venéreas nas terras descobertas. Muito pelo contrário, em seus registros, os missionários descreviam as novas terras como sendo um lugar sadio para se viver, onde as pessoas morriam apenas pela idade avançada.

A hipótese da entrada da Hanseníase pela comercialização de escravos negros provindos da África não teve sustentação visto que a negociação de africanos doentes ou com

lesões cutâneas era difícil. No entanto, acredita-se que os escravos tiveram grande papel na disseminação da doença no país (OPROMOLLA, 2000).

Conforme Garcia (2001):

“Terra, em 1926, ainda questionava a origem da lepra no Brasil. Não se sabia se já existia antes da colonização ou se foi trazida pelos colonizadores, embora não se encontrasse indícios da doença entre os habitantes pré-colonizadores. A vinda da lepra para o Brasil coincide com outras endemias como varíola e a febre amarela. Em 1600, a doença já existia no Rio de Janeiro. Acredita o autor que a lepra tenha sido trazida pelos colonizadores portugueses”.

Os primeiros hospitais destinados ao tratamento de pacientes com hanseníase datam do século XVIII. O primeiro leprosário brasileiro foi instalado em Recife no ano de 1713, seguido do Rio de Janeiro em 1740, 1771 em Minas Gerais, 1787 na Bahia, 1796 em Pernambuco, em São Paulo, no ano de 1802 e 1908 em Manaus (MARZLIAK, 2008).

Com o desenvolvimento das atividades agrícolas, o território brasileiro foi explorado, novas terras foram colonizadas e a mão-de-obra para agricultura se fez necessária. Dessa forma, a migração de vários enfermos ocorreu e a hanseníase chegou às cidades de maior interesse político e econômico. Pernambuco, o principal centro açucareiro, foi o foco da disseminação da hanseníase para a Paraíba e Alagoas que, futuramente, incentivaram o desenvolvimento agrícola do Ceará, Maranhão, Pará e Amazonas. Minas Gerais, Mato Grosso e Goiás tiveram como introdução da doença o deslocamento dos bandeirantes provenientes de São Paulo, os quais também chegaram aos estados do Sul (EIDT, 2004).

No ano de 1904, pelo decreto 5.156, o presidente da República dos Estados Unidos do Brasil decreta a necessidade compulsória da notificação de moléstias infecciosas, nas quais a hanseníase é abrangida (BRASIL, 1904). Quatorze anos depois, o presidente Venceslau Brás autoriza a criação de comissões médicas que ficariam a cargo da profilaxia rural (BRASIL, 1918) e no mandato seguinte, o presidente Epitácio Lindolfo da Silva Pessoa cria o Departamento Nacional de Saúde Pública, que fica responsável pelo serviço de prevenção à hanseníase (BRASIL, 1920).

As décadas seguintes, no Brasil, se caracterizaram pela implementação de diversas ações voltadas ao combate da hanseníase. Em São Paulo instituiu-se a “Fundação da Federação das Sociedades de Assistência aos Lázaros e Defesa contra a Lepra”; em Belém fundou-se a “Liga contra a Lepra” e no país, criou-se o “Selo de Educação” com o intuito de arrecadação de fundos para a campanha nacional contra a hanseníase.

A Portaria Ministerial 165 de 1976 veio como instrumento de inclusão dos hanseníacos à sociedade e com o intuito de abolir terminologias que fizessem apologia à hanseníase, para desmistificar a necessidade de segregação e isolamento dos acometidos pela bactéria. A prática de distanciamento dos filhos de pais em tratamento ambulatorial foi extinta para que a unidade familiar fosse preservada. A portaria promovia o controle da hanseníase por meio de educação em saúde, a aplicação da vacina BCG, ações para identificação e tratamento dos pacientes (BRASIL, 1976).

Após um longo período de discriminação e preconceito, os anos 80 vieram como um marco na vida dos enfermos. A poliquimioterapia, apoiada internacionalmente pela OMS, e o fim da hospitalização obrigatória dos enfermos deram início a uma nova era. Os pacientes começaram a sua jornada de aceitação pública na sociedade.

Conforme Ferreira (2019), em 1988, o Ministério da Saúde realiza a primeira análise sobre o uso da poliquimioterapia no país e verifica alta aceitação terapêutica, a fácil implementação da mesma e a necessidade de incentivo ao novo tratamento. O Plano de Emergência Nacional é instaurado, com o intuito de analisar a incidência e prevalência da doença no país, levando a seccionar o Brasil para a eficiente distribuição de recursos nas regiões prioritárias (GREGÓRIO, 1999).

Segundo FIOCRUZ (2010), o neologismo hanseníase ganhou força legal apenas em 1995, quando o presidente da República sancionou a lei proibindo o termo Lepra e seus derivados. No primeiro mandato do governo de Luís Inácio Lula da Silva, 2003, a gerência técnica de

Dermatologia Sanitária foi extinta e substituída pelo “Programa ao Controle da Hanseníase”. Ainda em seu governo, o presidente promulgou lei que dispunha sobre a concessão de pensão especial às pessoas atingidas pela hanseníase que foram submetidas a isolamento e internação compulsórios.

Desde 2003 a 2016, o coeficiente de detecção de novos casos diminuiu significativamente no Brasil. No entanto, em 2016, a taxa de detecção recomendada pelo Ministério da Saúde foi mais alta nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste sendo a doença considerada controlada apenas nas regiões Sul e Sudeste em que havia 2.84 e 4.17 casos por 100.000 habitantes, respectivamente. A região central e norte e os estados de Mato Grosso, Tocantins e Maranhão apresentaram níveis hiperendêmicos, com 39.99 casos a cada 100.000 habitantes (MARCIANO *et al.*, 2018).

Após o lançamento da Estratégia Global para a Hanseníase 2016-2020 da OMS, o Brasil elabora a Estratégia Nacional para Enfrentamento da Hanseníase 2019-2022 com o propósito de:

“... apresentar metodologias diferenciadas frente aos distintos padrões de endemicidade existentes no país, de forma que se possa alcançar maior cobertura e melhor desempenho de ações para o controle da doença. Portanto, a Estratégia Nacional visa subsidiar o planejamento das ações nas três esferas governamentais”.

Sendo assim, seu principal objetivo é de redução da carga da doença no país, baseada no fortalecimento da gestão do Programa, enfrentamento da enfermidade e suas complicações e a promoção da inclusão social por meio da luta contra o preconceito e a desonra (BRASIL, 2020).

Conforme a OMS (WHO, 2021), em 2020 o Brasil teve:

Tabela 1 - Dados brasileiros sobre a Hanseníase em 2020

DADOS	NÚMEROS
Número Total de Novos Casos de Hanseníase	17.979
Taxa de Detecção de Novos Casos de Hanseníase por 1.000.000 de habitantes	84.583
Número de casos registrados de Hanseníase em tratamento (Prevalência)	22.872
Número de novos casos de Hanseníase com Grau de Incapacidade 2	1.504
Número de novos casos infantis (> 15 anos) de Hanseníase	878

Fonte: Elaborada pela autora com base em WHO (2021).

1.3 Distribuição Geográfica da Hanseníase

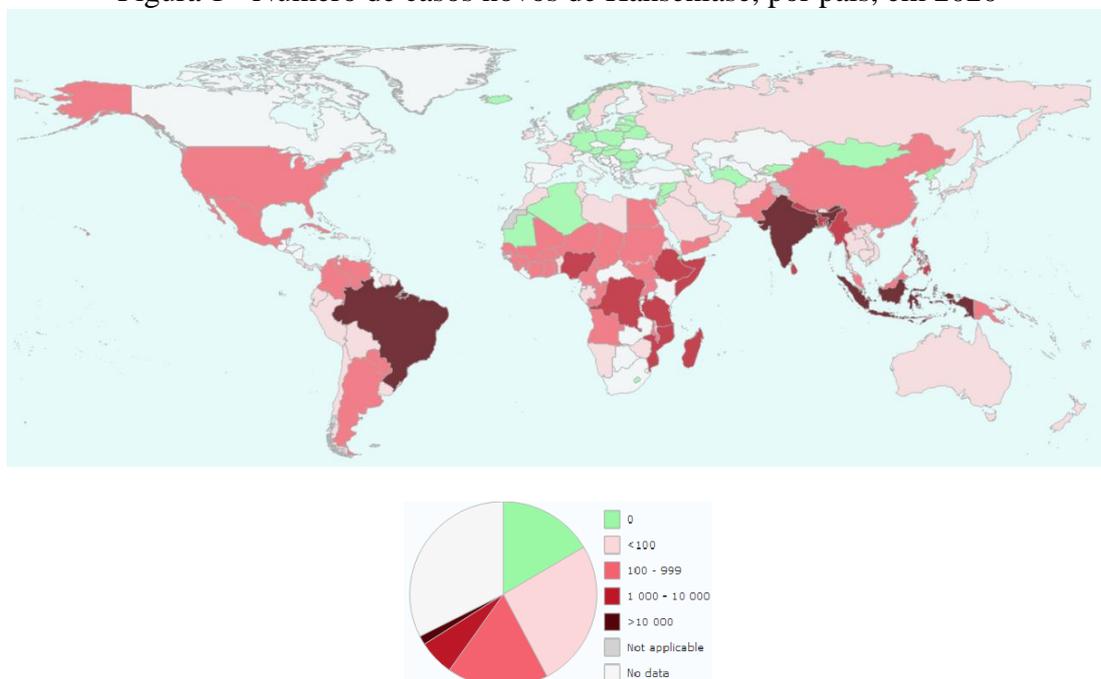
1.3.1 Distribuição Geográfica da Hanseníase no mundo

Segundo os dados da OMS (WHO, 2021), referentes ao ano de 2020, a quantidade de novos casos de hanseníase no mundo totalizou 127.506. A maior concentração foi no Sudeste Asiático, contemplando 84.818 casos; seguida das Américas com 19.195; a África com 16.690; o Leste Mediterrâneo abrangendo 4.077, o Oeste Pacífico com 2.699 e a região com o menor número de casos, a Europa, com 27 casos totais.

Ainda sobre as estatísticas apresentadas pela OMS, apenas três países no mundo detêm uma concentração de mais de 10.000 novos casos da doença e são eles: Índia (65.147 casos); Brasil (17.979) e Indonésia (11.173). Países africanos como Moçambique, Nigéria, Etiópia e Somália e alguns asiáticos como Bangladesh, Nepal, Myanmar se encontram categorizados entre os países com número de novos casos entre 1.000 e 10.000. Países vizinhos ao Brasil como Argentina, Colômbia, Venezuela e Paraguai, além de grandes nações como Estados Unidos e China estão entre os Estados que englobam dentre 100 a 999 casos.

Dados de números com menos de 100 casos por país são encontrados, por exemplo, na Austrália, Rússia, França, Namíbia, Panamá, Chile, Uruguai, Tailândia, Japão e Irlanda. Já a grande maioria de países que não registraram nenhum caso novo de Hanseníase encontra-se na Europa. Não obstante, a Mongólia, Mauritânia, Turcomenistão, a Coreia do Sul, a Argélia e Líbano também pertencem a este grupo. Ainda existem muitas regiões do globo em que informações não foram fornecidas e 62 é o número total de países que não apresentaram dados (Figura 1).

