

Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**AVALIAÇÃO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE
QUANTITATIVA NA DETECÇÃO DE *Mycobacterium leprae* EM
CASOS DE HANSENÍASE DE DIFÍCIL DIAGNÓSTICO**

MARIA GLÁUCIA SILVA DE LIMA

Manaus 2015

Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**Avaliação da Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa na
detecção de *Mycobacterium leprae* em casos de hanseníase de
difícil diagnóstico**

Maria Gláucia Silva de Lima

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do
Amazonas para obtenção do título de Mestre em ciências da Saúde.

Área de Concentração: Biodiversidade Amazônica Aplicada às doenças regionais

Orientador (a): Dra. Carolina Chrusciak Talhari Cortez

Co-orientador: Dr. Milton Ozório Moraes

Manaus – AM

2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio, convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

L732a	<p>Lima, Maria Gláucia Silva de Avaliação da reação em cadeia da polimerase quantitativa na detecção de mycobacterium leprae em casos de hanseníase de difícil diagnóstico / Maria Gláucia Silva de Lima. 2015 82 f.: il. color; 31 cm.</p> <p>Orientadora: Carolina Chrusciak Talhari Cortez Orientador: Milton Ozório Moraes Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal do Amazonas.</p> <p>1. hanseníase. 2. Diagnóstico. 3. Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa. 4. Número de genomas. I. Cortez, Carolina Chrusciak Talhari II. Universidade Federal do Amazonas III. Título</p>
-------	---

MARIA GLÁUCIA SILVA DE LIMA

Avaliação da Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa na detecção de *Mycobacterium leprae* em casos de hanseníase de difícil diagnóstico.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós graduação em Universidade Ciências da Federal Saúde do da Amazonas Faculdade para de Medicinaobtenção doda título de Mestre em ciências da Saúde.

COMISSÃO JULGADORA

Julgamento: _____ Assinatura _____

Julgamento: _____ Assinatura _____

Julgamento: _____ Assinatura _____

Prof(a). Dr(a). Carolina Chrusciak Talhari Cortez Instituição: UEA

Aprovada em:

Local da defesa:

DEDICATÓRIA

À minha Mãe que nunca me deixou desistir, sempre me ensinando que seguir em frente é o melhor caminho. Que sempre esteve ao meu lado, me dando amor, ensinamentos valiosos e todo apoio que precisei e preciso para seguir em frente.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais que sempre me dão forças para continuar, estão ao meu lado em todos os momentos, e me transmitem alegria para conduzir a vida.

Aos meus orientadores Dra. Carolina Chrusciak Talhari Cortez e Dr. Milton Ozório Moraes, pela oportunidade de tê-los como orientadores, por todo conhecimento transmitido, e em especial pela paciência que tiveram ao longo desse período.

Ao Daniel Lúcio Rodrigues Dutra, que me ajudou a dar o pontapé inicial para esse projeto de mestrado.

Aos responsáveis pelo laboratório de Biologia Molecular da Fundação Alfredo da Matta, Cynthia de Oliveira Ferreira e André Luiz Leturiondo, por me acompanhar, orientar e aconselhar nessa trajetória.

À Dra. Fabíola da Costa Rodrigues, que acreditou que era possível e que tanto se dedicou para que fosse possível concluir este trabalho com sucesso.

Ao Dr. Adalberto Rezende Santos pelo auxílio de extrema importância na fase final do projeto.

À toda equipe do laboratório de Biologia Molecular da Fundação Alfredo da Matta, pelo auxílio em todas as etapas do projeto, principalmente nessa fase final que foi de extrema importância para que o trabalho fosse concluído.

Aos meus amigos Thiago Costa Barbosa, Camila Gurgel dos Santos e Thielle Pereira da Cruz, pela prontidão em ajudar sempre que necessário, pelo companheirismo e amizade de longa data.

Aos funcionários do setor de cirurgia, e do Laboratório de Histopatologia da Fundação Alfredo da Matta por me auxiliarem na obtenção das amostras para o projeto.

Às funcionárias do setor de Prontuários da Fundação Alfredo da Matta, pela disposição em ajudar na difícil missão de levantar os dados dos pacientes.

À Idenil de Melo Albuquerque Brito, funcionária do setor de Patologia da Universidade do Estado do Amazonas, pela gentileza com que me ajudou a fazer os cortes das amostras.

Ao Dr. Antônio Pedro Mendes Schettini pela gentileza, alegria e dedicação, e pela revisão das lâminas de histopatologia.

À Gerência de Laboratórios da Fundação Alfredo da Matta, que me ajudou sempre que possível.

Às funcionárias do Departamento de Ensino e Pesquisa da Fundação Alfredo da Matta, por sua simpatia, cuidado e pela atenção que dedicam aos alunos.

Aos funcionários do setor de Epidemiologia da Fundação Alfredo da Matta por serem tão prestativos, atenciosos e educados.

Ao Dr. Felipe Gomes Naveca e a Msc. Tatiana Amaral Pires de Almeida, da Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Leonidas e Maria Deane – AM, pela ajuda na realização de experimentos.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Amazonas, obrigada pela dedicação e pela atenção.

À Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Amazonas pela oportunidade de realização do curso de Mestrado.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

O conhecimento nos faz responsáveis.

(Che Guevara)

RESUMO

A importância da Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa na detecção do *Mycobacterium leprae* em casos de hanseníase de difícil diagnóstico.

A hanseníase é doença infecto-contagiosa causada pelo *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) que afeta principalmente a pele e nervos periféricos e pode causar incapacidades físicas as quais evoluem, potencialmente, para deformidades físicas permanentes. O paciente hanseniano pode ser classificado como paucibacilar e multibacilar, sendo as formas paucibacilares de difícil diagnóstico. Novos métodos moleculares de alta sensibilidade e especificidade como PCR em Tempo Real qPCR, tem contribuído para diagnóstico da hanseníase, principalmente nos casos de difícil diagnóstico. Este estudo foi desenvolvido na Fundação de Dermatologia Tropical e Venereologia Alfredo da Matta, Manaus – Amazonas, no período de março de 2014 a agosto de 2015, e teve o intuito de validar a técnica de qPCR na detecção de *M. leprae* em biópsias cutâneas de pacientes com suspeita clínica de hanseníase e submetidos a exame histopatológico. As amplificações por qPCR a partir de uma sequência específica do gene 16S de *M. leprae* foram realizadas em 180 amostras, das quais, 82 eram biópsias frescas e 98 biópsias parafinadas. Das biópsias frescas, foram analisadas 65 amostras, entre as quais estão 9 amostras de pacientes com outras dermatoses, 12 amostras clinicamente inconclusivas e 38 amostras de pacientes com hanseníase. Destes, 68,5% (26/38) foram positivos no teste molecular para a hanseníase e 33,3% (3/9) foram positivas para outras dermatoses. A sensibilidade foi de 68,5%, especificidade de 66,70%, com valor preditivo positivo de 89,7% e valor preditivo negativo de 33,3%. Entre as biópsias parafinadas, foram analisadas somente 61 amostras dos pacientes com hanseníase, as quais 73,8% foram positivas. Nestas amostras, o teste molecular apresentou sensibilidade de 73,8%. Além disso, o número de genomas foi estimado nos dois grupos de biópsias e variou de 8,53 (em uma biópsia parafinada) a 2.060.230 (em uma biópsia fresca). Os dados sugerem claramente que o qPCR confirmam a diferença entre pacientes MB e PB tanto em biópsias frescas quanto em biópsias parafinadas sendo que as quantidades de genomas percentualmente e quantitativamente foi maior em pacientes MB no grupo de amostras frescas quando comparado ao grupo de amostras parafinadas. Curiosamente, os dados quantitativos nas amostras de pacientes PB embora apresentem menor número de genomas, tem também um percentual maior de positividade. Apesar de ajustes necessários para melhorar a eficiência da reação, os resultados nos mostram que o teste pode ser útil, em especial nos casos inconclusivos e de difícil diagnóstico, como nas formas paucibacilares quando o número de genomas for alto (maior que 50) que diminui o risco de falsos positivos.

Palavras Chave: hanseníase. Diagnóstico. Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa. Número de genomas.

ABSTRACT

A importância da Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa na detecção do *Mycobacterium leprae* em casos de hanseníase de difícil diagnóstico.

Leprosy is an infectious disease caused by *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) that affects the skin and peripheral nerves and can cause physical disabilities which evolve to permanent physical deformities. The leprosy patient can be classified as paucibacillary and multibacillary and paucibacillary forms difficult to diagnose. New molecular methods of high sensitivity and specificity as RT-PCR qPCR, has contributed to leprosy diagnosis, especially in cases of difficult diagnosis. This study was developed in Fundação de Dermatologia Tropical e Venereologia Alfredo da Matta, Manaus – Amazonas, from March 2014 to August 2015, and we aimed to validate the qPCR technique in the detection of *M. leprae* in skin biopsies patients with clinical suspicion of leprosy and subjected to histopathological examination. The qPCR amplifications from a specific sequence of the 16S gene from *M. leprae* were performed on 180 samples, of which 82 were fresh biopsies and 98 paraffin biopsies. From Fresh biopsies were analyzed 65 samples, of which 9 are samples of patients with other dermatoses, 12 clinically inconclusive samples and 38 samples from patients with leprosy. Of these, 68.5% (26/38) were positive in molecular test for leprosy and 33,3% (3/9) were positive for other dermatoses. The sensitivity was 68.5%, specificity of 66.70%, with positive predictive value of 89.7% and a negative predictive value of 33.3%. Among the paraffin biopsies were analyzed 61 samples from patients with leprosy, which 73.8% were positive. In these samples, the molecular test had a sensitivity of 73.8%. Furthermore, the number of genomes was estimated in both groups biopsies and ranged from 8.53 (paraffin in a biopsy) to 2,060,230 (on a fresh biopsy). This data suggest that the qPCR confirm the difference between patients MB and PB both fresh biopsies as for paraffin biopsies and the amounts of genomes percentage and quantity was greater in MB patients in the fresh specimens group compared to the group of paraffin samples. Interestingly, the figures in the samples of PB patients even though they have fewer genomes, also has a higher percentage of positivity. Despite adjustments to improve the reaction efficiency, the results show that the test can be useful, particularly in inconclusive cases and difficult diagnosis, as in Paucibacillary forms when the number of genomes is high (greater than 50) reduces the risk of false positives.