Figura 1 - Número de casos novos de Hanseníase, por país, em 2020



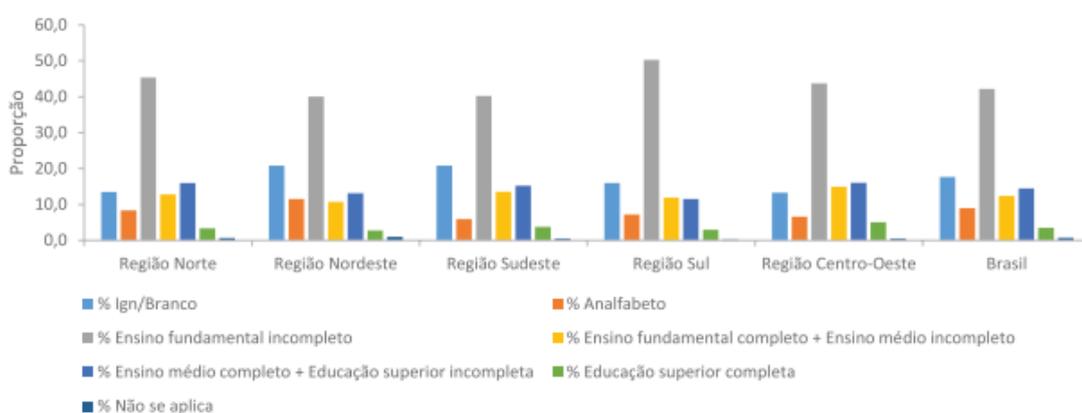
Fonte: WHO (2021).

1.3.2 Distribuição Geográfica da Hanseníase no Brasil

A distribuição geográfica da Hanseníase no Brasil é desigual e a doença persiste em regiões com maiores níveis de pobreza e desnutrição, mostrando uma relação próxima com precárias condições de vida, baixo nível de educação, desigualdade social e com movimentos migratórios (SILVA *et al.*, 2017).

Confirmando a constatação acima, os dados coletados entre 2015 e 2019 demonstram que indivíduos com ensino fundamental incompleto são os mais afetados, constituindo 42,2% do total, seguido de indivíduos com ensino médio completo e ensino superior incompleto (Figura 2). Ao se analisar as estatísticas de escolaridade por regiões, verifica-se que a população com menos nível de escolaridade é a mais atingida no país, sendo o Nordeste a que tem maior concentração de casos (BRASIL, 2021c).

Figura 2 - Proporção de casos novos de hanseníase segundo escolaridade e região de residência



Fonte: Brasil (2021c).

A região Nordeste é a que concentra o maior número de casos novos do país com 132,7 mil pacientes, o equivalente a 43% do total dos casos, seguida da região Centro-Oeste com 20% e da região Norte com 19%. As regiões Sudeste e Sul detêm os menores índices abrangendo 15% e 4% do total de casos, respectivamente (Figura 3). Acredita-se que essa concentração de casos ocorra nas regiões em que as condições socioeconômicas são mais precárias: baixo nível de educação, dificuldade de acesso a serviços de saúde e aglomerações, seja pela necessidade de morarem várias pessoas embaixo de um mesmo teto, seja pela lotação dos meios públicos de transporte (GANDRA, 2021).

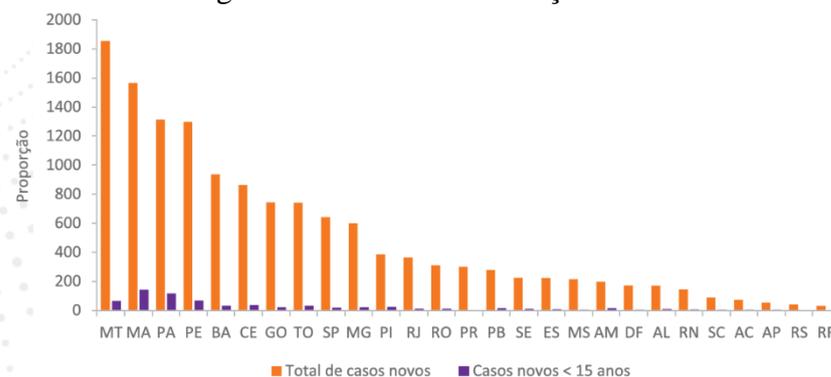
Figura 3 - Mapa de Casos de Hanseníase no Brasil



Fonte: Gandra (2021).

Conforme a Figura 4 os dados expostos no Boletim de Hanseníase de 2021 tiveram uma drástica diminuição, a qual deve ser imputada à pandemia da COVID-19, resultado da piora de subnotificação de casos. Sendo assim, em 2020, foram diagnosticados 13.807 novos casos da doença, dos quais 672 foram em menores de 15 anos. O Estado com o maior número de novos casos é o Mato Grosso com 13,42%, seguido do Maranhão com 11,33% e Pará com 9,50%. Roraima é a Unidade da Federação com menos casos a cada 100.000 habitantes, seguido do Estado do Rio do Grande do Sul que diagnosticou apenas 40 casos (BRASIL, 2021c).

Figura 4 - Número Total de casos novos de Hanseníase e em menores de 15 anos segundo Unidade da Federação de residência



Fonte: Brasil (2021c).

1.4 *Mycobacterium leprae*

De acordo com o ITIS – Integrated Taxonomic Information System (2021), o organismo *Mycobacterium leprae* pertence ao reino Monera, filo *Actinobacteria*, Subclasse *Actinobacteridae*, ordem *Actinomycetales* e subordem *Corynebacteriidae*. Foi em 1880 que o norueguês Hansen identificou pela primeira vez a bactéria, mas foi apenas em 1896 que Lehmann e Neumann categorizaram seu gênero. Um ano depois, Chester determinou a família: *Mycobacteriaceae*.

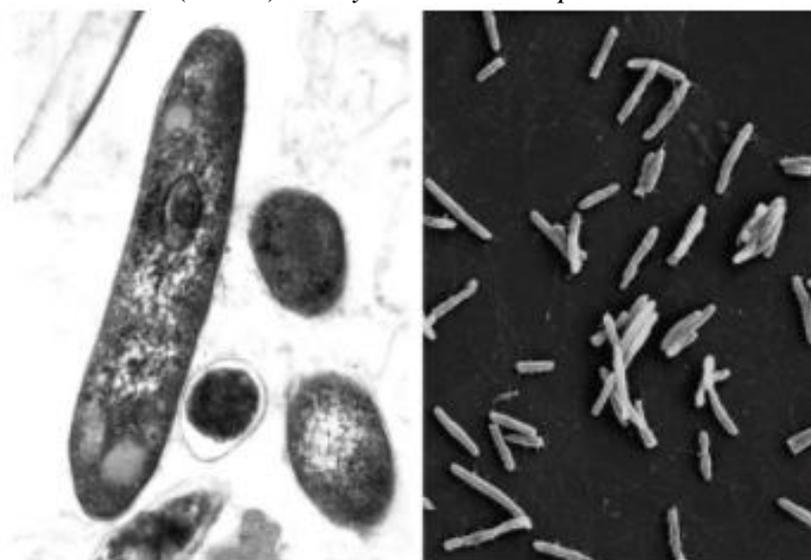
Geneticamente, o genoma desta bactéria se caracteriza como sendo o menor dentre as espécies do mesmo gênero. É composto por 1614 genes codificadores de proteínas e 1300 pseudogenes. Essa diminuta evolução é uma marca de bactérias que mudaram seu estilo de vida livre para parasitas obrigatórios. Devido ao seu demorado ciclo de 14 dias e à falta de transferência genética horizontal, o genoma de *M. leprae* é altamente conservado, possuindo menos de 300 polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), observados entre cepas distantemente relacionadas (BENJAK *et al.*, 2018).

Segundo Blevins *et al.* (2020), comparando-se os genomas das linhagens indiana e brasileira, foram encontrados 5 SNPs. Destes, três foram utilizados para análises filogenéticas que permitiram a identificação de três tipos diferentes de *M. leprae* e, posteriormente, de

outros subtipos com associações geográficas. Nesse sentido, foi possível identificar seis ramos diferentes sendo numerados entre 0 e 5: 0 principalmente da Ásia Oriental, 1 principalmente do Ásia Meridional e Oriental, 2 do Oriente próximo e Sul Asiático, 3 da América do Norte e América Latina, 4 da África Oriental e América do Sul e, finalmente, 5 das Ilhas do Pacífico.

A morfologia desta bactéria é caracterizada por formato bacilar ácido resistente que possui lados paralelos, pontas arredondadas, mede em média entre 1 a 8 μm de comprimento e 0,3 a 2,1 μm de diâmetro (Figura 5).

Figura 5 - Microscopia eletrônica (esquerda) e de varredura (direita) do *Mycobacterium leprae*



Fonte: Scollard *et al.* (2006).

Conforme Macieira (2000), o agente etiológico da hanseníase é um parasita intracelular obrigatório, mais comumente encontrado em macrófagos e que pode formar aglomerações ou globias. Esta bactéria utiliza a divisão binária como método reprodutivo, é classificada como gram-positiva e é álcool-ácido resistente quando corada pelo método de Ziehl-Neelsen. Sua parede celular mede aproximadamente 20 nm de espessura e é formada por uma malha de

peptideoglicanos ligados a cadeias de polissacarídeos que sustenta os ácidos micólicos, os quais possuem alto peso molecular, responsáveis por metade da constituição da parede celular da bactéria.

O PGL-1, glicolípido fenólico-1, faz parte da constituição da parede bacteriana do *M. leprae*. Da massa total que compõe a bactéria, 2% correspondem a este lipídeo e caracteriza-se por ser um antígeno específico do bacilo. Pode ser encontrado em tecidos, no sangue periférico e da urina de pacientes multibacilares. Sua estrutura é formada por fenol, ácido micoseossídico, fitiocerol e um trissacarídeo (FOSS, 1997).

1.5 Aspectos Clínicos da Hanseníase

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pela *Mycobacterium leprae*, que afeta principalmente o sistema nervoso periférico, a pele e outros tecidos como ossos e articulações, mucosas, olhos, músculos, testículos, supra-renais e sistema reticuloendotelial. A apresentação clínica da doença pode ocorrer desde poucas a inúmeras lesões. De forma similar, a histopatologia de lesões de pele varia desde pequenos granulomas a difusas infiltrações da derme, que dependerão do estado do sistema imunológico do paciente (TALHARI *et al.*, 2015).

Segundo o Ministério da Saúde (BRASIL, 2021b),

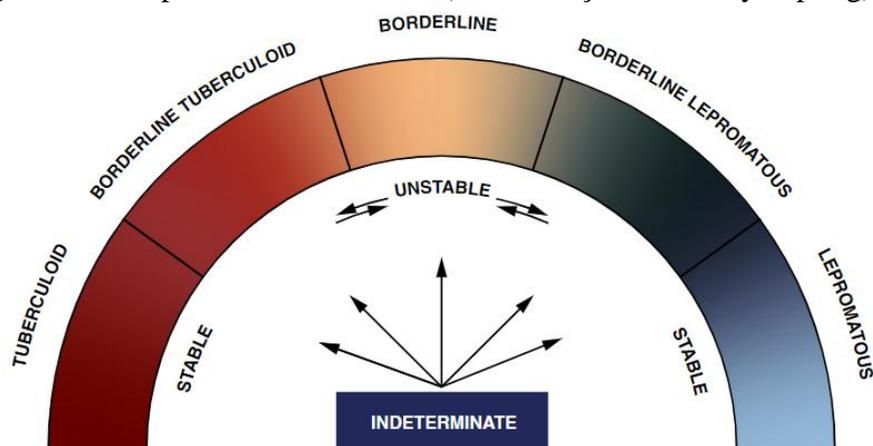
“As lesões cutâneas mais comuns são: manchas esbranquiçadas ou avermelhadas, sem relevo; pápulas (lesões sólidas, com elevação superficial e circunscrita; infiltrações), tubérculos, (lesões sólidas e elevadas semelhantes a caroços externos) e nódulos. Dentre os sinais e sintomas neurológicos estão as neurites, lesões decorrentes de inflamações dos nervos periféricos, que são causados tanto pela ação direta do bacilo nos nervos, como por uma resposta do organismo ao bacilo”.

Considera-se caso de hanseníase o paciente que apresenta uma ou mais das seguintes ocorrências e precisa submeter-se à poliquimioterapia: lesão ou lesões de pele com perda de sensibilidade; acometimento de nervos com espessamento neural ou baciloscopia positiva (BRASIL, 2016).

De acordo com Souza (1997), a infecção pelo *Mycobacterium leprae* progride de diversas formas a depender do sistema imunológico do hospedeiro. A resposta imunológica do portador do agente infeccioso ditará a evolução da doença e determinará: se for competente, a doença evolui para a forma não contagiosa e localizada, mas se a resposta for insuficiente, ela evolui para a forma difusa e transmissível. Entre esses dois pólos, existem as formas intermediárias as quais retratam diversas variações de resistência à bactéria.

Apesar da classificação operacional ser utilizada pela Organização Mundial da Saúde para definir o tipo de tratamento, no meio acadêmico, as classificações mais utilizadas são a do Congresso Internacional de Madrid e a de Ridley e Jopling. Histopatologicamente, Ridley e Jopling padronizaram a nomenclatura, gerando uma escala de classificação para a hanseníase. Baseado em cinco grupos definidos estritamente, essa classificação é considerada o sistema mais adequado para a pesquisa sobre a doença, provendo facilidades em sua aplicação, especialmente no planejamento dos desenhos quimioterápicos e prognósticos. A classificação histopatológica fornece uma padronização entre os casos de hanseníase de diferentes pacientes em diferentes locais do mundo (BARBOSA JÚNIOR, 1998).

Figura 6 - O Espectro da Hanseníase (Classificação de Ridley-Jopling)



Fonte: Belachew & Naafs (2019).

A escala idealizada por Ridley e Jopling (Figura 6) consiste em dois quadros opostos, sendo a forma Tuberculóide-Tuberculóide descrita por apenas uma lesão dermatológica bem descrita, ou um nervo comprometido, sem detecção de bacilos e com alta resistência imunológica à bactéria. Do lado oposto do espectro encontra-se a forma Virchowiana-Virchowiana, caracterizada pela presença de nódulos e placas, com comprometimento simétrico de nervos, com presença de vários bacilos e ausência de resistência imunológica. Entre essas duas formas existem as Dimorfas que abrangem a Dimorfa-Tuberculóide, com características tipicamente tuberculóides e a Dimorfa-Virchowiana com particularidades virchowianas. No meio destas formas está um grupo pequeno de pacientes classificados como dimorfos-dimorfos que apresentam lesões anulares assimétricas com perfurações típicas e comprometimento médio da sensibilidade (BELACHEW & NAAFS, 2019).

A fase inicial da doença pode ser classificada ainda como indeterminada, a qual apresenta manifestação clínica discreta, representada pelo aparecimento de uma pequena mácula hipocrômica com perda reduzida da sensibilidade (JUNIOR *et al.*, 2022).

A classificação de Madrid consiste em dois pólos estáveis e opostos (Virchowiano e Tuberculóide) e dois grupos instáveis (Indeterminado e Dimorfo) (ARAÚJO, 2003).

Segundo a OMS (2019), a hanseníase pode ser classificada, ainda, entre Paucibacilar e Multibacilar. O primeiro grupo são os pacientes que apresentam de uma a cinco lesões cutâneas, com ausência de bacilos detectáveis na baciloscopia, já o segundo abrange os casos que desenvolvem mais de cinco lesões cutâneas, ou com comprometimento dos nervos, ou com resultado positivo para observação microscópica de bacilos em esfregaço do raspado intradérmico, independentemente do número de lesões na pele.

Conforme Silva *et al.* (2019) outra classificação possível relacionada à hanseníase é quanto ao GIF – Grau de Incapacidade Física - o qual funciona como um indicador epidemiológico que permite estimar, de forma indireta e efetiva, a identificação precoce da

doença. Os graus são determinados em ordem crescente de acometimento de mãos, pés e olhos: grau 0, ausência de incapacidades; grau 1, presença de alterações sensoriais nas mãos e/ou pés e/ou olhos e o grau 2, caracterizado pela presença de alterações motoras visíveis como úlceras, garras, reabsorções oftalmológicas ou ósseas.

Relatos na literatura indicam que a hanseníase é mais frequente em pacientes portadores do tipo Sanguíneo A, quando comparado a grupos controles (VOGEL *et al.*, 1969). Da mesma forma, a presença dos pacientes desse mesmo grupo é mais constante nos diagnósticos de hanseníase virchowiana do que os de hanseníase tuberculóide. No soro sanguíneo de pessoas, com tipo sanguíneo A e que apresentam a manifestação clínica mais grave da doença, foram encontrados níveis mais baixos de globulina alfa 1 e alfa 2. Quanto aos sintomas, nos tipos sanguíneos A e AB houve mais frequência de alterações oftalmológicas e cutâneas, quando comparados aos outros grupos.

1.6 Tratamento

De acordo com o Ministério da Saúde do Brasil (BRASIL, 2021c) e com a OMS, o tratamento da hanseníase deve ser feito com o uso da poliquimioterapia única (PQTU) que consiste na associação da rifampicina, dapsona e clofazimina.

Em pacientes classificados como paucibacilares o tratamento consistirá na administração mensal de 600 mg de rifampicina, 100 mg de dapsona e 300 mg de clofazimina em dose supervisionada e em casa deverão tomar diariamente 100 mg de dapsona e 50 mg de clofazimina. O tratamento deverá ter duração de seis meses.

Pacientes classificados como multibacilares farão um tratamento com duração de doze meses com prescrição de 600 mg de rifampicina, 100 mg de dapsona e 300 mg de clofazimina em dose mensal supervisionada e auto-administrarão doses diárias de 100 mg de dapsona e 50 mg de clofazimina. Para efeitos adversos ou resistência aos medicamentos poderão ser utilizados ofloxacino, minociclina ou claritromicina como tratamentos de segunda linha.

2. JUSTIFICATIVA

Em 1873, Armauer Hansen descobriu o bacilo causador da hanseníase, por meio da biópsia de pele. No entanto, as tentativas de cultivar a bactéria falharam. Esforços subsequentes para demonstrar o crescimento da bactéria em meios sintéticos foram infrutíferos, apesar de ter sido possível a detecção de atividade metabólica (COLE *et al.*, 2001).

Segundo Monot *et al.* (2005), as principais adversidades de se trabalhar com *M. leprae* se devem à dificuldade de cultivá-la em meios axênicos e ao tempo de duplicação em tecido que leva, em média, 13 dias. Foi apenas quando se descobriu que o *Dasyatis novemcinctus* podia ser infectado que foi possível se obter grandes quantidades do bacilo, possibilitando análises biológicas e imunológicas.

A bactéria causadora da hanseníase tem um período de incubação longo que compreende de dois a dez anos, desde o momento em que ela entra em contato com o paciente, até a doença aparecer. Nesse contexto, o diagnóstico da enfermidade é tardio, dificultando o controle da disseminação da mesma. No Brasil, o surgimento de novos casos anualmente estima-se em 30 mil (GANDRA, 2021).

Nos dias de hoje, o diagnóstico da hanseníase é puramente clínico e o desenvolvimento de exames de alta sensibilidade e especificidade, que sejam menos invasivos, menos onerosos aos cofres públicos e que permitam um diagnóstico rápido e eficiente, para possibilitar a introdução precoce do tratamento, se fazem necessários.

Devido à carga de discriminação que os hanseníacos sofreram ao longo da história, um dos objetivos principais da OMS, na estratégia global contra a doença, é oferecer aos acometidos pela hanseníase princípios de equidade e justiça social para que não sofram exclusão e tenham uma melhor qualidade de vida (PAHO, 2010).

Nesse cenário, quanto mais eficiente e rápida for a detecção dos hansenianos, mais eficaz se tornarão as medidas de controle e disseminação da doença. Dessa forma, será possível evitar com que os pacientes evoluam para as formas mais graves da doença, desenvolvam deficiências e deformidades irreversíveis, diminuam sua interação social, desenvolvam problemas psicológicos e tenham sua capacidade laboral comprometida.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Testar a acurácia da PCR em tempo real em células mononucleares periféricas, extraídas por gradiente de Ficoll, no diagnóstico da hanseníase.

3.2 Objetivos Específicos

- 3.2.1 Testar a performance comparativa de qPCR entre o concentrado de hemácias, plasma, soro e célula mononuclear do sangue periférico (PBMC);
- 3.2.2 Acarear as características do quadro clínico do paciente e os resultados da PCR em tempo Real;
- 3.2.3 Analisar a presença do *Mycobacterium leprae* no sangue periférico humano.

4. METODOLOGIA

Trata-se de um estudo de acurácia diagnóstica (transversal), com alocação prospectiva entre os grupos (denominado na literatura internacional como *cross-sectional/cohort*) no qual os pesquisadores do estudo só terão conhecimento da real classificação do paciente ao final da análise (HUDSON *et al.*, 2005).

4.1 População

A população alvo consiste nos pacientes com suspeita de hanseníase, atendidos no ambulatório de hansenologia do Hospital Universitário de Brasília - HUB a partir de 01 de junho de 2020 até 01 de junho de 2021. Foram acessados todos os pacientes encaminhados pela regulação da Secretaria de Saúde do Distrito Federal para investigação diagnóstica de hanseníase. A coleta do material ocorreu de forma consecutiva ao recrutamento dos participantes.

4.2. Padrão de referência (Padrão ouro)

O caso de hanseníase foi definido clinicamente, seguindo o processo preconizado pela Organização Mundial da Saúde:

1. Área de pele com redução de sensibilidade ou
2. Dano neurológico periférico (disfunção autonômica, espessamento neural, deformidades motoras) ou
3. Identificação do bacilo por baciloscopia ou biópsia e que requeira tratamento clínico.

4.3 Critérios de exclusão

Foram excluídos pacientes imunossuprimidos, ou que tenham se submetido ao tratamento para hanseníase até 5 anos antes da inclusão, além daqueles que não concordaram em participar da pesquisa ou não assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido – TCLE, para participação na pesquisa.

4.4 Procedimentos

Após inclusão dos pacientes e assinatura do termo de consentimento, o indivíduo foi encaminhado para investigação clínica conforme as diretrizes da Organização Mundial da Saúde e do Ministério da Saúde do Brasil (BRASIL, 2008).

4.4.1 Coleta das amostras de sangue:

Além dos procedimentos clínicos diagnósticos propostos pela equipe assistencialista, foi realizada coleta de 15 ml de sangue venoso por punção cubital armazenado em Tubo Gel BD SST® II Advance® contendo ativador de coágulo e em tubos contendo heparina (Becton Dickinson Vacutainer, Franklyn Lakes, EUA).

Posteriormente, o sangue venoso foi separado por meio das seguintes fases, para avaliação do DNA de *M. leprae*, de acordo com o recipiente de coleta:

- Tubo Gel BD SST® II Advance®

Os tubos foram submetidos à centrifugação a 2.000 rpm por 10 minutos e separação apenas do soro como sobrenadante.

- Tubos contendo heparina

O conteúdo coletado foi dividido nos seguintes componentes conforme os procedimentos a seguir:

- Plasma
- Células mononucleares do sangue periférico (PBMC)
- Concentrado de eritrócitos

4.4.2 Procedimentos da Separação:

Esta etapa foi realizada exclusivamente pelo mesmo profissional.