Keywords: leprosy. Diagnoses. Quantitative Polimerase chain reaction. Genome copies.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Genoma do <i>Mycobacterium leprae</i>	21
Figura 2 - Morfologia do <i>Mycobacterium leprae</i> e formação de globias.....	22
Figura 3 - Classificação da hanseníase segundo Rabello, 1937.....	23
Figura 4 – Classificação da hanseníase Madri, 1953.....	23
Figura 5 – Classificação da hanseníase segundo Ridley e Jopling, 1974.....	24
Figura 6 – Classificação operacional para instituição do tratamento, com base na baciloscopia.....	24
Figura 7 - Classificação operacional para instituição do tratamento, com base no número de lesões.....	25
Figura 8 – Lesão única, plana, hipocrômica, em HI; B: Lesão única, com bordas delimitadas e perda de pelos em HT; C: Lesões infiltradas na face em HV; D: Placas eritematosas, descamativas e infiltradas, com bordas internas bem delimitadas em HD.....	27
Figura 9 – Coeficiente de prevalência da hanseníase no mundo em 2011.....	28
Figura 10 - Coeficiente de Prevalência de hanseníase no Brasil, por município.....	29
Figura 11 – Detecção da hanseníase no Estado do Amazonas em 2014.....	30
Figura 12 – Gráfico com o percentual de casos de hanseníase, segundo o modo de entrada.....	31
Figura 13 – Gráfico com o percentual de casos detectados de hanseníase, segundo a faixa etária (FUAM 2000-2014).....	32
Figura 14 – Gráfico mostrando percentual de casos detectados de hanseníase segundo classificação operacional (multibacilares e paucibacilares) (FUAM 200-2014).....	33
Figura 15 – Aspectos imunopatológicos nas diferentes formas da hanseníase.....	36

Figura 16 - Gráfico de dispersão em relação à classificação operacional MB e PB <i>versus</i> o número de genomas (MB: multibacilar; PB: paucibacilar; Ct: <i>Cycle threshold</i> ; N ^o : número). A quantidade de genomas está representado em escala logarítmica.....	50
Figura 17- Árvore de decisão clínica proposta por Barbieri <i>et al.</i> , 2014.....	52
Figura 18 - Relação entre a classificação operacional MB e PB <i>versus</i> o número de genomas (MB: multibacilar; PB: paucibacilar; Ct: <i>Cycle threshold</i> ; N ^o : número). A quantidade de genomas está representado em escala logarítmica.....	54
Figura 19 - Relação entre os tipos de biópsias <i>versus</i> o número de genomas (MBf: multibacilar biópsia fresca; MBp: multibacilar biópsia parafinada; PBf: paucibacilar biópsia fresca; PBp: paucibacilar biópsia parafinada; Ct: <i>Cycle threshold</i> ; N ^o : número; p: p-valor). A quantidade de genomas está representado em escala logarítmica.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Apresentação descritiva dos pacientes com outras dermatoses testados.....	47
Tabela 2- Desempenho do Teste Molecular para o alvo 16S de <i>Mycobacterium leprae</i> em relação a Classificação Operacional em biópsias frescas.....	48
Tabela 3- Análise de desempenho epidemiológico do teste de qPCR para hanseníase com relação às biópsias frescas.....	49
Tabela 4 - Análise descritiva dos pacientes com diagnóstico inconclusivo para hanseníase em relação às biópsias frescas.....	51
Tabela 5- Desempenho do Teste Molecular para o alvo 16S de <i>Mycobacterium leprae</i> em relação a Classificação Operacional em biópsias parafinadas.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µL	Microlitro
BAAR	Bacilo Álcool Ácido Resistente
BB	<i>Borderline Borderline</i>
BT	<i>Borderline</i> Tuberculoide
BV	<i>Borderline</i> Virchowiana
CEP	Comitê de Ética e Pesquisa
Ct	<i>Cicle threshold</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FUAM	Fundação Alfredo da Matta
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
MDTU	Multidrogaterapia Única
MHD	Hanseníase Dimorfa
MHI	Hanseníase Indeterminada
MHT	Hanseníase Tuberculoide
MHV	Hanseníase Virchowiana

IB	Índice Baciloscópico
<i>IFN</i> -gama	Interferon- gama
IGRA	<i>Interferon Gamma Releasing Assay</i>
MB	Multibacilar
mm	Milímetro
OMS	Organização Mundial da Saúde
pb	Pares de Bases
PB	Paucibacilar
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PGL-I, PQT	Antígeno Glicolípido Fenólico-I Poliqumioterapia
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAm	Acido Ribonucleico mensageiro
RT PCR	Reação em Cadeia da Polimerase Transcriptase Reversa
TCLE	Termo de Consentimento Livre Esclarecido
TT	Tuberculoide Tuberculoide
VPN	Valor Preditivo Negativo
VPP	Valor Preditivo Positivo
VV	Virchowiana Virchowiana

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.2. AGENTE ETIOLÓGICO E DOENÇA.....	19
1.3. CLASSIFICAÇÃO DA HANSENÍASE.....	22
1.4. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA HANSENÍASE.....	25
1.5. EPIDEMIOLOGIA DA HANSENÍASE.....	27
1.6. DIAGNÓSTICO DA HANSENÍASE.....	33
1.6.1. Baciloscopia.....	34
1.6.2. Histopatologia.....	35
2. JUSTIFICATIVA.....	38
3. OBJETIVOS.....	39
3.1. OBJETIVO GERAL.....	39
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.1. TIPO DE ESTUDO.....	40
4.2. ASPECTOS ÉTICOS.....	40
4.3. AMOSTRAGEM.....	40
4.4. COLETA DE AMOSTRAS.....	41
4.5. EXTRAÇÃO DE DNA.....	41
4.6. QUANTIFICAÇÃO DE DNA POR FLUORIMETRIA.....	41
4.7. ENSAIO DE DETECÇÃO DE DNA DE <i>M. leprae</i> UTILIZANDO qPCR.....	42
4.8. QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA.....	43
4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	43
5. RESULTADOS.....	45
5.1. ANÁLISE EM BIÓPSIAS CONGELADAS APÓS COLETA.....	45
5.2. TESTE DE EFICIÊNCIA EM AMOSTRAS DE PARAFINA.....	50
6. DISCUSSÃO.....	55
7. CONCLUSÃO.....	63
8. REFERÊNCIAS.....	63
9. ANEXOS.....	71
ANEXO I - TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE).....	71
ANEXO II - Tabela geral dos pacientes avaliados neste estudo.....	74

1. INTRODUÇÃO

1.1. HISTÓRICO

O médico pesquisador norueguês Gerhard Henrik Armauer Hansen identificou, em 1873, o agente causador da hanseníase, o *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), em lesões de pacientes, sendo assim, a primeira bactéria patogênica associada à doença nos seres humanos. Esta doença, conhecida desde os tempos bíblicos como lepra, posteriormente passou a chamar-se hanseníase, em homenagem ao seu descobridor (FOSS, 1999; GOMES, 2000).

Descrições da hanseníase foram vistas no manuscrito chinês "Remédios Secretos Completos", que foi escrito aproximadamente 190 a.C. Neste manuscrito está descrita uma doença que provocava a perda de sensibilidade, aparecimento de manchas vermelhas que inchavam e ulceravam, queda de sobrancelhas, cegueira, deformidade nos lábios, rouquidão, ulceração nos pés, desabamento de nariz e deslocamento de articulações (SKINSNES, 1973).

Na Europa, a hanseníase era desconhecida na época de Hipócrates (467 a.C.), o Pai da Medicina, tendo em vista que em seus trabalhos não há relatos de pacientes em condições que se assemelhassem à esta doença. As tropas de Alexandre o Grande (300 a.C.), ao voltarem para a Europa após suas conquistas, teriam trazido pessoas com a doença nas campanhas da Índia. Em 150 d.C. a doença já era conhecida na Grécia em relatos feitos por Aretaeus e Galeno, entretanto, não referenciavam distúrbios de sensibilidade da pele. Após a queda do império Romano, a doença foi se difundindo pela Europa com alta prevalência no período das cruzadas. Ainda no período das cruzadas, surgiram as casas de Lázaro, que eram locais onde indivíduos infectados eram isolados e tratados em regime domiciliar. A piedade pelos hansenianos era incentivada pela Igreja Católica e o diagnóstico era dado sem rigor, onde provavelmente haviam pacientes com outras dermatoses (SABIN, 2005).

A hanseníase sempre esteve associada à segregação e era considerada por muitos como punição ou castigo divino, além de ser considerada uma doença altamente contagiosa. Os hansenianos temiam agressões, eram isolados da

sociedade, passando a viver em leprosários e eram obrigados a viver com sinos amarrados aos pés ou eram marcados na pele (KERLLESBERGER, 1951).

A Lei de Strasbourg, do final do século XV, determinava que quatro pessoas fossem designadas para examinar um hanseniano, sendo um médico, um cirurgião e dois barbeiros. Um dos testes realizados consistia de uma pequena amostra de sangue depositada em um recipiente com sal. Se o sangue se descompusesse o paciente seria considerado são, caso contrário, era considerado doente. O diagnóstico incorreto da doença pode ter contribuído para a alta prevalência. Contudo, no início do século XIX a hanseníase já havia praticamente desaparecido da Europa e acredita-se que isto estivesse relacionado às melhorias nas condições socioeconômicas (OPROMOLLA, 2000; SABIN, 2005).

Análises de sequências de DNA em diferentes cepas de *M. leprae* sugerem que esta bactéria tenha surgido no continente africano há 2400 anos a.C. e que posteriormente teria se disseminado para América do Sul e Ásia. É possível que a falta de conhecimento sobre o tratamento tenha facilitado a disseminação da doença (BHAT, 2012; PRAKASH, 2012). Sequências de DNA obtidas a partir dos restos mortais de um homem mumificado, em uma cidade próxima a Jerusalém, apontam ser este o caso mais antigo acometido pela hanseníase e que teria vivido aproximadamente entre 1-50 anos d.C., (MATHESON *et al.*, 2009).

Acredita-se que a hanseníase tenha chegado às Américas com os colonizadores por volta do século XVI, tendo em vista que não há registros da doença entre os índios do Novo Mundo. A ausência de relatos anteriores da doença, entre os índios brasileiros, reforça a hipótese de que a doença chegou ao Brasil com os colonizadores portugueses e os escravos africanos teriam contribuído para sua disseminação. Os primeiros casos de hanseníase no Brasil foram notificados no ano de 1600, no Rio de Janeiro. Alguns anos mais tarde, foi criada no Rio de Janeiro, a primeira casa de Lázaro, um abrigo para os pacientes hansenianos. Após os primeiros casos no Rio de Janeiro, a doença foi identificada no Pará e na Bahia. Em seguida, com o desenvolvimento de atividades no ramo da agricultura, a doença foi se espalhando pelo Brasil (EIDT, 2004).

No estado do Amazonas, acredita-se que a hanseníase tenha chegado por intermédio do Pará, já que este tinha alta prevalência da doença no início do século XIX, o que pode ter sido facilitado pelas atividades de comércio entre os dois estados, em especial entre as cidades de Manaus, Belém e Santarém. Segundo o médico

sanitarista Dr. Alfredo da Matta, o registro do primeiro hanseniano em Manaus é de 1908 (AMAZONAS, 1997).

O número de casos de hanseníase cresceu no estado do Amazonas, na década de 50 e em 28 de agosto de 1955 foi inaugurado o Dispensário Alfredo da Matta, conhecido como “Casa Amarela”. O nome foi uma homenagem ao Dr. Alfredo da Matta, um dos pioneiros a trabalhar no controle e tratamento da hanseníase no Amazonas. Em 1982, o Dispensário Alfredo da Matta passou a ser o Centro de Dermatologia e Venereologia Alfredo da Matta, com assistência a doenças dermatológicas, principalmente hanseníase e leishmaniose e atendimento ambulatorial a infecções sexualmente transmissíveis (FUAM, 2015).