1. Os tubos contendo heparina foram inicialmente centrifugados a 1.900 g, a 22°C por 10 minutos.

2. Após centrifugação, transferiu-se o plasma heparinizado com auxílio de pipeta sorológica de 10 ml para quatro microtubos cônicos de 15 ml, previamente identificados e armazenados a -80°C até extração do DNA.

3. Em seguida, diluiu-se o sangue na proporção de 1:1 em RPMI 1640 incompleto Gibco® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) pela parede do tubo.

4. O sangue total + RPMI incompleto foram homogeneizados e aplicados lentamente com auxílio de pipeta sorológica de 10 ml à metade (proporção de 2:1) do volume de uma solução de Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich, San Luis, EUA) a temperatura ambiente, em tubos cônicos de 15 ml.

5. Os tubos foram centrifugados a 680 g durante 40 minutos a 22°C, com aceleração e desaceleração baixas (aceleração: 2 e desaceleração: <0).

6. O sobrenadante de RPMI foi descartado. Em seguida, retirou-se o anel de células mononucleares com o auxílio de uma pipeta Pasteur de vidro e foi feita a transferência para tubos cônicos de 15 ml de polipropileno (tubo fosco) e as células foram mantidas em um banho de gelo.

7. Os tubos foram completados para 14 ml de RPMI incompleto, homogeneizados suavemente por inversão e centrifugados a 400 g por 7 minutos a 4°C (1ª lavagem), com aceleração (9) e desaceleração (3). Esta lavagem foi realizada por 3 vezes e as células foram ressuspensas em 200 µl de RPMI.

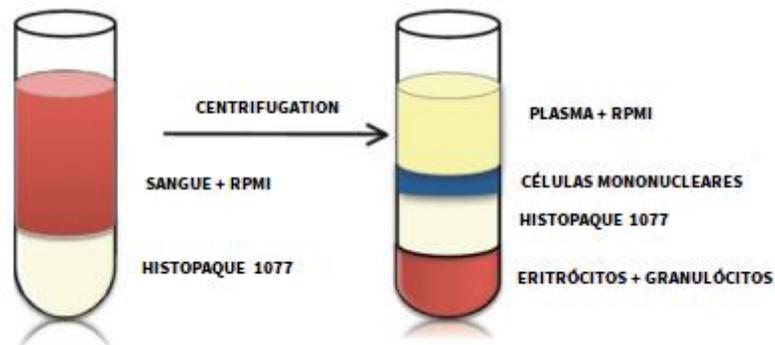
4.4.3 Extração do DNA:

A extração do DNA foi realizada com 200 µl das seguintes fases (Figura 7):

- Soro
- Plasma – Separado conforme protocolo acima
- Células mononucleares – Separadas conforme protocolo acima

- Concentrado de hemácias – Homogeneizado depois da retirada do Ficoll residual

Figura 7 - Fases de separação dos componentes do sangue periférico



Fonte: Figura adaptada de Bharadwaj *et al.*(2012).

Foram utilizados 200 µl de cada uma dessas fases apresentadas para extração com uso do Kit Purelink Genomic DNA Minikit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) conforme orientação do fabricante.

4.4.4 Detecção do DNA do *M. leprae*:

Os procedimentos de amplificação foram realizados segundo validação previamente publicada. Considerando que o bacilo não é cultivável em meios artificiais, para padronização dos controles positivos e reação da curva padrão de quantificação, estudamos o gene RLEP (*Repetitive element*), conforme descrito pelo estudo de Sevilha-Santos *et al.* (2021). Por meio da ferramenta Geneart (Thermofisher Scientific, Waltham, EUA) confeccionamos 5 µg do alvo genético correspondente, com 481 pares de bases (pb), pertencente ao genoma do *Mycobacterium leprae* após conferência pela ferramenta Primer-BLAST, conforme sequência a seguir:

5'-

GCTTCGTGTGCTTTGCCGCAGTGGACACGATTAGCGCGGCGCACGTAAGC
ATGTCGGTGGTGGATGCTGCTTGGTCTACATGTTGATGATGCCAGGGGCTG
GGCACCTGGGCTGTGCTGAAGGCGATATCGATGCAGGCGTGAGTGTGAGG
ATAGTTGTTAGCGCCGCGGGGTAGGGGCGTTTTAGTGTGCATGTCATGGCC
TTGAGGTGTCGGCGTGGTCAATGTGGCCGCACCTGAACAGGCACGTCCCC
GTGCACGGTATAACTATTCGCACCTGATGTTATCCCTTGCACCATTTCTGCC
GCTGGTATCGGTGTCGGCGGCTTGTGACCGGCCCTCAGCCAGCAAGCAG
GCATGCCGCCGGGTGCAGCAGTATCGTGTTAGTGAACAGTGCATCGATGA
TCCGGCCGTCGGCGGCACATACGGCAACCTTCTAGCGCAGATCAACCACC
CACACCCACCAGCCCACCACAACACC

-3'

A confecção resultou em um total de $9,63 \times 10^{12}$ cópias do gene alvo.

Posteriormente, confeccionamos os seguintes pares de iniciadores para realização da PCR em tempo real:

RLEPBR F – 5' – CTTGCACCATTTCTGCCGCT – 3'

RLEPBR R – 5' – TGCGCTAGAAGGTTGCCGTA – 3'

A reação de PCR em tempo real foi padronizada com os seguintes reagentes, nas seguintes concentrações, ciclos e temperaturas (Tabelas 2, 3 e 4):

Tabela 2 - Reagentes utilizados na reação em cadeia da polimerase em tempo real

REAGENTES	CONCENTRAÇÃO	VOLUME (μ l)
SYBR	2X	7,5
Primer-R	10 μ M	0,45
Primer-F	10 μ M	0,45
H ₂ O	--	3,6
DNA		3,0
VOLUME FINAL	--	15

Fonte: Sevilha-Santos *et al.* (2021).

Tabela 3 - Programa utilizado para a reação em cadeia da polimerase em tempo real

Etapa	Temperatura	Tempo	Ciclos
UDG ativação	50 °C	2min	1x
Ativação enzima	95 °C	2min	1x
Desnaturação	95 °C	15s	45x
Anelamento	60°C	1min	45x

Fonte: Sevilha-Santos *et al.* (2021).

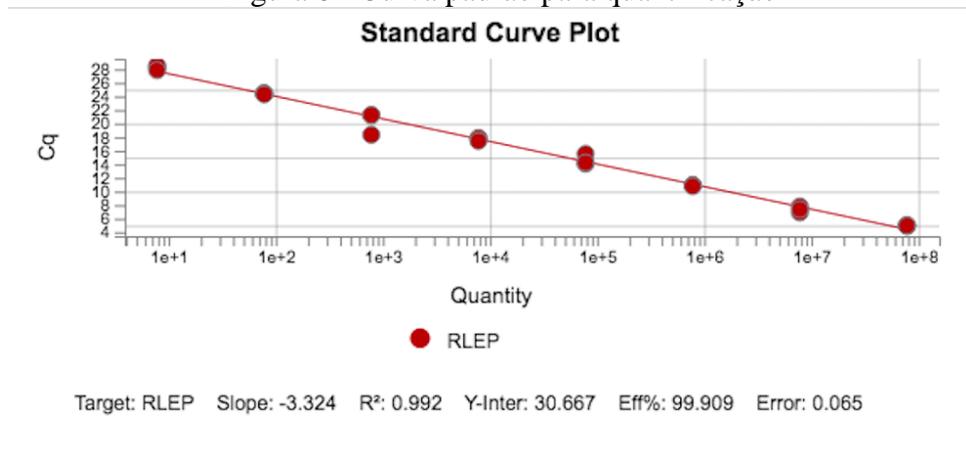
Tabela 4 -Programa utilizado para a curva de dissociação

Ramp rate	Temperatura	Tempo
1.6°C/s	95°C	15s
1.6°C/s	60°C	1min
0.15°C/s	95°C	15s

Fonte: Sevilha-Santos *et al.* (2021).

As reações acima descritas foram realizadas em um termociclador Quantstudio 1 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA). A curva padrão de quantificação foi realizada considerando-se que o *Mycobacterium leprae* tem 37 cópias do gene alvo. A quantificação foi feita em triplicata com uma curva partindo de $7,8 \times 10^7$ a 7,8 bacilos por reação (Slope -3,324; R^2 : 0,992; Eficiência: 99,909) (Figura 8).

Figura 8 - Curva padrão para quantificação



Fonte: Sevilha-Santos *et al.* (2021)

4.5 Ética

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília pelo número de protocolo 34164820.6.0000.0030.

Todos os pacientes foram incluídos após concordância e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.

4.6 Tamanho amostral:

O cálculo amostral foi realizado com base em uma recente meta-regressão que considerou que a sensibilidade e especificidade da PCR com iniciadores que visam amplificar o gene RLEP é de 75.0% (IC95% = 45.2-91.6) e 96.1% (IC95% = 86.3-99.0), respectivamente, com os indicados intervalos de confiança. Esta foi definida como a provável acurácia da PCR em sangue total. A prevalência de hanseníase nessa população segundo dados assistencialistas do ambulatório de hanseníase é de 30%. Considerando uma hipótese alternativa de que a sensibilidade do exame em amostra de células mononucleares periféricas pode alcançar uma sensibilidade de 90%, um poder de 0,80 e um $p < 0,05$, o cálculo amostral mínimo ficou em 103 pacientes, com um número mínimo de 31 casos de hanseníase (BUJANG & ADNAN, 2016).

4.7. Análise estatística:

Dados descritivos foram tabulados. As variáveis categóricas foram comparadas entre casos e controles por meio do teste do teste do Qui-quadrado ou por sua versão exata caso uma das caselas apresentasse valores de frequência menor ou igual a 5. As variáveis numéricas foram comparadas por meio do teste *T-student*, para grupos com distribuição normal, e pelo teste de Wilcoxon, quando a distribuição não seguiu a normalidade. A propriedade dos testes diagnósticos sensibilidade, especificidade e acurácia foram calculadas. A análise foi realizada no programa estatístico R versão 4.1.2, R Core Team (2021). A significância foi definida com um valor de $p < 0,005$ e um intervalo de confiança (IC) de 95%.

5. RESULTADOS

Foram incluídos no estudo 111 pacientes sendo 55 casos com diagnóstico de hanseníase e 56 controles (pacientes com suspeita da doença e não diagnosticados). As características demográficas dos grupos estão demonstradas na tabela 5. Quarenta e oito pacientes (85,71%) incluídos no grupo dos controles também eram contactantes intradomiciliares de pacientes com hanseníase.

Tabela 5 - Características demográficas dos pacientes incluídos no estudo

CARACTERÍSTICA	CASOS DE HANSENÍASE	CONTROLES	p-VALOR
Sexo			0,922
Feminino	29(52,73%)	28(50,00%)	
Masculino	26(47,27%)	28(50,00%)	
Idade	44.33(14,84)	45.11(14,70)	0,781
Contactante	0	48(85,71%)	<0.001
Hanseníase prévia	24(43,64%)	13(23,21%)	0,037
Mediana das Doses de BCG (Interquartil)	1(1)	1(2)	0,004

Fonte: autoria própria.

As características relacionadas à hanseníase estão pormenorizadas nas tabelas 6, 7, 8 e 9. A maioria dos pacientes apresentava a forma dimorfa da hanseníase e 25 pacientes estavam em estado reacional hansênico no momento da inclusão no estudo. Apenas 23 pacientes não apresentavam qualquer sequela da hanseníase e 17 apresentaram GIF1 e 15 GIF2, ao diagnóstico.

Tabela 6 - Características relacionadas à forma da hanseníase

FORMA	CASOS DE HANSENÍASE
Indeterminada	1
Tuberculóide-Tuberculóide	5
Dimorfa-Tuberculóide	8
Dimorfa-Dimorfa	18
Dimorfa-Virchowiana	11
Virchowiana-Virchowiana	12

Fonte: autoria própria.

Tabela 7 - Características relacionadas à reação da hanseníase

REAÇÃO	CASOS DE HANSENÍASE
Tipo I	11
Tipo II	6
Tipos I e II	12

Fonte: autoria própria.

Tabela 8 - Características relacionadas ao GIF da hanseníase ao diagnóstico

GIF AO DIAGNÓSTICO	CASOS DE HANSENÍASE
0	23
1	17
2	15

Fonte: autoria própria.

Tabela 9 - Características relacionadas à baciloscopia da hanseníase

BACILOSCOPIA	CASOS DE HANSENÍASE média (desvio padrão)
Baciloscopia	1,1(1,79)
Baciloscopia negativa	34

Fonte: autoria própria.

Apenas 1 paciente apresentou, à quantificação, números correspondentes a mais de 1 bacilo por 200 microlitros de material sanguíneo avaliado. Todas as quantificações restantes demonstraram quantidades de fragmentos de bacilos (tabela 10).

Tabela 10 - Quantificação do número de bacilo por amostra (Números representados pela média padrão P=0,261)

AMOSTRA	QUANTIFICAÇÃO MÉDIA (DESVIO PADRÃO)
Soro	0,033 (0,088)
Plasma	0,005 (0,018)
PBMC	0,030 (0,099)
Hemácias	0,003 (0,008)

Fonte: autoria própria.

Conforme os dados apresentados nas tabelas 11 e 12, para a qPCR observou-se uma maior especificidade entre as amostras de PBMC com um valor de 98,15% comparado a 100% para a baciloscopia e uma baixa sensibilidade para todos os testes diagnósticos, sendo o menor encontrado na qPCR do plasma (7,31%). Dentre os casos classificados como multibacilares (pacientes diagnosticados com as formas Virchowiana, Dimorfa-Virchowiana e Dimorfa-Dimorfa) observou-se a positividade em quatro amostras de soro, três amostras de

plasma, quatro amostras de PBMC e em três amostras de concentrado de hemácias. Já nos casos classificados como paucibacilares houve positividade em duas amostras de soros, um de PBMC, duas de concentrado de hemácias e nenhuma de plasma. A positividade dos exames em contactantes está pormenorizada na legenda da tabela 11 e não houve diferença na positividade da qPCR em controles, a depender do paciente ser classificado como contactante ou não.

Tabela 11 - Propriedade dos testes diagnósticos nos materiais avaliados

AMOSTRA	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE –	ACURÁCIA (IC95%)
	POSITIVO/HANSENÍASE (IC95%)	NEGATIVO/CONTROLES (IC95%)	
Soro	11,54% - 6/52	92,45% - 49/53 ^a	52,8%
	(5,39-22,97)	(82,14-97,03)	(42,91-61,68)
Plasma	7,31% - 3/41	95,45% - 42/44 ^b	52,94%
	(2,52-19,43)	(84,86-98,74)	(42,43-63,19)
PBMC	9,26% - 5/54	98,15% - 53/54 ^c	53,70%
	(4,02-19,91)	(90,23-99,67)	(44,33-62,82)
Hemácias	9,80% - 5/51	94,34% 50/53 ^d	52,88%
	(4,26-20,98)	(84,63 – 98,06)	(43,36-62,20)
Baciloscopia	38,18% - 21/55	100% - 56/56	69,37%
	(26,52-51,39)	(93,58-100)	(51,90-71,54)

Fonte: autoria própria. Legenda: a: 2 exames positivos em contactantes; b: 1 exame positivo em contactante; c: 2 exames positivos em contactantes; d: 2 exames positivos em contactantes.

Tabela 12 - Sensibilidade dos testes diagnósticos nos materiais avaliados de acordo com a classificação multi ou paucibacilar.

AMOSTRA	SENSIBILIDADE	SENSIBILIDADE
	MULTIBACILAR –	PAUCIBACILAR –
	POSITIVO/HANSENÍASE (IC95%)	POSITIVO/HANSENÍASE (IC95%)
Soro	10,53% - 4/38 (4,17-24,13)	14,29% - 2/12 (4,01-39,94)
Plasma	10,00% - 3/30 (3,46-25,62)	0/11
PBMC	10,00% - 4/36 (3,96-23,005)	7,14% - 1/14 (1,27-31,47)
Hemácias	8,11% - 3/34 (2,79-21,30)	14,29% - 2/12 (4,01-39,94)

Fonte: autoria própria.

6. DISCUSSÃO

Devido às diversas formas clínicas com que a hanseníase se apresenta e o impacto da capacidade diagnóstica em cada exame, nos dias de hoje, não há uma ferramenta precisa que possa determinar a infecção por *M. leprae*. Dessa forma, o diagnóstico é feito por meio de uma combinação entre análise baciloscópica e avaliação clínica médica dermatoneurológica. Casos assintomáticos ou a previsão do progresso da doença, em pacientes que sofreram exposição, acabam sendo negligenciados, o que facilita a disseminação (BRASIL, 2021b).

Segundo Azevedo *et al.* (2017), uma vez que o cultivo *in vitro* de *M. leprae* ainda não é possível, o diagnóstico da hanseníase é limitado e baseia-se na avaliação clínica dos pacientes. A análise histopatológica e a baciloscopia são utilizados como exames complementares, os quais ajudam a determinar o tipo de tratamento a ser prescrito. No entanto, essas técnicas demandam tempo e tem baixa sensibilidade, mas a positividade destes testes é considerada um dos fatores para definição de caso clínico.

No estudo de pacientes hansenianos, na era anterior à poliquimioterapia ampla, a bacilemia - transporte de patógenos pelas vias do sistema circulatório - pôde ser encontrada em 76% dos pacientes. Dentre aqueles classificados como Virchowianos, 88,2% tiveram resultados positivos para o *M. leprae* nos esfregaços visualizados ao microscópio e dentre os dimorfo-Virchowianos, o total foi de 50%, demonstrando que a presença dos bacilos é mais frequente nos pacientes que apresentam o pior quadro clínico (CHATTERJEE *et al.*, 1989).

Por meio da PCR convencional, como método de detecção da infecção subclínica por *M. leprae* em sangue e secreção nasal de contactantes, Almeida *et al.* (2004) obtiveram um número positivo baixo como resultado. Apesar de a mesma técnica ter sido utilizada para a detecção de DNA da micobactéria no sangue, bulbos pilosos e secreção nasal de pacientes cujo tratamento havia sido finalizado há 6 ou 8 anos, acredita-se que a baixa detecção foi

atribuída à baixa sensibilidade do protocolo desta PCR, em relação à baixa carga bacteriana das amostras dos contatos.

Segundo Nutz *et al.* (2011), a PCR em tempo real é o método analítico padrão para a quantificação de biomassa patogênica em tecidos de organismos hospedeiros. Os parâmetros de performance padrão de um método analítico são o Limite de Detecção (LOD) e o Limite de Quantificação (LOQ). Respectivamente, esses conceitos equivalem à mínima quantidade detectável do patógeno em uma reação e à mínima quantidade quantificável de um patógeno. No geral, o limite de quantificação é mais alto do que o limite de detecção uma vez que o primeiro conta com a precisão de vários pontos de quantidade de DNA ou cDNA pipetados. No caso da detecção, apenas a sinalização de um Ciclo de Quantificação (Cq) é suficiente. No contexto da qPCR, o valor de LOD é considerado como a concentração mínima de ácido nucléico ou número de células, que sempre proporciona um resultado positivo em todas as amostras testadas, ou em 95% delas (KRALIK & RICCHI, 2017).

Em seu ensaio para detecção ultra-sensível de *M. leprae*, Manta *et al.* (2020) testaram seis métodos diferentes de extração de DNA, em oito tipos diferentes de amostras clínicas de pacientes hansenianos. Para sangue periférico, os ensaios demonstraram que este tipo de material não é adequado para a detecção da bactéria, uma vez que a sensibilidade para pacientes paucibacilares e multibacilares foi de 3,1% e 25,9%, respectivamente. Este dado está de acordo com os resultados aqui apresentados e podem ser explicados pela baixa circulação de patógenos vivos, mesmo em pacientes Virchowianos. Acredita-se que a disseminação do bacilo seja predominantemente linfática fazendo com que testes moleculares e diagnósticos que utilizam sangue periférico apresentem baixa sensibilidade.

De acordo com Gama *et al.* (2018), a detecção da região alvo 16S rRNA para *M. leprae* em 25% das amostras de sangue de pacientes paucibacilares e 30% dos pacientes multibacilares, que apresentaram índice bacteriológico (IB) negativo, receberam um resultado

positivo na qPCR. No caso dos pacientes multibacilares, todos os que apresentaram um resultado positivo para o IB, acusaram presença da bactéria na qPCR. Neste presente estudo, dentre os diferentes extratos do sangue, a maior sensibilidade encontrada entre pacientes paucibacilares e multibacilares foi no soro, correspondendo a 14,29% e 10,53%, respectivamente. O mesmo valor do soro foi encontrado para as hemácias de pacientes paucibacilares positivos e de 8,11% para hemácias de pacientes multibacilares.

Nos resultados obtidos, apenas um paciente teve detectado os números correspondentes a mais de um bacilo por 200µl de material avaliado em seu plasma e nas células mononucleares do sangue periférico (PBMC). Nos demais pacientes, houve apenas a detecção de fragmentos de DNA do *M. leprae*. Segundo Pan (2013), DNA circulante, conhecido também como DNA livre de células se refere ao DNA que se encontra no sistema circulatório, mas não no interior das células. Já se sabe há algum tempo que este tipo de DNA pode ser encontrado no plasma ou soro de indivíduos saudáveis ou doentes. Para testes pré-natais genéticos e biópsia líquida de câncer, a detecção de DNA livre de células tem sido extensivamente utilizada. A presença parcial desse material genético é resultante da renovação celular em que fragmentos de DNA acabam sendo liberados em fluídos corporais como sangue, urina e derrame pleural (YANG *et al.*, 2020).

Outro resultado intrigante consiste na maior frequência de resultados positivos em pacientes paucibacilares para alguns dos componentes do sangue. De fato, o número de pacientes paucibacilares foi muito pequeno e qualquer positividade neste grupo pode levar a uma falsa hiper estimação do número de bacilos circulantes. Como o paciente multibacilar tem uma multiplicidade de bacilos seria mais lógico pensar que este teria uma maior quantidade de DNA bacilar no sangue. Por outro lado, a maior imunidade celular dos pacientes paucibacilares pode levar a uma maior fragmentação de bacilos resultando em uma consequente maior circulação de DNA livre de células.

Conforme Click *et al.*(2018), 44% das amostras de plasma testadas por meio de qPCR para a presença de DNA circulante de *M. tuberculosis* tiveram pelo menos um resultado positivo na triplicata. Foi possível demonstrar a detecção da bactéria em amostras de participantes com escarros positivos para a doença, mesmo na ausência de mycobacteremia. Os resultados são consistentes com a presença de DNA livre circulante no plasma de pacientes com tuberculose. Uma vez que todas as amostras positivas para este método tiveram valores altos de Ct (threshold cycle) e nem todas as triplicatas foram positivas, sugere-se uma concentração baixa do DNA alvo próximo ao limite de detecção.