Em 1987 o Centro de Dermatologia e Venereologia Alfredo da Matta foi credenciado pelo Ministério da Saúde como Centro de Referência Macrorregional em Hanseníase. E, em 1998 passou à condição de Fundação de direito público, chamando, até os dias atuais, de Fundação de Dermatologia Tropical e Venereologia Alfredo da Matta. A Fundação foi também credenciada como Centro Colaborador da Organização Mundial de Saúde para controle, treinamento e pesquisa em hanseníase para as Américas. Hoje, além do atendimento ambulatorial, a Fundação Alfredo da Matta oferece também o serviço de cirurgia dermatológica. Busca também o desenvolvimento de pesquisas científicas, para geração de conhecimento (FUAM, 2015).

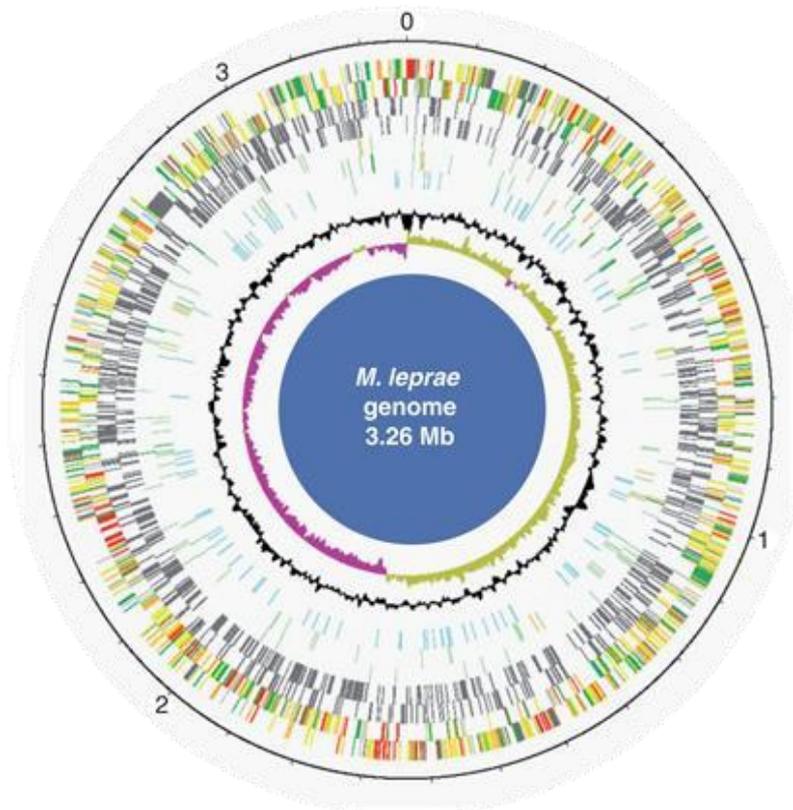
1.2. AGENTE ETIOLÓGICO E DOENÇA

A hanseníase é uma doença infecciosa-crônica, típica de humanos, causada pela infecção com *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), sua transmissão pode ocorrer através do contato íntimo e prolongado com o paciente das formas multibacilares não tratadas, ou pelo contato direto com solução de continuidade da pele dos mesmos (WOROBEK, 2012). Após a infecção, o quadro clínico pode evoluir de acordo com o grau de suscetibilidade específica e individual (genética e imunológica) do paciente, seja para a regressão espontânea, seja para o agravamento progressivo. Nestes casos, podemos observar um comprometimento gradual da pele, mucosas das vias aéreas superiores, olhos, vísceras abdominais, linfonodos, medula óssea, testículos e ovários, causando sérias incapacidades físicas e sociais (GALLO *et al in* COURA *et al.*, 2005). Assim, segundo a definição da Organização Mundial de Saúde (OMS), um

caso de hanseníase é representado por um indivíduo que apresentar uma ou mais das seguintes características: lesão de pele com alteração de sensibilidade; acometimento de nervo com espessamento e baciloscopia positiva (OMS, 2012).

O *M. leprae* pertence a ordem Actinomycetales, família Mycobacteriaceae, gênero *Mycobacterium* e apresenta-se como bastonete reto ou ligeiramente encurvado, de 1,5 a 8 μm de comprimento por 0,2 a 0,5 μm de largura. Ele é um patógeno intracelular obrigatório que tem tropismo por células de Schwann nos nervos periféricos e por macrófagos na pele (RIDLEY & JOPLING, 1966; MACIEIRA, 2000). Em virtude disso, as principais manifestações clínicas da hanseníase incluem lesões de pele, mucosas e nervos, sendo a infecção do tecido nervoso responsável pela perda de sensibilidade local típica da doença (BRITTON & LOCKWOOD, 2004).

O *M. leprae* foi a primeira bactéria patogênica humana a ser identificada e seu genoma foi um dos primeiros a ser sequenciado de forma completa. O seu genoma sofreu redução evolutiva e hoje apresenta 3.268.203 pares de bases (pb), com 1.614 genes codificadores de proteínas e contém 1.116 pseudogenes (Figura 1). O *M. leprae* possui uma taxa de deleção de pseudogenes lenta, diferente do observado na maioria das bactérias, há uma retenção de aproximadamente 89% dos nucleotídeos de pseudogenes no *M. leprae*. O sequenciamento do genoma de *M. leprae* possibilitou o aprimoramento das técnicas diagnósticas, ampliou o entendimento das bases genéticas, a fisiologia e patogenicidade da bactéria (SINGH & COLE, 2011).



Fonte: Adaptado de SINGH, COLE, 2011.

Figura 1 – Genoma do *Mycobacterium leprae*.

O bacilo se reproduz por divisão binária simples, em média a cada 10 a 16 dias. As características imunológicas dos doentes estão associadas ao tempo de incubação, sendo em média de 2-5 anos para os paucibacilares e de 5 a 10 anos para os multibacilares. O bacilo se instala no organismo, apresenta alta infectividade e baixa patogenicidade, ou seja, infecta muitas pessoas, no entanto poucas adoecem (ROSA *et al*, 2013). Cora-se em vermelho pela fucsina e não se descolora pelo álcool e ácidos, sendo, portanto, denominado bacilo álcool-ácido resistente (BAAR). Os bacilos podem ser vistos uniformemente corados (sólidos), irregularmente corados (fragmentados) ou granuloso, como apresentado na Figura 2. Podem ser encontrados aglomerados formando estruturas arredondadas, denominadas globias (COLE *et al*, 2001).



Fonte: CDC, 2015.

Figura 2 - Morfologia do *Mycobacterium leprae* e formação de globias.

Devido à fisiologia do bacilo, que apresenta baixa virulência e alta infectividade bem como o longo período de incubação da hanseníase o completo entendimento sobre sua transmissão é um capítulo ainda não totalmente elucidado. Contudo, admite-se que a mesma ocorre através do contato íntimo e prolongado com pacientes das formas multibacilares não tratadas por intermédio das secreções das vias respiratórias como nariz e boca, ou pelo contato direto com solução de continuidade da pele dos mesmos. Desta forma, os indivíduos residentes na mesma casa (contatos domiciliares) são considerados um grupo de alto risco para o desenvolvimento da doença (DOULL *et al*, 1942; NOORDEEN, S.K, 1978).

A transmissão da doença ocorre principalmente, pelo convívio com doentes de formas multibacilares sem tratamento. O contato com doentes paucibacilares pode aumentar em até 2-3 vezes e com multibacilares em até 5-10 vezes o risco de adoecer. O bacilo já foi encontrado em tatus, chimpanzés e macacos e há casos que evidenciam a relação entre esses animais e infecção em humanos (BRASIL, 2002, OMS, 2012, TALHARI., 2015).

1.3. CLASSIFICAÇÃO DA HANSENÍASE

A hanseníase, no Brasil assim como outras doenças, tem recebido numerosas classificações. Rabello, em 1937, estabeleceu o conceito de formas polares para a hanseníase. A partir da forma indeterminada da doença (HI), os pacientes sem tratamento evoluiriam para a forma polar tuberculóide (HT), se apresentassem boa resposta imune celular; ou, para a forma virchowiana (HV), se não fossem capazes de

organizar resposta imune celular eficiente, permitindo a multiplicação do bacilo (RABELLO, 1937), como apresentado na Figura 3.

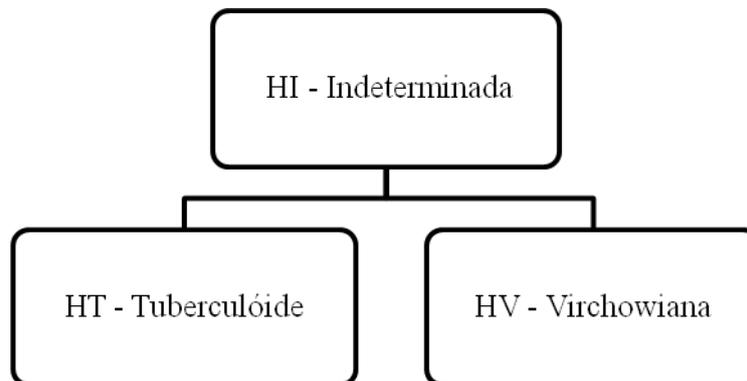


Figura 3 - Classificação da hanseníase segundo Rabello, 1937.

No Congresso de Leprologia realizado em Madri, em 1953, foram mantidos os critérios propostos por Rabello, acrescentando-se um novo grupo de pacientes, a que se denominou dimorfos ou *borderline* como apresentado na Figura 4. Este grupo, também, evoluiria a partir da forma indeterminada, porém, apresentava aspectos clínicos que não eram característicos das formas polares de HT e HV, tratava-se, portanto, de doentes interpolares. Na época, este grupo de enfermos foi definido como clinicamente instável e com tendência a evoluir para a forma virchowiana, se não tratados (MADRID, 1953).

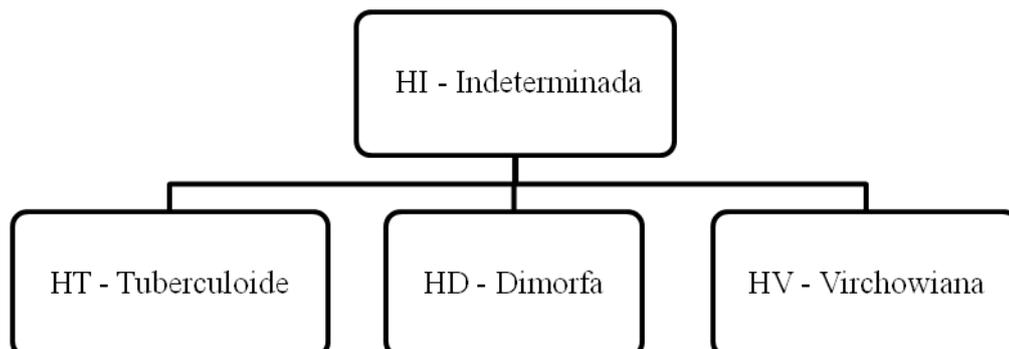


Figura 4 – Classificação da hanseníase Madri, 1953.