Em estudo prévio, a presença de DNA livre circulante de *M. tuberculosis* no plasma foi detectada em 54,2% do total de participantes, incluindo aqueles com resultados negativos para o escarro (46,2%). A especificidade da qPCR foi de 94,3%. As limitações deste estudo se concentraram no tamanho amostral pequeno e no kit de extração de DNA o qual não era específico para DNA livre, subestimando a detectabilidade do mesmo (PAN *et al.*, 2021).

A detecção de fragmentos livres de DNA de *M. leprae*, assim como no estudo do plasma de pacientes com câncer, tem sua origem incerta (STROUN *et al.*, 1987). Não é possível determinar se esse material genético é proveniente dos próprios bacilos encontrados no sangue ou se esse DNA é liberado pelas células do sistema imunológico invadidas pelas bactérias causadoras da hanseníase, como os macrófagos. Não existem estudos aprofundados sobre a presença de DNA livre circulante de *M. leprae* no sangue. A baixa sensibilidade desta qPCR e a presença de fragmentos de DNA propõem uma otimização nos processos de extração de DNA. Estas limitações impedem qualquer conclusão sobre a existência de bacilos viáveis no sangue periférico de pacientes multibacilares. No entanto, estudos anteriores demonstram a presença de bactérias no sangue periférico de uma minoria de pacientes Virchowianos. Sem embargo, a avaliação morfológica não permite demonstrar se os bacilos encontrados estavam viáveis (LANE, 2006).

A rota de infecção de *M. leprae* começa pelo trato respiratório superior, particularmente o nariz, que funciona como porta de entrada e saída da bactéria. A exposição ao patógeno leva à infecção da mucosa nasal que desencadeia resposta imunológica. Se a colonização é sucedida, a bactéria é transportada pelo sistema circulatório e disseminada para locais que favorecem seu crescimento. A comparação na análise de concentrações de bacilos de diferentes amostras, dentre as quais swab nasal, biópsia nasal e sangue periférico, corroboram com essa hipótese. Macrófagos infectados circulantes no sangue são rapidamente depositados ou limpos do próprio sangue enquanto migram para a pele ou nervos (ARAÚJO, *et al.*, 2016).

Conforme REIS *et al.* (2013), em suas análises, apesar da qPCR para sangue periférico ter sido alta (99,1%), a sensibilidade foi baixa (11,5%) e nenhum teste com esse valor pode ser considerado relevante para atestar o diagnóstico de hanseníase, a menos que seja combinado com outros exames. Acredita-se que o sangue não seja o melhor material de amostra para a detecção de *M. leprae*, uma vez que sua temperatura regular de 37°C não constitui um bom ambiente de desenvolvimento e sobrevivência do patógeno. O bacilo é presumidamente encontrado no sangue durante o curto período em que células infectadas migram para as extremidades corporais, cujas temperaturas alcançam entre 30°C e 35°C e favorecem a reprodução da bactéria.

Mesmo que a sensibilidade de qPCR seja alta para a detecção de *M. leprae* em ensaios realizados com amostras de pele, esses resultados não aumentam a sensibilidade clínica. Dessa forma, em locais em que a prevalência da hanseníase permanece alta, as avaliações clínica e microscópica continuam sendo as melhores técnicas de diagnóstico da doença, visto que a qPCR não demonstra melhorar o valor preditivo de diagnóstico laboratorial (KRAMME, 2003). Neste contexto, ainda existe uma dificuldade muito grande no diagnóstico da Hanseníase. As adversidades no cultivo do bacilo, *In vitro*, comprometem o

desenvolvimento de uma ferramenta menos invasiva, mais eficiente e barata para a averiguação da infecção por *M. leprae*. Em contexto laboratorial, as amostras corporais que oferecem um melhor resultado para corroborar com o quadro clínico fornecido pelo médico são escarros, amostras nasais ou amostras de biópsias.

O uso da qPCR para detecção da bactéria causadora de hanseníase no sangue, como método diagnóstico da doença, não tem demonstrado bons resultados de sensibilidade. Apesar de ser altamente específico, o processo de extração de DNA pode afetar o material genético da bactéria, enviesando os resultados da metodologia. Em 1915, averiguou-se a presença de bacilos causadores da Hanseníase em diversas secreções corporais humanas, observadas em lâminas ao microscópio. Os resultados demonstraram a presença de bactérias no sangue e urina em 50% dos participantes do estudo. Apenas em 37,5% dos pacientes se encontrou o patógeno nas fezes. No entanto, quantidades maiores de *Mycobacterium leprae* foram avistadas quando as secreções eram de escarro, muco nasal e úlceras. As lágrimas de nenhum participante apresentaram presença da bactéria (HONEIJ, 1915).

No processo de infecção e com o aumento da carga bacteriana, grandes concentrações da bactéria atingem a corrente sanguínea, causando bacteremia. Pacientes com hanseníase multibacilar não tratada apresentam a bactéria disseminada no sangue e alguns desses bacilos se mantêm viáveis e, teoricamente, são infecciosos. No entanto, como o *M. leprae* é transmitido por gotículas de saliva, dificilmente esses bacilos encontrados no sangue participam do processo de transmissão (LANE, 2006).

Doadores de sangue costumam ser indivíduos saudáveis com quadro de saúde acima do padrão e, como esperado, aqueles que foram expostos ao *M. leprae* não desenvolvem a doença. Uma vez que a bactéria tenha entrado no sistema circulatório e não haja ocorrido o aparecimento de sinais ou sintomas da hanseníase, a infecção subclínica ocorre e ela pode ser curada de forma espontânea ou ter a progressão da doença. Nesse período, é plausível que

estas pessoas saudáveis participem no processo de transmissão da enfermidade (ARAÚJO, 2012).

Amostras de sangue de doadores assintomáticos foram testadas por meio da técnica ELISA e a detecção de DNA de *M. leprae* foi feita por meio de qPCR. Os participantes que obtiveram resultados positivos foram convidados a participarem de um acompanhamento de cinco anos. Do total de pessoas que continuou apresentando resultados positivos, 55,55% progrediu com a doença. Mesmo que ainda não haja relato de transmissão por meio de transfusão de sangue, recomenda-se que, em países em que a hanseníase continua sendo um grave problema de saúde público, testes de triagem sejam feitos em todas as amostras coletadas em bancos de sangue (GOULART *et al.*, 2016).

É possível o isolamento de bacilos em amostras de sangue de pacientes com hanseníase, que ainda não foram submetidos ao tratamento, e uma atenção maior deve ser dada à transmissão potencial de bactérias por meio de transfusões, considerando que seus receptores costumam ser indivíduos hospitalizados que carecem de cuidados e estão suscetíveis à infecções.

7. CONCLUSÃO

De acordo com o objetivo geral traçado neste estudo pode-se concluir que a PCR em tempo real tem baixa acurácia para o diagnóstico da hanseníase, em qualquer componente do sangue periférico.

Quanto aos objetivos específicos pode-se concluir que:

- Não houve diferença significativa em relação à acurácia da PCR em tempo real dos diferentes componentes do sangue periférico analisados.
- Os pacientes multibacilares apresentam maior chance de apresentar bacilos circulantes ou fragmentos dos mesmos.
- Independente da viabilidade, estruturas do *M. leprae* estão presentes no sangue periférico de alguns casos de hanseníase.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR, A.P.M. Lepra y estigma: estudio de caso en latinoamérica colonial. **Revista de Estudios**, Costa Rica, n. 17, p. 59-72. 2003. Disponível em: <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/estudios/article/view/26538>. Acesso em: 16 nov. 2021.

ALMEIDA, E.C. de. *et al.* Detection of *Mycobacterium leprae* DNA by Polymerase Chain Reaction in the blood and nasal secretion of Brazilian household contacts. Molecular Diagnosis and Characterization. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 5, Aug. 2004. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/mioc/a/Zz8dZkNxhddWg6kXJbMJ7dp/?lang=en>. Acesso em: 07 jan. 2022.

ARAÚJO, M.G. Hanseníase no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 3, p. 373-382, mai-jun. 2003. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/335vHvt6zgPfyXb7vnChvQJ/?lang=pt&format=pdf>. Acesso em: 14 set. 2021.

ARAÚJO, S. *et al.* Unveiling healthy carriers and subclinical infections among household contacts of leprosy patients who play potential roles in the disease chain of transmission. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.107, n. I, p. 55-59. 2012. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/mioc/a/xkzZkfChhqGzvvyqDrZ9YFk/?lang=en>. Acesso em: 11 jan. 2022.

ARAÚJO, S. *et al.* Molecular evidence for the aerial route of infection of *Mycobacterium leprae* and the role of asymptomatic carriers in the persistence of leprosy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 63, n. 11, p. 1412 – 1420, Dec. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/cid/ciw570>. Acesso em: 11 jan. 2022.

AZEVEDO, M.C.S. *et al.* qPCR detection of *Mycobacterium leprae* in biopsies and slit skin smear of different leprosy clinical forms. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 71- 78. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2016.09.017>. Acesso em: 21 jan. 2022.

BALA, P. **Learning from empire: medicine, knowledge and transfers under Portuguese rule**, Cambridge: Cambridge Scholars Publishing, 2018. Disponível em: https://books.google.com.br/books?id=gTWEDwAAQBAJ&pg=PA39&lpg=PA39&dq=CARVALHO,+A.S.+Hist%C3%B3ria+da+lepra+em+Portugal.+Porto:+%5Bs.n.%5D,+1932.&source=bl&ots=aGimBlrhao&sig=ACfU3U2JbpPPZ1hRXRkOfmfX_nFCne09TQ&hl=pt-BR&sa=X&ved=2ahUKEwjW-5L-xp_0AhUOrJUCHSKED18Q6AF6BAgVEAM#v=onepage&q=CARVALHO%2C%20A.S.%20Hist%C3%B3ria%20da%20lepra%20em%20Portugal.%20Porto%3A%20%5Bs.n.%5D%2C%201932.&f=false. Acesso em: 17 nov. 2021.

BARBOSA JÚNIOR, A. de A. *et al.* Classificação histopatológica retrospectiva de 1.108 biópsias de pele de pacientes com suspeita clínica de hanseníase provenientes do Estado da Bahia, nordeste do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, n. 06, p. 533-537, nov/dez. 1998. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/Myj8Wm9RVvbw9KYQvbhzJ5q/?lang=en&format=pdf>. Acesso em: 13 set. 2021.

BELACHEW, W.A. & NAAFS, B. Position Statement: LEPROSY: Diagnosis, treatment and follow-up. **Journal of The European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 33, n. 07, p. 1205-2013. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30945360/>. Acesso em: 22 mar. 2022.

BENJAK, A. *et al.* Phylogenomics and antimicrobial resistance of the leprosy bacillus *Mycobacterium leprae*. **Nature Communications**, v. 9, n. 352. 2018. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41467-017-02576-z#citeas>. Acesso em: 2 dez. 2021.

BENNETT, B.H. *et al.* Leprosy: steps along the journey of eradication. **Public Health Reports**, v. 123, Mar/Apr. 2008. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2239329/pdf/phr123000198.pdf>. Acesso em: 18 nov. 2021.

BHARADWAJ, M. *et al.* Detection and Characterisation of all oreactive T cells. In: Immunogenetics: methods and applications in clinical practice. **Methods in molecular biology**, New York, v. 882, p. 309-337. 2012. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-61779-842-9_18. Acesso em: 23 mar. 2022.