Na década de 1960, Ridley e Jopling, propuseram uma modificação na classificação de Madrid, introduzindo o conceito de classificação espectral da hanseníase, subdividindo os *borderline* ou “dimorfos” em *borderline-tuberculoides*

(BT), *borderline-borderline* (BB) e *borderline-Virchowiano* (BV). Foi mantido o conceito de polaridade da doença com as formas tuberculoides (TT) e virchowianas (VV) e esta classificação, denominada espectral, apresentada na Figura 5, fundamenta-se em parâmetros clínicos, imunológicos e histopatológicos (RIDLEY, 1974).

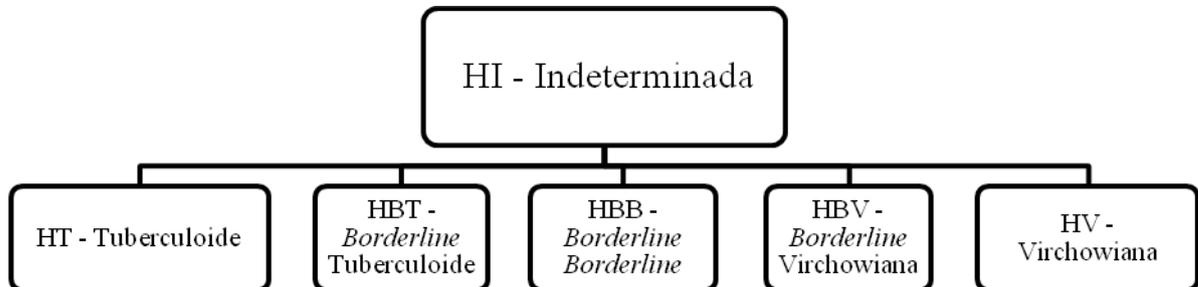


Figura 5 – Classificação da hanseníase segundo Ridley e Jopling, 1974.

A Organização Mundial de Saúde, em 1981, instituiu uma classificação operacional da hanseníase, visando o tratamento poliquimioterápico dos pacientes, como visto na Figura 6. Inicialmente, a classificação adotada pela OMS era de hanseníase paucibacilar (pacientes indeterminados, tuberculoides e a maioria dos *borderline-tuberculoides* - todos com baciloscopia negativa) e hanseníase multibacilar (*borderline-borderline*, *borderline-virchowiano* e virchowianos - todos com baciloscopia positiva). Nesta classificação o critério básico era a baciloscopia (WHO, 1981).

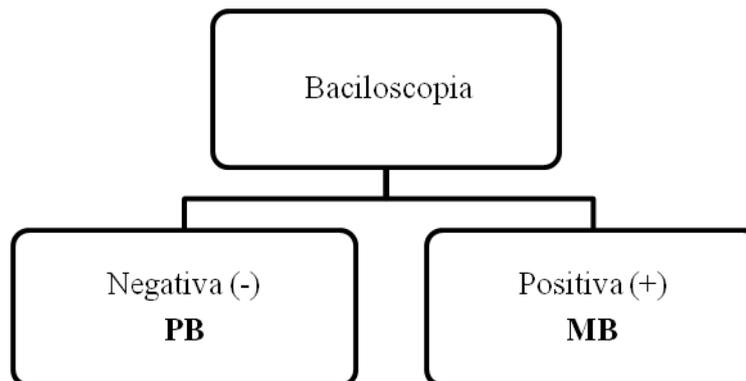


Figura 6 – Classificação operacional para instituição do tratamento, com base na baciloscopia.

A partir da década de 1990, a OMS tem estimulado os países endêmicos a classificar os pacientes de acordo com o número de lesões cutâneas (Figura 7), ou seja, pacientes com duas a cinco lesões (tratamento paucibacilar) e pacientes com mais de cinco lesões (tratamento multibacilar). Esta classificação não considera a

baciloscopia ou histopatologia e poderia implicar em erro no tratamento de alguns pacientes (WHO, 1994).



Figura 7 - Classificação operacional para instituição do tratamento, com base no número de lesões.

1.4. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA HANSENÍASE

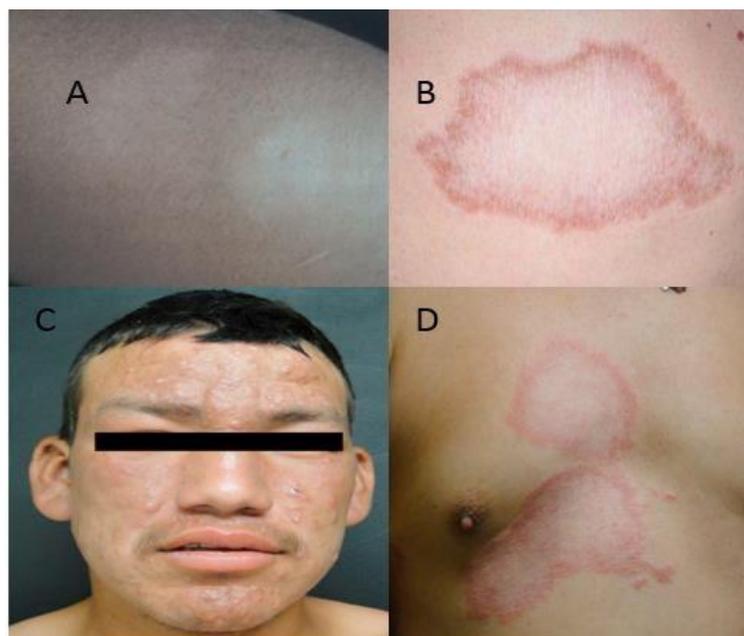
De acordo com a forma clínica apresentada, número de lesões, resposta imunológica e espessamento neural, a doença é classificada em quatro formas distintas: indeterminada, tuberculoide, Virchowiana e dimorfa.

- Hanseníase Indeterminada: Na maioria dos casos a hanseníase indeterminada evolui para a cura, em aproximadamente 25% dos casos evolui para as formas polares, essa evolução leva em média de 3 a 5 anos. Geralmente apresenta lesão única, hipocrômica, com alteração de sensibilidade ou áreas planas, limitadas de pele com aspecto normal, podendo ocorrer também a perda dos pelos e a diminuição da sudorese, a hanseníase indeterminada é mais comum em crianças (EICHELMANN, 2013; BRITTON & LOCKWOOD, 2004).

- Hanseníase Tuberculoide: Ocorre em indivíduos com alta resistência ao bacilo e os doentes desta forma apresentam lesão única, ou poucas lesões. As lesões são delimitadas e anestésicas, podendo ser eritematosas ou hipocrômicas, com bordas papulosas. Pode ocorrer lesão neural precoce e grave. Há alterações de sensibilidade térmica e dolorosa, e pode haver alteração de sensibilidade tátil em lesões antigas. Também é comum a perda dos pêlos e a diminuição da sudorese. Dentre as manifestações clínicas da hanseníase tuberculoide, as menos frequentes são as formas neural pura e nodular infantil (EICHELMANN, 2013, TALHARI, 2015). -

Hanseníase Virchowiana: Ocorre em indivíduos que apresentam baixa imunidade celular, favorecendo a multiplicação do bacilo. Caracteriza-se por placas infiltradas e nódulos, hansenomas, de coloração eritematosaacastanhada. A infiltração pode acometer a mucosa das vias aéreas superiores, olhos, testículos e nervos. Ocorre a perda dos pelos nos cílios e sobrancelhas, madarose. Observa-se também intensa infiltração da face e pavilhões auriculares. Frequentemente mãos e pés se infiltram e ficam ressecados. Pode ainda ocorrer acometimento do fígado, baço e medula óssea. A hanseníase virchowiana pode apresentar-se ainda na forma históide, onde predominam hansenomas com aspecto de fibromas ou quelóides (BRASIL, 2012; EICHELMANN, 2013).

- Hanseníase Dimorfa ou *Borderline*: Forma intermediária que resulta de instabilidade imunológica, apresentando grande variação de manifestações clínicas, podem se aproximar do polo tuberculoide ou virchowiano. A maioria dos casos progride para a forma virchowiana. Indivíduos com hanseníase dimorfa apresentam placas eritematosas, escamosas que podem ser circulares ou anulares, com bordas externamente difusas e bem definida. Pode ocorrer atrofia da lesão e perda de anexos. De acordo com Ridley & Jopling (1966), a hanseníase *borderline* pode apresentar 3 subgrupos, hanseníase *borderline-tuberculoide* (HBT), hanseníase *borderline-borderline* (HBB) e hanseníase *borderline-virchowiana* (HBV). Quando as bordas externas de lesões anulares são bem definidas, a doença progride para o pólo tuberculoide. Quando as bordas internas são bem definidas pode-se prever progressão para o pólo virchowiano. As manifestações clínicas da hanseníase podem ser as mais diversas, e dependem da interação entre o *M. leprae* e o hospedeiro. A Figura 8 mostra as diferentes manifestações clínicas da hanseníase (BRASIL, 2012; EICHELMANN, 2013; TALHARI, 2015).



Fonte: A - TALHARI, 2015; B, C e D EICHELHANN, 2013.

Figura 8 – **A:** Lesão única, plana, hipocrômica, em HI; **B:** Lesão única, com bordas delimitadas e perda de pelos em HT; **C:** Lesões infiltradas na face em HV; **D:** Placas eritematosas, descamativas e infiltradas, com bordas internas bem delimitadas em HD.

1.5. EPIDEMIOLOGIA DA HANSENÍASE

De acordo a Organização Mundial de Saúde, no primeiro trimestre de 2012, a prevalência mundial da hanseníase era de 181.941 doentes. Os novos casos de hanseníase detectados nas Américas tiveram uma queda de 37%, passando de 52.435, em 2003, para 33.084, em 2013. A grande maioria dos novos casos, cerca de 94%, foram reportados no Brasil. A hanseníase ainda configura importante problema de saúde pública no Brasil, país em que a diminuição da incidência é sutil, mesmo na vigência da poliquimioterapia desde meados da década de 1980. No país, a doença é considerada como negligenciada uma vez que se concentra nas áreas com baixos índices socioeconômicos (WHO,2011; ROSA *et al.*, 2013; WHO ,2015).

A doença apresenta-se de forma endêmica nas áreas subdesenvolvidas ou em desenvolvimento da África, Ásia e América Latina. As áreas consideradas altamente endêmicas apresentam clima tropical, de fortes chuvas e temperaturas elevadas (Figura 9). De acordo com relatórios oficiais recebidos pela OMS de 115 países e

territórios, a prevalência global de hanseníase, registrada no final do primeiro trimestre de 2013, foi de 189.018 casos, enquanto o número de casos novos detectados durante o ano de 2012 foi de 232.857 (excluindo o pequeno número de casos na Europa (WHO, 2015).

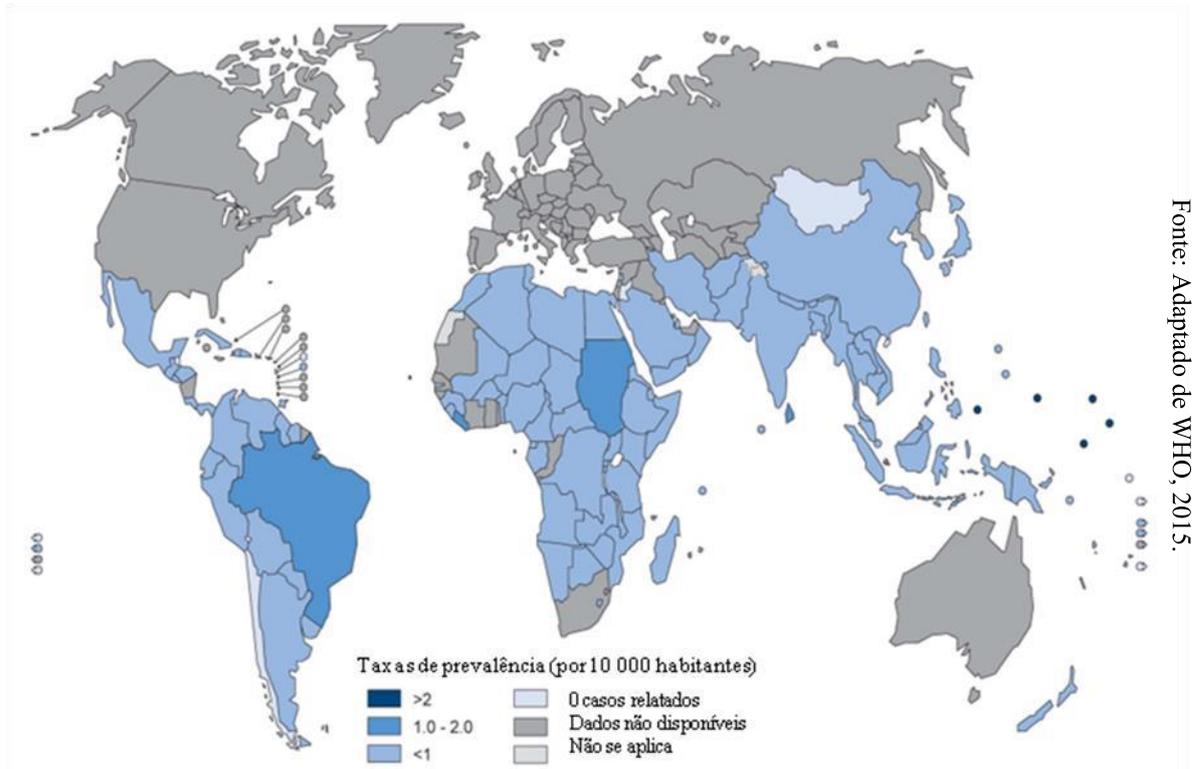


Figura 9 – Coeficiente de prevalência da hanseníase no mundo em 2011.

Segundo o Ministério da Saúde, a taxa de prevalência de hanseníase no Brasil, caiu 65% nos últimos 10 anos, passando de 4,33, em 2002, para 1,51 por 10 mil habitantes, em 2012, sendo considerado um país endêmico, visto que apresenta mais de um caso para cada 10.000 habitantes (TALHARI, 2015). A queda é resultado das ações de combate à doença, intensificada nos últimos anos (SINAN/SVS, 2012). As taxas são mais elevadas em municípios localizados na Amazônia brasileira, Centro-Oeste e Nordeste e algumas regiões metropolitanas (Figura 10). O coeficiente geral de detecção de hanseníase, em 2011, foi de 17,6/100 mil habitantes e entre menores de 15 anos, de 5,2/100 mil habitantes.

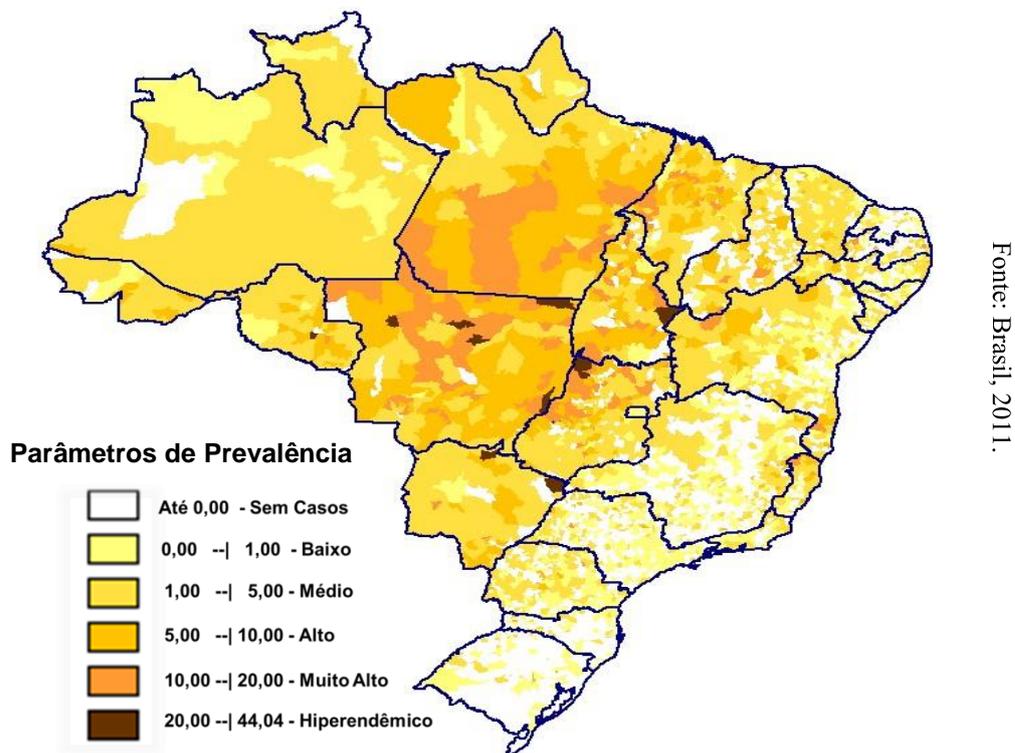


Figura 10 - Coeficiente de Prevalência de hanseníase no Brasil, por município.

No ano de 2014, foram notificados 651 casos de hanseníase no Amazonas, sendo: 562 (86,3%) casos novos, 53 (8,1%) de recidivas, 27 (4,1%) de outros reingressos e 9 (1,4%) de transferências de outros estados. Do total de casos novos detectados, 217 (38,6%) eram residentes de Manaus e 345 (61,4%) eram residentes de outros 54 municípios amazonenses (Figura 11) (SINAN, 2015).

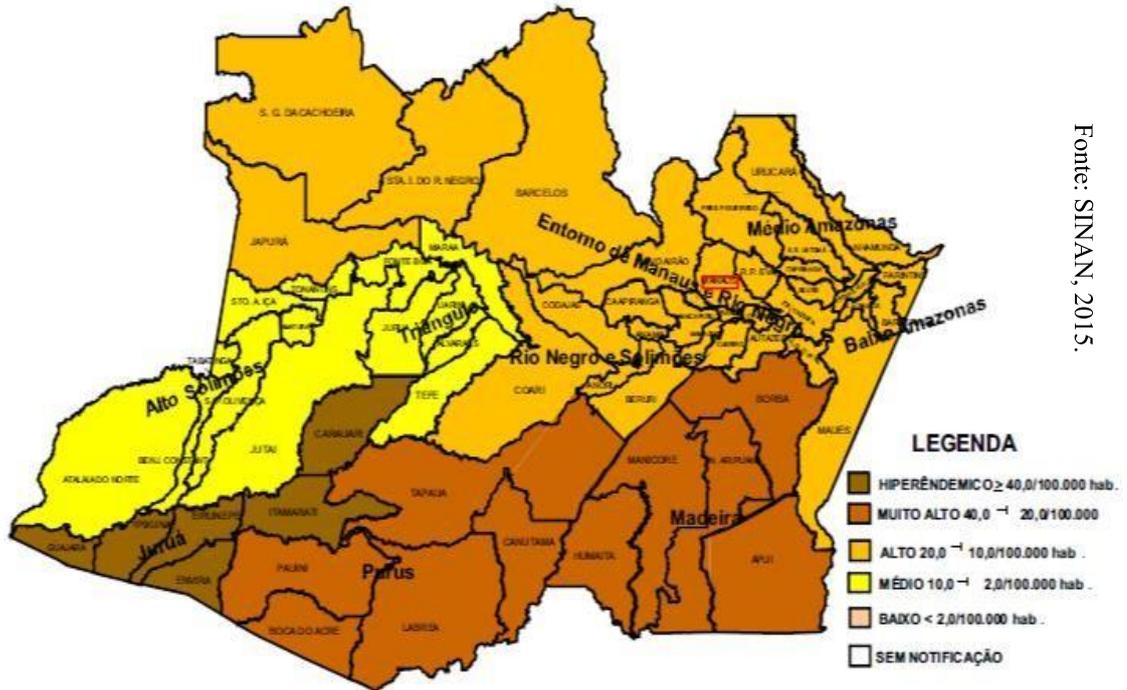
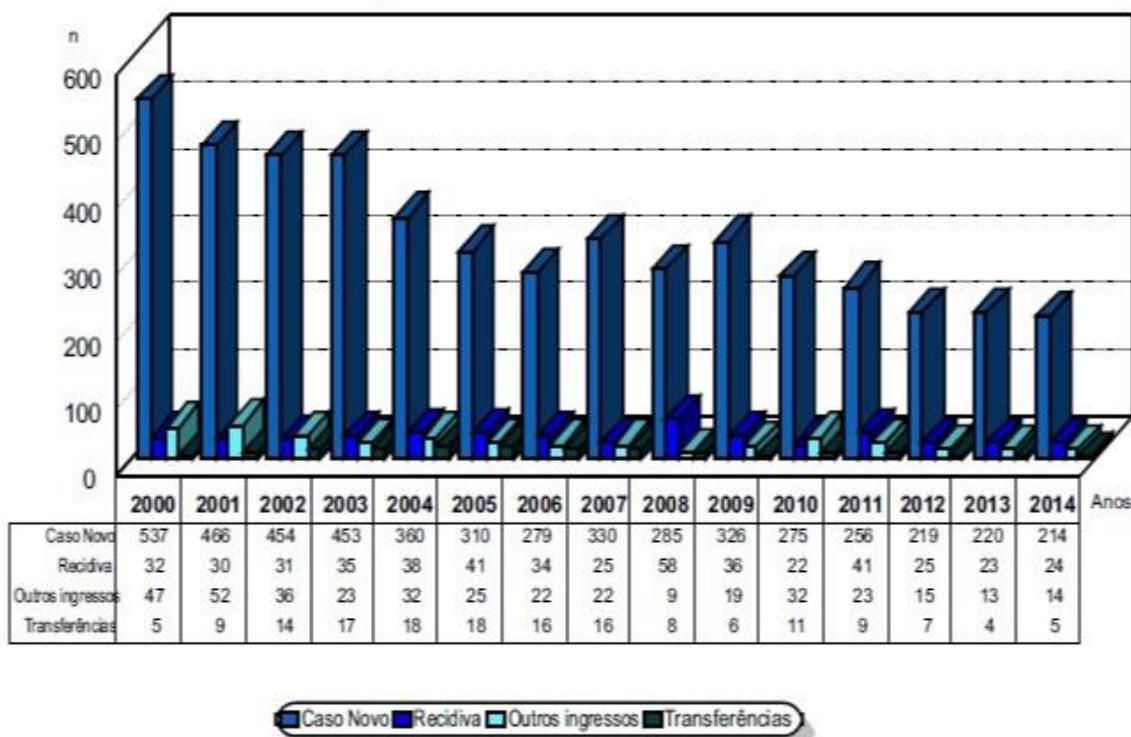


Figura 11 – Detecção da hanseníase no Estado do Amazonas em 2014.