BÍBLIA. Levítico. **Bíblia Online: Antigo Testamento**. Disponível em: <https://www.bibliaonline.com.br/acf/lv/13>. Acesso em: 13 set. 2021.

BLEVINS, K.E. *et al.* Evolutionary history of *Mycobacterium leprae* in the Pacific Islands. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: biological sciences**, n. 375. 2020. Disponível em: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rstb.2019.0582>. Acesso em: 02 dez. 2021.

BRASIL. **Decreto 5.156, de 8 de março de 1904**. Dá novo regulamento aos serviços sanitários à cargo da União. Rio de Janeiro, 1904. Disponível em: <https://www2.camara.leg.br/legin/fed/decret/1900-1909/decreto-5156-8-marco-1904-517631-publicacaooriginal-1-pe.html>. Acesso em: 24 nov. 2021.

BRASIL. **Decreto 13.001, de 1º de maio de 1918**. Dispões sobre a organização das comissões de médicos e de auxiliares para o serviço de profilaxia rural. Rio de Janeiro: 1918. Disponível em: <https://www2.camara.leg.br/legin/fed/decret/1910-1919/decreto-13001-1-maio-1918-502844-publicacaooriginal-1-pe.html>. Acesso em: 24 nov. 2021.

BRASIL. **Decreto 3.987, de 2 de janeiro de 1920**. Reorganiza os Serviços da Saúde Pública. Rio de Janeiro, 1920. Disponível em: <https://www2.camara.leg.br/legin/fed/lei/1920-1929/lei-3987-2-janeiro-1920-570495-publicacaooriginal-93627-pl.html>. Acesso em: 24 nov. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias do SUS. **Relatório de Recomendação – Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas**. Brasília. 2021 a. Disponível em: http://conitec.gov.br/images/Consultas/Relatorios/2021/20211223_PCDT_Hanseniose.pdf. Acesso em: 21 jan. 2022

BRASIL. Ministério da Saúde. Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias do SUS. **Relatório de Recomendação – Teste de detecção molecular qualitativa do *Mycobacterium leprae* para o diagnóstico de Hanseníase**. Brasília. 2021 b. Disponível em: http://conitec.gov.br/images/Consultas/Relatorios/2021/20211119_Relatorio_teste_molecular_hanseniase_CP98.pdf. Acesso em: 21 jan. 2022

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria Ministerial 165, de 14 de maio de 1976**. Estabelece a Política de Controle da Hanseníase. Brasília: 1976. Disponível em: <https://periodicos.saude.sp.gov.br/index.php/hansenologia/article/download/35664/34074#:~:text=%C2%B0%20165%20de%20maio%20de%201976%2C,1>. Acesso em: 25 nov. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução nº 39 de 05 de junho de 2008**. Aprova o regulamento para a realização de pesquisa clínica e dá outras providências. 2008. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2008/res0039_05_06_2008_rep.html. Acesso em: 24. Nov. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. **Boletim Epidemiológico: Hanseníase**. Número Especial. Janeiro. 2021 c. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2021/boletim-epidemiologico-hanseniase-2021>. Acesso em: 29 nov. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. **Estratégia Nacional para o Enfrentamento da Hanseníase**. Brasília: 2020. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2020/estrategia-nacional-para-enfrentamento-da-hanseniase-2019-2022>. Acesso em: 25 nov. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Diretrizes para vigilância, atenção e eliminação da hanseníase como problema de saúde pública: manual técnico-operacional**. Brasília. 2016. Disponível em: http://portal.saude.pe.gov.br/sites/portal.saude.pe.gov.br/files/diretrizes_para_eliminacao_hanseniase_-_manual_-_3fev16_isbn_nucom_final_2.pdf. Acesso em: 20 jun. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Guia Prático sobre Hanseníase**. Brasília. 2017. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_pratico_hanseniase.pdf. Acesso em: 21 mar. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Serviço Nacional de Leprosia. **Tratado de Leprologia**. 2ª ed. Rio de Janeiro, v. 1, 1950. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cd06_15_1.pdf. Acesso em: 24 nov. 2021.

BUJANG, M.A. & ADNAN, T.H. Requirements for minimum sample size for sensitivity and specificity analysis. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 10, Oct. 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5121784/>. Acesso em: 18 mar. 2022.

CAVALIERE, I. **Hanseníase na História.** FIOCRUZ. Disponível em: <http://www.invivo.fiocruz.br/historia/hanseniaese-na-historia/>. Acesso em: 12 jun. 2021.

CHATTERJEE, G. *et al.* Bacillaemia in leprosy and effect of multidrug therapy. **Leprosy Review**, n. 60, p. 197-201. 1989. Disponível em: https://www.google.com/search?q=Bacillaemia+in+leprosy+and+effect+of+multidrug+therapy&sxsrf=AOaemvKSou2-t55sgJqmxPjTReJb9uenWA%3A1642774803744&ei=E8HqYYTALMWc5OUPxt6G-As&ved=0ahUKEwjElf2EhcP1AhVFDrkGHUavAb8Q4dUDCA4&uact=5&oq=Bacillaemia+in+leprosy+and+effect+of+multidrug+therapy&gs_lcp=Cgdnd3Mtd2l6EANKBAhBGABKBAhGGABQAFgAYKgDaABwAngAgAHCAyGbwgGSAQMwLjGYAQCgAQKgAQHAAQE&scient=gws-wiz#. Acesso em: 21 jan. 2022.

CLICK, E.S. *et al.* Detection of apparent cell-free *M. tuberculosis* DNA from plasma. **Scientific Reports**, v. 8, n. 645. 2018. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-17683-6>. Acesso em: 27 jan. 2021.

COLE, S.T. *et al.* Massive gene decay in leprosy bacillus. **Nature**, v. 409, Feb. 2001. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/35059006>. Acesso em: 08 set. 2021.

CUNHA, A.Z.S. da. Hanseníase: aspectos da evolução do diagnóstico, tratamento e controle. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 7, n. 2, p.235-242.2002. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/csc/a/6J8XQnCXtK4nmQSd5VCcsH/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 13 set. 2021.

DORIA, J.L. Apontamentos históricos sobre a lepra. **Anais do Instituto de Higiene e Medicina Tropical**, Nova Lisboa, v. 14, p. 109 – 115. 2014. Disponível em: <https://anaisiht.com/index.php/ihmt/article/download/155/127/>. Acesso em: 17 nov. 2021.

ECHEVARRÍA, J.R.G. Historia de La lepra, internacionalización de enfermedades con la conquista de América y otras pandemias. **Revista de Leprología**, Valencia, v. XXVIII, n. 5, may-ago. 2012. Disponível em: <https://www.leprosy-information.org/media/328/download>. Acesso em: 16 nov. 2021.

EIDT, L.M. Breve história da Hanseníase: sua expansão do mundo para as Américas, o Brasil e o Rio Grande do Sul e sua trajetória na saúde pública brasileira. **Saúde e Sociedade**, v. 13, n. 02, p. 76-88, maio-ago. 2004. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/sausoc/a/nXWpzPJ5pfHMDmKZBqkSZMx/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 24. Nov. 2021.

FERREIRA, I.N. Um breve histórico da Hanseníase. **Humanidades & Tecnologia em Revista**, v. 16, ano XIII, jan-dez. 2019. Disponível em: http://revistas.icesp.br/index.php/FINOM_Humanidade_Tecnologia/article/view/681/491. Acesso em: 25 nov. 2021.

FIOCRUZ. **Catálogo de História oral: Memória e história da hanseníase no Brasil através de seus depoentes (1960-2000).** Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2010. Disponível em: https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/34944/2/catalogo_historia_oral.pdf. Acesso em: 25 nov. 2021.

FOSS, N.T. Aspectos Imunológicos da Hanseníase. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 30, p. 335-339, jul/set. 1997. Disponível em: <https://www.revistas.usp.br/rmrp/article/view/1186/1205>. Acesso em: 15 set. 2021.

GAMA, R.S. *et al.* High frequency of *M.leprae* DNA detection in asymptomatic household contacts. **Biomed Central Infectious Diseases**, v. 18, n. 153. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5879567/>. Acesso em: 13 jan. 2022.

GANDRA, A. Agência Brasil. **Brasil tem quase 30 mil novos casos de Hanseníase por ano**. Rio de Janeiro. 2021. Disponível em: <https://agenciabrasil.ebc.com.br/saude/noticia/2021-01/brasil-tem-quase-30-mil-novos-casos-de-hansenia-se-por-ano>. Acesso em: 26 nov. 2021.

GARCIA, J.R.L. Entre a “loucura” e a hanseníase: interfaces históricas das práticas e políticas instituídas. **Hansenologia Internationalis**, v. 26, n. 1, p. 14-22. 2001. Disponível em: <https://periodicos.saude.sp.gov.br/index.php/hansenologia/article/view/35329/33774>. Acesso em: 24 nov. 2021.

GARGANTILLA, P. **Breve história de La medicina – Desde El chamán a La gripe A.1^a**. ed. Madrid: Editora Nowtilus. 2011.

GOULART, I.M.B. *et al.* Asymptomatic leprosy on infection among blood donors may predict disease development and suggests a potential mode of transmission. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, i, 10, p. 3345 – 3348, Oct. 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4572540/#:~:text=After%20a%205%2Dyear%20follow,of%20leprosy%20transmission%20via%20transfusion>. Acesso em: 11 jan. 2022.

GREGÓRIO, V.R.N. **Estudo da Hanseníase em uma unidade de saúde do Recife**. 1999. 130 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Núcleo de Estudos em Saúde Coletiva, FIOCRUZ, Recife, 1999. Disponível em: <http://www.cpqam.fiocruz.br/bibpdf/1999gregorio-vrn.pdf>. Acesso em: 25 nov. 2021.

HONEIJ, J.A. Leprosy – The presence of acid-fast bacilli in the circulating blood and excretions. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 2, p. 376-387, Sep. 1915. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/30084226>. Acesso em: 13 jan. 2022.

HORWITZ, S. Leprosy in South Africa: a case study of Wesfort Leper Institution, 1898-1948. **African Studies**, v. 65, n. 2, Dec. 2006. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/00020180601035682?needAccess=true>. Acesso em: 18 nov. 2021.

HUDSON, J. *et al.* The cross-sectional cohort study: an underutilized design. **Epidemiology**, v. 16, i.3, may, 2005. Disponível em: [10.1097/01.ede.0000158224.50593.e3](https://doi.org/10.1097/01.ede.0000158224.50593.e3). Acesso em: 21 jun. 2022.

ITIS. ***Mycobacterium leprae***. Washington, EUA. 2020. Disponível em: https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=963824#null. Acesso em: 2 dez. 2021.

JUNIOR, L.A.R.F. *et al.* Leprosy: clinical and immunopathological characteristics. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.97, i.3, may-jun, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.abd.2021.08.006>. Acesso em: 20 jun. 2022.

KRALIK, P. & RICCHI, M. A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: definitions, parameters, and everything. **Frontiers in Microbiology**, v. 08, Feb, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00108>. Acesso em: 07 jan. 2022.

KRAMME, S. *et al.* Detection and quantification of *Mycobacterium leprae* in tissue samples by real-time PCR. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 193, p. 189-193. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00430-003-0188-8>. Acesso em: 12 jan. 2022.

LANE, J.E. *et al.* *Mycobacterium leprae* in untreated lepromatous leprosy: more than skin deep. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 31, n. 3, p. 469-470, May. 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16681612/>. Acesso em: 13 jan. 2022.