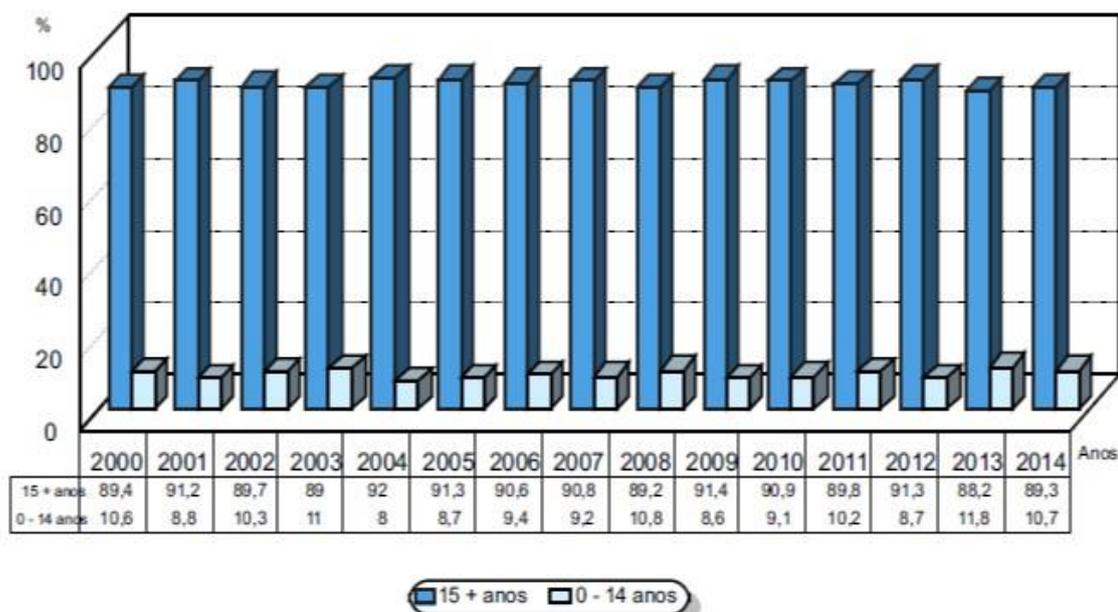
Na Fundação Alfredo da Matta (FUAM), em 2014, foram notificados 257 casos de hanseníase (Figura 12), destes: 214 (83,3%) foram casos novos, 24 (9,3%) de recidivas, 14 (5,4%) de outros reingressos e 5 (1,9%) de transferências, além de 08 casos de pacientes residentes em outros estados. Os 214 novos casos detectados em 2014, pela FUAM, equivalem a 37,7 % dos casos notificados no Estado e 74,6 % dos casos notificados em Manaus. Este quadro reflete que há necessidade de implementação cada vez mais efetiva do processo de descentralização das atividades no estado (SINAN, 2015).



Fonte: SINAN/NET/DCDE/IGEPI/Subinfor/ Fundação Alfredo da Malta

Figura 12 – Gráfico com o percentual de casos de hanseníase, segundo o modo de entrada (FUAM- 2000-2014).

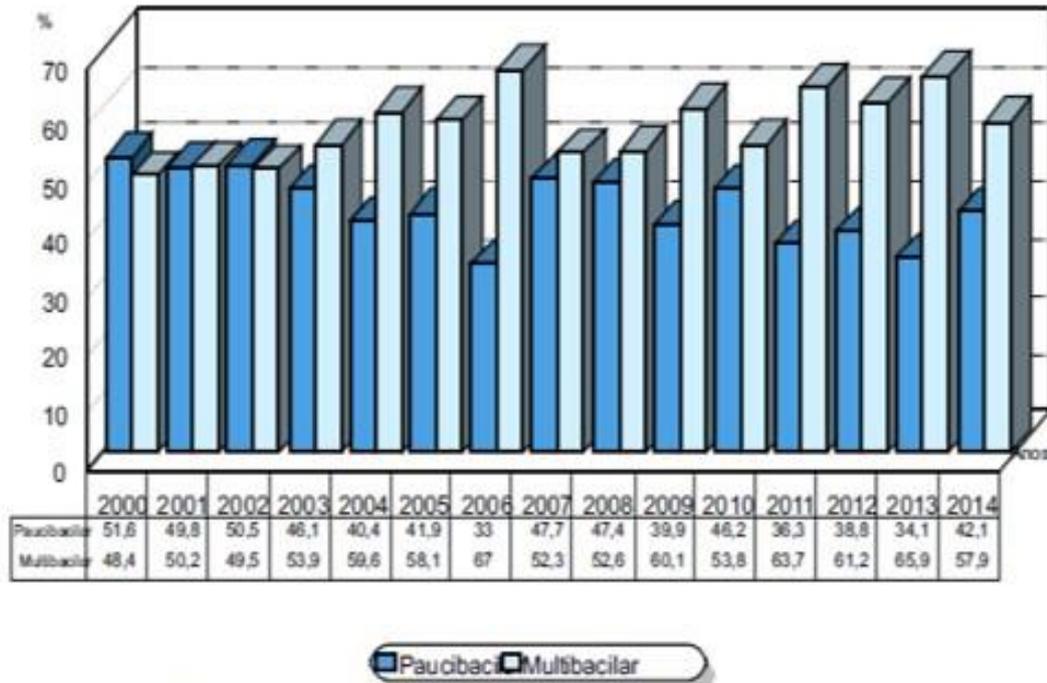
No ano de 2014, do total de casos novos, 126 (58,9%) foram por demanda espontânea, 67 (31,3%) por encaminhamentos e 7 (3,8%) por exame de contatos. Na detecção de casos novos, em relação ao gênero, sempre houve predomínio dos homens. A proporção de casos novos em mulheres para o período de 2000 a 2014 apresentou uma média anual de 40,1%. A razão homens/mulheres foi de 1,5. A detecção de casos em menores de 15 anos (Figura 13) é um dos indicadores para medir a transmissibilidade recente da doença e sua tendência, sendo que em 2014 foram detectados 23 (10,7%) casos. Nos últimos 14 anos observa-se uma estabilidade nos casos em menores de 15 anos, com um percentual médio anual de 9,7% nos últimos 14 anos (Figura 13) (SINAN, 2015).



Fonte: SINANNET/DCDE/GEPI/Subinfr Fundação Alfredo da Matta

Figura 13 – Gráfico com o percentual de casos detectados de hanseníase, segundo a faixa etária (FUAM 2000-2014).

A proporção de casos multibacilares (MB) entre os casos novos, apresentam comportamento ascendente, no período de 2000 a 2014, principalmente nos últimos anos. Em 2014, foram detectados 124 (57,9%) casos MB e a razão MB/PB (multibacilares/paucibacilares) foi de 1,4. Este resultado é esperado em áreas onde vêm ocorrendo o controle da endemia (Figura 14). Quanto à distribuição dos casos novos, em Manaus, observa-se que a maior proporção de casos origina-se da zona Leste (31,6%), zona Norte (31,2%), zona Sul (12,4%) e seguida da zona Oeste com (10,2%).



Fonte: SINANNET/DCDE/GEPI/Subinbr/ Fundação Alfredo da Matta

Figura 14 – Gráfico mostrando percentual de casos detectados de hanseníase segundo classificação operacional (multibacilares e paucibacilares) (FUAM 2002/2014).

1.6. DIAGNÓSTICO DA HANSENÍASE

O diagnóstico precoce da hanseníase e o seu tratamento adequado evitam a evolução da doença, e, conseqüentemente, impedem a instalação das incapacidades físicas eventualmente provocadas pelo *M. leprae*. Até os dias atuais, não se obteve um meio de cultura apropriado para o *M. leprae*. A inoculação em modelo experimental foi conseguida pela primeira vez, por Shepard, em 1960, que conseguiu a multiplicação do *M. leprae* no coxim da pata de camundongos. Posteriormente, Kirchheimer e Storrs em 1971, conseguiram infectar tatus. Verificouse comprometimento da pele, nervos periféricos, medula óssea, fígado, baço, linfonodos, pulmões, meninges e olhos deste animal, com grande quantidade de bacilos, o que possibilitou estudar os constituintes da parede celular, sistemas enzimáticos e proteínas do bacilo (KIRCHHEIMER & STORRS, 1972).

1.6.1. Baciloscopia

O exame laboratorial de primeira escolha no diagnóstico da hanseníase é o exame baciloscópico. Uma das limitações desta técnica é que o exame baciloscópico é geralmente negativo em pacientes paucibacilares, necessitando de confirmação por outros métodos diagnósticos como o exame histopatológico. Mesmo no exame histopatológico o achado de bacilos em pacientes paucibacilares é raro (Martinez *et al.* 2006, Barbieri *et al.* 2014).

Não existe padrão-ouro para o diagnóstico de hanseníase, assim, o diagnóstico baseia-se principalmente em parâmetros clínicos, histopatológicos e bacteriológicos. Entretanto, devido a apresentação espectral da doença que em um pólo, VV, o doente tem muitos bacilos e baixa imunidade celular e em outro pólo, TT, o doente tem poucos bacilos e forte resposta imune celular, é difícil se estabelecer parâmetros bacteriológicos ou imunológicos que consigam identificar e distinguir pacientes precocemente (Martinez *et al.*, 2009, Martinez *et al.*, 2011).

Devido à incapacidade do *M. leprae* ser cultivado em meios artificiais a baciloscopia é o exame laboratorial de primeira escolha, pois trata-se da observação microscópica do *M. leprae* diretamente nos esfregaços de raspados intradérmicos das lesões hansênicas ou de outros locais de coleta selecionados: lóbulos auriculares e/ou cotovelos e lesão quando houver. Consiste em método diagnóstico consagrado e de rotina, servindo também como critério de confirmação de recidiva quando comparado ao resultado no momento do diagnóstico e da cura. Por nem sempre evidenciar o *M. leprae* nas lesões hansênicas ou em outros locais de coleta, a baciloscopia negativa não afasta o diagnóstico da hanseníase. O Índice Baciloscópico (IB) proposto por Ridley (1962) é valioso, contudo, o resultado pode ser afetado pela profundidade da incisão na pele (BRASIL, 2012).

No exame baciloscópico positivo aparecerão bacilos álcool-ácido resistentes na forma de bastonetes em fundo azul, estes podem apresentar-se retos ou ligeiramente curvos, o resultado é expresso conforme a escala logarítmica de Ridley, variando de 0 a 6+ (WHO, 2011):

NEGATIVO; Nenhum BAAR em 100 campos microscópicos;

1+ > 1 a 9 BAAR em 100 campos microscópicos;

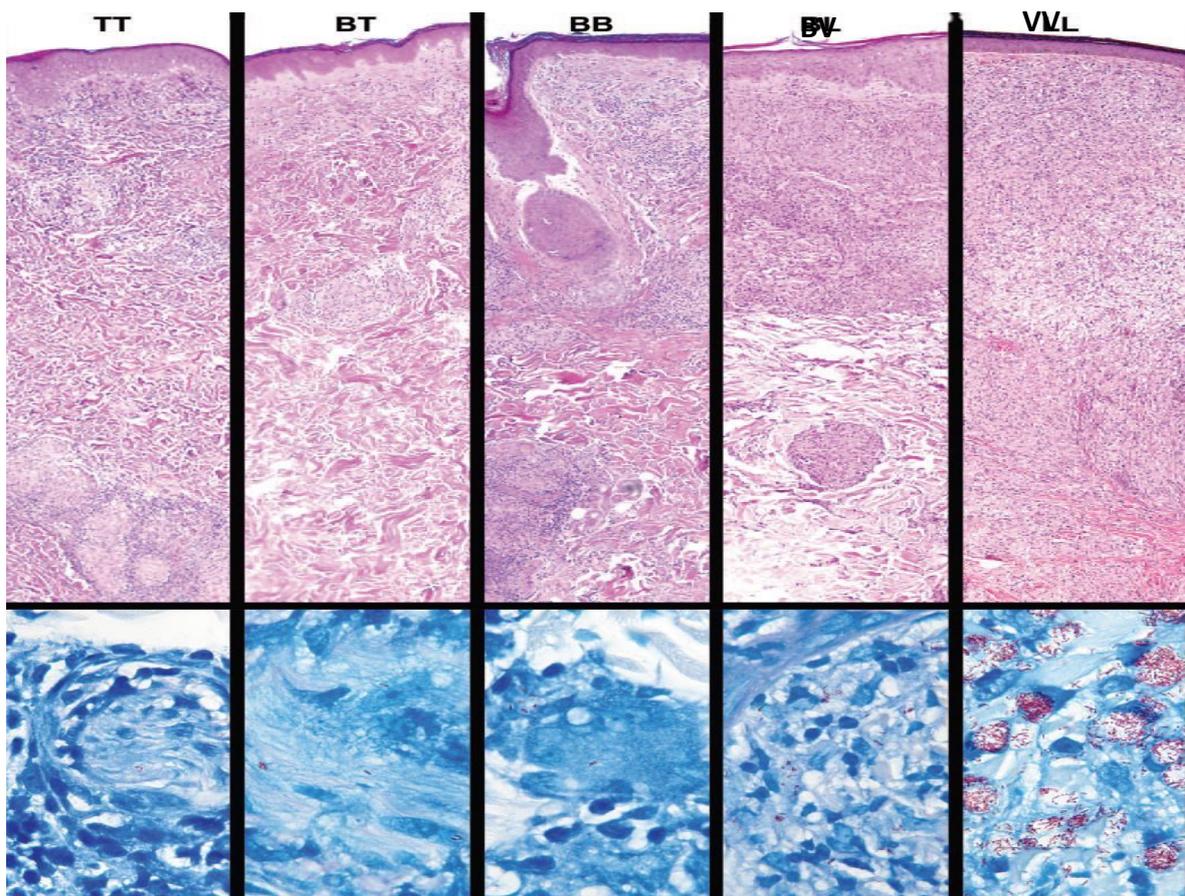
2+ > 10 a 99 BAAR em 100 campos microscópicos;

3+ >100 a 999 BAAR em 100 campos microscópicos; 4+ >1000 a 9.999 BAAR em 100 campos microscópicos; 5+ >10.000 a 99.999 BAAR em 100 campos microscópicos. 6+ >mais de 100.000BAAR em 100 campos microscópicos.

Os pacientes paucibacilares apresentam poucos bacilos, nesses casos, a detecção do *M. leprae* através da baciloscopia não é frequente o que dificulta o diagnóstico da hanseníase nesse grupo de pacientes.

1.6.2. Histopatologia

O exame histopatológico é complementar ao diagnóstico da hanseníase, sobretudo quando o exame baciloscópico é negativo. É importante para a correta classificação da doença pois avalia as células presentes no infiltrado inflamatório dérmico e hipodérmico, onde são observados diferentes padrões, nas diferentes formas da hanseníase. A Figura 15 demonstra aspectos imunopatológicos da hanseníase, em cada tipo de hanseníase, segundo a classificação de Ridley & Jopling (1966), em cortes histopatológicos corados com hematoxilina e eosina. É possível observar nas formas TT e BT a presença de granulomas denominados bem formados; na forma BB os achados são semelhantes, porém, há menor quantidade de linfócitos e não são observadas células gigantes multinucleadas. Nas formas BV e VV observa-se infiltrados inflamatórios com predomínio de histiócitos espumosos ou vacuolizados e apresenta grande número de bacilos isolados ou globias. Na forma VV o processo inflamatório ocupa toda a extensão da derme (SCOLLARD *et al.*, 2006, TALHARI, 2015).



Fonte: Adaptado de SCOLLARD 2006.

Figura 15 – Aspectos imunopatológicos nas diferentes formas da hanseníase, TT= Tuberculóide, BT= *Borderline* Tuberculóide, BB= *Borderline Borderline*, BV= *Borderline* Virchowiana, VV= Virchowiana.

Nas últimas duas décadas, métodos alternativos de diagnóstico foram desenvolvidos. Um desses, baseado na tentativa de identificar marcadores sorológicos do *M. leprae*, como o PGL-I, (glicolípido fenólico-I) que é abundante e específico ao *M. leprae*, tem sido usado como auxílio ao diagnóstico da hanseníase (DUTHIE *et al.*, 2011; SPENCER *et al.*, 2011). No entanto, a quantidade de anticorpos específicos anti-PGL-I é diretamente proporcional à quantidade de bactérias, contudo o teste é falho quando se trata da detecção em pacientes paucibacilares. Dessa forma, a sorologia para PGL-1 não apresenta boa sensibilidade para diagnosticar precocemente contatos domiciliares de pacientes. Dentre os outros métodos diagnósticos alternativos desenvolvidos encontra-se o IGRA (do inglês, *interferon gamma releasing assay*) que avalia *in vitro* a resposta imunológica a antígenos de *M.*

leprae em cultura de células do sangue. Os pacientes paucibacilares (principalmente as formas TT e BT) são fortes respondedores aos ensaios de liberação de IFN-gama *in vitro*, mas contatos domiciliares também produzem muito IFN-gama *in vitro* quando suas células do sangue são estimuladas (SPENCER *et al.*, 2005; MARTINS *et al.*, 2012).

A técnica diagnóstica denominada reação em cadeia da polimerase (PCR) apresenta elevada sensibilidade e tem possibilitado ensaios em diversos tipos de amostras clínicas, como: urina, sangue, biópsias de pele e nervos, secreções, dentre outras. É possível aplicar a técnica mesmo em biópsias parafinadas (YAN *et al.*, 2014), saliva, *swab* oral e nasal, com custo bastante acessível. De fato, desde o início de década de 1990, que técnicas de PCR convencional vem sendo empregadas para o diagnóstico da hanseníase. Ainda, a PCR convencional foi desenvolvida por diversos grupos independentes e tem sido empregado para resolução de casos de difícil diagnóstico, principalmente em casos da forma neural pura e no monitoramento de contatos. Diversos estudos demonstram a importância da PCR na prática clínica (WILLIAMS *et al.*, 1990; JARDIM *et al.*, 2003; ALMEIDA *et al.*, 2004; ROSA *et al.*, 2013).

Mais recentemente, a PCR em Tempo Real (qPCR) demonstrou ser uma ferramenta importante na detecção e quantificação de DNA de *M. leprae*, mesmo em pacientes PB. Diversas sequências podem ser utilizadas como alvo em ensaios de qPCR (ROSA *et al.* 2013). Martinez e colaboradores (2006), demonstraram que a qPCR desenhada para um alvo de *Ag85B* foi altamente sensível em amostras de biópsias de pele (80%) de pacientes paucibacilares. Posteriormente, um estudo com pacientes com formas clínicas de difícil diagnóstico, testou quatro sistemas de qPCR (*Ag85B*, *SodA*, *RLEP*, *16S*) os quais se mostraram específicos, embora o *16S* tenha se mostrado mais específico e um pouco menos sensível que os outros métodos (MARTINEZ *et al.*, 2011). Por isso, o método *16S* foi escolhido para fazer análises que buscam identificar novos casos em contatos bem como facilitar o diagnóstico diferencial. Nos últimos anos, vários estudos demonstraram a confiabilidade dos ensaios baseados no *16S* na rotina diagnóstica de casos inconclusivos e para o monitoramento de contatos. Desta forma, o ensaio de *16S* é alvo consolidado, específico, sensível e pode auxiliar na resolução de problemas na rotina diagnóstica de pacientes paucibacilares (MARTINEZ *et al.*, 2009; MARTINEZ *et al.*, 2011; BARBIERI *et al.*, 2014).

2. JUSTIFICATIVA

Sabe-se que a hanseníase ainda representa importante problema de saúde no Brasil. Anualmente, aproximadamente 40.000 novos casos de hanseníase são diagnosticados no país. Em 2014, foram notificados 651 casos de hanseníase no Estado do Amazonas. O diagnóstico precoce da doença é importante para se evitar incapacidades e deformidades físicas associadas à hanseníase, além de ser baseado no exame clínico e, principalmente, na baciloscopia e exame histopatológico. No entanto, o amplo espectro de manifestações clínicas e as limitações dos exames diagnósticos disponíveis na rotina podem tornar o diagnóstico menos preciso. Nesses casos, a baciloscopia é geralmente negativa e o exame histopatológico inconclusivo, o que torna a decisão de início do tratamento bastante difícil. Sabe-se que quanto mais precocemente o paciente com hanseníase for tratado, menor é a possibilidade de incapacidade física para o mesmo. Para tentar solucionar este tipo de problema, técnicas de Biologia Molecular, como a PCR em Tempo Real (qPCR) tem sido capaz de auxiliar na decisão clínica de pacientes cujas biópsias cutâneas são inconclusivas para hanseníase ao exame histopatológico. A qPCR é uma ferramenta bastante sensível e específica que permite além da detecção, a quantificação das bactérias presentes na amostra, auxiliando o diagnóstico em casos paucibacilares com baciloscopia negativa e exame histopatológico inconclusivo.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

- Avaliar o papel da técnica da PCR em Tempo Real (qPCR) na detecção de *M. leprae* em biópsias cutâneas de pacientes com suspeita clínica de hanseníase e exame histopatológico inconclusivo para a doença.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Validar o teste de qPCR a partir de alvo 16S rDNA em biópsias de pele frescas;
- Realizar análise quantitativa para detecção de DNA de *M. leprae* por qPCR e fazer inferências do número de genomas nas amostras estudadas;
- Comparar os resultados entre os grupos de pacientes de difícil diagnóstico com os controles positivos (pacientes com hanseníase) e negativos (pacientes com outras dermatoses);
- Fazer análises qualitativas para comparar os resultados de qPCR com outros dados clínicos e parâmetros laboratoriais como IB, histórico de hanseníase na família, bem como com laudo da histopatologia como suportes ao diagnóstico clínico;
- Comparar a eficiência da qPCR quando comparadas as biópsias frescas e parafinizadas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. TIPO DE ESTUDO

O estudo foi caracterizado como transversal com amostras de arquivo em parafina e biópsias frescas realizado no Laboratório de Biologia Molecular da FUAM para validação do teste de qPCR para diagnóstico da hanseníase. Para isso o estudo contou com a coleta de amostras sabidamente positivas e negativas para a hanseníase bem como de amostras com suspeita clínica de hanseníase e exame histopatológico inconclusivo para a doença, atendidos por demanda espontânea na FUAM, no período de março a agosto de 2014 para amostras frescas. As amostras incluídas em parafina foram recuperadas de arquivo a partir de março de 2014 até maio de 2015.