MACIEIRA, S. Aspectos microbiológicos do *Mycobacterium leprae*. **Noções de Hansenologia**, Bauru, p. 13-17. 2000. Disponível em: http://hansen.bvs.ilsl.br/textoc/livros/OPROMOLLA_DILTOR_nocoos/PDF/aspecto_leprae.pdf. Acesso em: 3 dez. 2021.

MACIEL, R.M.T. A lepra no oriente e ocidente: da antiguidade à idade média. **Revista Mosaico**, v. 11, p. 131-143. 2018. Disponível em: <http://seer.pucgoias.edu.br/index.php/mosaico/article/view/6388/pdf>. Acesso em: 16 nov. 2021.

MANTA, F.S.N *et al.* Ultra-sensitive detection of *Mycobacterium leprae*: DNA extraction and PCR assays. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, May. 2020. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0008325>. Acesso em: 11 jan. 2022.

MARCIANO, L.H.S.C. *et al.* Epidemiological and geographical characterization of leprosy in a Brazilian hyperendemic municipality. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 34, n. 8, 2018. Disponível em: <https://www.scielosp.org/pdf/csp/2018.v34n8/e00197216/en>. Acesso em: 22 nov. 2021.

MARZLIAK, M.L.C. *et al.* Breve histórico sobre os rumos do controle da Hanseníase no Brasil e no Estado de São Paulo. **Hansenologia Internationalis**, v. 33, n. 2, suppl. 1, p. 39 – 44. 2008. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsp/a/g9j3P3hcbzr36bscttJc3Dk/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 24 nov. 2021.

MONOT, M. *et al.* On the origin of leprosy. **Science**, v. 308, n. 5724, p. 1040 – 1042. 2005. Disponível em: <https://hal.archives-ouvertes.fr/pasteur-00204117>. Acesso em: 09 set. 2021.

NUTZ, S.D. *et al.* Determination of the LOQ in real-time PCR by receiver operating characteristic curve analysis: application to qPCR assays for *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum*. **Anal Biochem**, v. 401, p. 717-726. 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21603916/>. Acesso em: 07 jan. 2022.

NOUSSITOU, J.W.F.M. & SANSARRICQ, H. The role of WHO in antileprosy drug trials. **The chemotherapy of leprosy today and tomorrow. Second International Leprosy Colloquium.** v. 46, Oct. 1975. Disponível em: http://leprev.ilsl.br/pdfs/1975/v46s1/pdf/pdf_full/v46s1.pdf. Acesso em: 22 nov. 2021.

OMS. **Diretrizes para o Diagnóstico, tratamento e prevenção da hanseníase.** 2019. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/274127/9789290227076-por.pdf>. Acesso em: 22 mar. 2022.

OMS. **Estratégia Mundial de Eliminação da Lepra 2016-2020: acelerar a ação para um mundo sem lepra.** 2016. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/208824/9789290225201-pt.pdf>. Acesso em: 23 nov. 2020.

OMS. **Rumo à zero hanseníase: estratégia global de hanseníase. 2021-2030.** 2021. Disponível em: <https://www.who.int/pt/publications/i/item/9789290228509>. Acesso em: 10 jan. 2022.

OPROMOLLA, D.V.A. **Noções de Hansenologia.** Bauru: Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato. 2000. Disponível em: http://hansen.bvs.ilsl.br/textoc/livros/OPROMOLLA_DILTOR_nocoos/PDF/apres.pdf. Acesso em: 16 nov. 2021.

PAHO. **Estratégia Global Aprimorada para a Redução Adicional da Carga da Hanseníase – Período do Plano: 2011 – 2015.** 2010. Disponível em: https://www.paho.org/bra/dmdocuments/LIVRO_GLP_SEA_GLP_2009-3_versaoWEB.pdf. Acesso em: 23 nov. 2021.

PAN, S. *et al.* Comparison of four DNA extraction methods for detecting *Mycobacterium tuberculosis* by real-time PCR and its clinical application in pulmonary tuberculosis. **Journal of Thoracic Disease**, v.5, n. 3, Jun. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23825755/>. Acesso em: 27 jan. 2022.

PAN, S-W. *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* – derived circulating cell-free DNA in patients with pulmonary tuberculosis and persons with latent tuberculosis infection. **PLOS ONE**. June 24. 2021. Disponível em: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0253879>. Acesso em: 27 jan. 2022.

PANDYA, S.S. The First International Leprosy Conference, Berlin, 1897: the politics of segregation. **História, Ciências, Saúde**, Rio de Janeiro, v. 1, s. 1, p. 161-177. 2003. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/hcsm/a/X65jRrbmLNMfhYNpsz7Tmbs/?format=pdf&lang=en>. Acesso em: 17 nov. 2021.

PEARSON, J.M.H. The problem of Dapsone-resistant leprosy. **International Journal of Leprosy**, v. 49, n. 4.1981. Disponível em: <http://ila.ilsl.br/pdfs/v49n4a05.pdf>. Acesso em: 19 nov. 2021.

PINTO, P.G.H. da R. O estigma do pecado: a lepra durante a idade média. **Revista de Saúde Coletiva**, v. 5, n. 1. 1995. Disponível em: <https://www.scielosp.org/pdf/physis/1995.v5n1/131-144/pt>. Acesso em: 16 nov. 2021.

R Core Team. **A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <https://www.R-project.org>. Acesso em: 24 nov. 2021.

REES, R.J.W. *et al.* Experimental and clinical studies on rifampicin in treatment of leprosy. **British Medical Journal**, v. 1, p. 89-92. 1970. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1699176/pdf/brmedj02269-0051.pdf>. Acesso em: 19 nov. 2021.

REIS, E.M. *et al.* *Mycobacterium leprae* DNA in peripheral blood may indicate a bacilli migration route and high-risk for leprosy onset. **Clinical Microbiology and Infection. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 20, p. 447-452. 2013. Disponível em: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1198743X14600823?token=180BEE4022CD281159B07439FD9328F6272AF123390EC84A7C53AA30E5D6E39EE948774CFE465C5225E82103B872CCA3&originRegion=us-east-1&originCreation=20220111122612>. Acesso em: 11 jan. 2022.

RICCÒ, M. *et al.* Epidemiology of leprosy in Italy (1920-2019): a comprehensive review on existing data. **Acta Biomed**, v. 90, n. 9, p.7-14. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7233659/pdf/ACTA-90-7.pdf>. Acesso em: 13 set. 2021.

SCOLLARD, D.M. *et al.* The continuing challenge of leprosy. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 2, p. 338-381, Apr. 2006. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1471987/pdf/0036-05.pdf>. Acesso em: 22 mar. 2022.

SEVILHA-SANTOS, L. *et al.* Standardization of SYBR Green-Based Real-Time PCR Through the Evaluation of Different Thresholds for Different Skin Layers: An Accuracy Study and Track of the Transmission Potential of Multibacillary and Paucibacillary Leprosy Patients. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, Dec. 2021. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.758222/full>. Acesso em: 28 jan. 2022.

SHEPARD, C.C. The experimental disease that follows the injection of human leprosy bacilli into foot-pads of mice. **Journal of Experimental Medicine**, v. 1, n. 112 (3), p. 445-454, Sep. 1960. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2137235/pdf/445.pdf>. Acesso em: 19 nov. 2021.

SHEPARD, C.C. & CHANG, Y.T. Activity of antituberculosis drugs against *Mycobacterium leprae* – Studies with experimental infection of mouse footpads.

International Journal of Leprosy and other Mycobacterial Diseases, v. 32, n. 3, Jul-Aug.-Sep. 1964. Disponível em: <http://ila.ils.br/pdfs/v32n3a03.pdf>. Acesso em: 19 nov. 2021.

SILVA, C.L.M. *et al.* Spatial distribution of leprosy in Brazil: a literature review. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 4, Jul-Aug. 2017. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/HHwktKQ57mfvDjbn9qh3TWK/?format=pdf&lang=en>. Acesso em: 22 nov. 2021.

SILVA, J.S.R. *et al.* Variáveis Clínicas associadas ao grau de incapacidade física na hanseníase. **Revista Cuidarte**, Colômbia, v. 10, n. 1, ene-abr. 2019. Disponível em: <https://revistas.udes.edu.co/cuidarte/article/view/618/1058>. Acesso em: 13 set. 2021.

SOUZA-ARAÚJO, H.C. de. **História da Lepra no Brasil: Períodos colonial e monárquico**. **Imprensa Nacional**. Rio de Janeiro, v.1. 1946. Disponível em: <http://www.acidadeinventada.com.br/static/files/administration-office/volume-i.pdf>. Acesso em: 17 nov. 2021.

SOUZA, C.S. Hanseníase: formas clínicas e diagnóstico diferencial. **Medicina. Ribeirão Preto**, v. 30, p. 325-334, jul-set. 1997. Disponível em: <https://www.revistas.usp.br/rmrp/article/download/1185/1204/2045>. Acesso em: 16 set. 2021.

STROUN, M. *et al.* Isolation and characterization of DNA from plasma of cancer patients. **European Journal of Cancer and Clinical Oncology**, v. 23, n. 6, p. 707- 712, Jun. 1987. Disponível em: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/0277537987902665?token=CB162770E51B63AC1C8B0D84297C92743D9D07C0ADA85454DF67BC3CCB37567A610A15698C2D432CE040118268DAC86B&originRegion=us-east-1&originCreation=20220126152227>. Acesso em: 26 jan. 2022.

TALHARI, C. *et al.* Clinical aspects of leprosy. **Clinics in Dermatology**, v. 33, p. 26-37. 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0738081X14001448?via%3Dihub>. Acesso em: 13 set. 2021.

TRAUTMAN, J.R. A brief history of Hansen's disease. **Bulletin of the New York Academy of Medicine**, v. 60, n. 7, Sep. 1984. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1911721/pdf/bullnyacadmed00073-0005.pdf>. Acesso em: 09 set. 2021.

VOGEL, F. *et al.* ABO blood groups, leprosy and serum proteins. **Humangenetic**, v. 7, n. 2, p. 149-162. 1969. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1468595/>. Acesso em: 16 nov. 2021.

YANG, X. *et al.* Cell-free *Mycobacterium tuberculosis* DNA test in pleural effusion for tuberculous pleurisy: a diagnostic accuracy study. **Clinical and Microbiology Infection**, v. 26, n. 8. 2020. Disponível em: [https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(19\)30628-7/pdf](https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(19)30628-7/pdf). Acesso em: 27 jan. 2022.

WHO. **Action Programme for the Elimination of Leprosy**. 1996. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/63106>. Acesso em: 16 nov. 2021.

WHO. Expert Committee on Leprosy. First Report. **World Health Organization Technical Report Series**, Geneva, n. 71, Sep. 1953. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/40218/WHO_TRS_71.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acesso em: 19 nov. 2021.

WHO. Expert Committee on Leprosy. Second Report. **World Health Organization Technical Report Series**, Geneva, n. 189, Sep. 1960. Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/40454/WHO_TRS_189.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acesso em: 19 nov. 2021.

WHO. **Chemotherapy of leprosy for control programmes**. Geneva, 1982. Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/38984/WHO_TRS_675.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acesso em: 22 nov. 2021.

WHO. **WHA44.9 Leprosy**. 1991. Disponível em: https://www.who.int/neglected_diseases/mediacentre/WHA_44.9_Eng.pdf. Acesso em: 22 nov. 2021.

WHO. **Multidrug therapy against leprosy: Development and Implementation over the past 25 years**, Geneva, 2004. Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42970/9241591765_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acesso em: 22 nov. 2021.

WHO. **Leprosy– Number of New Cases: 2020**. 2021. Disponível em: https://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/leprosy/leprosy.html. Acesso em: 01 dez. 2021.