4.2. ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo foi aprovado no Comitê de Ética e Pesquisa da Fundação Alfredo da Matta (CEP-FUAM) sob parecer 522.919 em 06 de fevereiro de 2014. Todos os pacientes incluídos neste estudo leram e foram instruídos quanto a participação no estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE (Anexo-I).

4.3. AMOSTRAGEM

Foram coletadas 82 biópsias cutâneas frescas de pacientes no Centro Cirúrgico da FUAM e incluídos em três grupos: controle, outras dermatoses e suspeitos. No grupo controle, definido com a doença, foram incluídos os pacientes MB (incluindo as formas clínicas virchovianas, *borderline* virchovianas e *borderlineborderline*) e pacientes PB (incluindo as formas clínicas indeterminada e tuberculóide). O grupo de outras dermatoses, considerado negativo para a hanseníase, foi composto de amostras com diagnóstico confirmado para doenças dermatológicas de origem não infecciosa, como: psoríase, pitíriase versicolor, vitiligo e granuloma anular. E o último grupo, o de suspeitos, ou seja, o grupo teste composto por biópsias de pacientes com

suspeita clínica de hanseníase e exame histopatológico inconclusivo para a doença. Em relação às biópsias parafinadas, foram recuperadas 98 amostras de arquivo da Histopatologia da Fundação Alfredo da Matta e distribuídas também em três grupos idênticos aos das biópsias frescas.

4.4. COLETA DE AMOSTRAS

A coleta das amostras frescas ocorreu no período de março de 2014 a maio de 2015. Foram coletadas biópsias cutâneas com *punch* 3 mm e conservadas em etanol a 70%, conforme recomendação do Ministério da Saúde e da OMS. Essas amostras foram armazenadas em freezer -70°C e posteriormente processadas no Laboratório de Biologia Molecular, da FUAM. Em relação às biópsias parafinadas, as amostras se encontravam no arquivo da Histopatologia da Fundação e somente após a análise histopatológica, foram retirados 5 cortes de 5 micras do tecido e armazenados em freezer até o processamento de extração de DNA.

4.5. EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA total foi extraído das amostras pelo Kit *DNeasy Blood and Tissue®* (QIAGEN) seguindo as recomendações do fabricante, com algumas modificações. Previamente ao protocolo de extração de DNA, nas biópsias armazenadas em etanol 70%, o tecido foi fragmentado com auxílio de lâminas de bisturi estéril, enquanto que no outro grupo de biópsias, houve um tratamento prévio para retirar a parafina. Um volume de 500 uL de xilol aquecido a 45°C foi adicionado para remoção da parafina. O tubo foi agitado manualmente e centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos para sedimentação dos cortes. O procedimento foi repetido até os cortes estarem livres de parafina

4.6. QUANTIFICAÇÃO DE DNA POR FLUORIMETRIA

O DNA total extraído das amostras foi quantificado utilizando o Qubit®3.0 fluorímetro, com o kit *Qubit™ dsDNA BR assay (Life Technologies)*, de acordo com as instruções do fabricante. Este equipamento permite a quantificação de DNA, RNA e proteínas utilizando corantes fluorescentes. Estes corantes são específicos para cada tipo de biomolécula, mesmo em baixas concentrações.

4.7. ENSAIO DE DETECÇÃO DE DNA DE *M. leprae* UTILIZANDO qPCR

Para a detecção do DNA de *M. leprae*, o alvo de amplificação foi a região gênica de cópia única 16S rRNA específica do bacilo. Este ensaio foi padronizado de acordo com Martinez *et al* 2011, e utilizado com o objetivo de determinar o número de bactérias presentes em amostras biológicas de pacientes.

O estudo de amplificação do gene alvo foi realizado pela técnica de PCR quantitativo, a qual é baseada no monitoramento do nível de fluorescência detectada durante a amplificação de DNA ciclo a ciclo.

As amostras de DNA foram submetidas à amplificação da região ribossomal 16S de *M. leprae*, em triplicata utilizando como primer senso a sequência 5'- GCA TGT CTT GTG GTG GAA AGC-3' e anti-senso 5'-CAC CCC ACC AAC AAG CTG AT-3', como sonda fluorogênica foi utilizada a sequência 16S rRNA Taq-probe (5'- CAT CCT GCA CCG CA-3') da Applied biosystem™ .

O volume total de reação de 25 µL foi composto de: 12,5 µL do tampão TaqMan® qPCR Master Mix 1X (Life Technologies), 1µM do *primer* senso do alvo 16SrRNA, 1µM do *primer* anti-senso do alvo 16SrRNA, 0,2µM da sonda Taq16SrRNA e de 2 µL DNA genômico.

As condições de ciclagem utilizadas nas reações de amplificação foram: inicialmente 50°C por 2 minutos, seguida de uma incubação de 95°C por 10 minutos; 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, utilizando o sistema PCR em tempo real. As reações foram procedidas no StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems (*Life Technologies*).

A princípio, as triplicatas que tiveram amplificações em pelo menos duas ou três replicatas e com Ct (*Cycle threshold*) menor ou igual a 37 foram consideradas positivas.

4.8. QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA

A plataforma *StepOnePlus*TM é capaz de detectar a luz oriunda da reação de amplificação, onde o nível de fluorescência computado é aquele suficiente para atingir um limiar de detecção para cada amostra analisada e por convenção denominado de Ct (*Cycle threshold*).

A quantidade de DNA do *M. leprae* presente nas amostras clínicas, ou seja, o número de genomas (bacilos) encontrado em cada amostra foi gerado através de uma associação estatística entre o valor de Ct, obtido para cada amostra analisada, em função do tamanho do genoma do *M. leprae* conforme descrito em Martinez *et al.*, 2011.

Em resumo, foi realizada uma análise de regressão linear utilizando o software R, onde os valores de Ct gerados a partir de uma curva padrão (amostras com concentrações conhecidas variando de 1ng a 3,25fg) foram plotados e uma equação da reta construída, sendo possível a partir desta estimar o número de cromossomos de *M. leprae* considerando que o genoma de um *M. leprae* seja equivalente a 3fg.

De acordo com essa metodologia, colaboradores da FIOCRUZ, do Rio de Janeiro, construíram uma tabela de conversão que calcula o número de genomas presente na amostra analisada inserindo apenas o valor do Ct, obtido na análise da *StepOnePlus*TM basicamente a partir da interpolação dos valores de Ct na equação da reta.

Nesse trabalho, utilizou-se essa tabela de associação para obtenção do número de bactérias presentes nas amostras biológicas de pacientes.

4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Para avaliar o alvo 16S como marcador de diagnóstico de *M. leprae*, foram realizados os testes de Sensibilidade, Especificidade, Valor Preditivo Positivo (VPP) e Valor Preditivo Negativo (VPN). O teste de Sensibilidade mede a capacidade de detectar os pacientes com a doença. Já o teste de Especificidade mede a probabilidade de detectar os não doentes. O VPP mede a probabilidade da doença estar presente quando o teste for positivo e o VPN é a probabilidade da doença não estar presente quando o teste for negativo. Além disso, foi realizado o teste de ANOVA

e a Correção de Bonferroni no programa *GraphPad Prism* 5.04 para comparar o número de genomas entre os tipos de biópsias.

5. RESULTADOS

5.1. ANÁLISE EM BIÓPSIAS CONGELADAS APÓS COLETA

Foram coletadas 82 biópsias frescas as quais foram congeladas imediatamente e armazenadas em álcool 70%, em freezer -70°C. Destas, apenas 65 tiveram amplificação no teste de qPCR. Em 17 amostras houve problemas com a extração de DNA (quantidades ínfimas, ou com muita contaminação com proteína, ou reagentes da extração e o DNA não foi usado a amplificação). Todas as amostras foram analisadas inicialmente pela histopatologia e o laudo foi discutido com o dermatologista responsável, que definiu uma classificação clínica. Os resultados de qPCR não foram apresentados ao dermatologista e não foram incluídos nos prontuários dos pacientes, tendo em vista que esse estudo trata-se de uma etapa de validação. Entretanto, na maioria das amostras há uma convergência entre o laudo da patologia e a conclusão diagnóstica.

Nove pacientes foram diagnosticados com outras dermatoses, como: granuloma anular, lesão tumoral, micose fungóide granulomatosa, melanoma, lúpus eritematoso subagudo e linfoma. Destes, dois tiveram resultado de qPCR positivo (granuloma anular e lesão tumoral) e ambas as amostras apresentaram um número de genomas alto (48,24 e 18,40, respectivamente). Independentemente do resultado positivo de qPCR, dado o diagnóstico, essas amostras foram consideradas como controles negativos para fins de comparação para os testes de especificidade e sensibilidade.

Tabela 1 - Apresentação descritiva dos pacientes com outras dermatoses testados.

Histórico de Hanseníase	Laudo histopatológico	Baciloscopia	Diagnóstico clínico	qPCR	Número de genomas
Não	lúpus tumido	Não realizada	Lúpus tumido	Negativo	-
Não	Ausente	Negativo	Micose fungóide granulomatosa	Negativo	-
Não	Descritivo	Negativo	Outras afecções da pele	Positivo	10,49

Não	Carcinoma	Não realizada	Lesão tumoral	Positivo	18,4
Não	Paniculite/ eritema nodoso	Não realizada	Eritema nodoso	Negativo	-
Não	Granuloma anular elastolítico	Negativo	Granuloma anular	Positivo	48,24
Não	C/C ceratoseactinica	Negativo	Melanoma	Negativo	-
Não	Descritivo	Negativo	Púrpura pigmentar	Negativo	-
Não	Descritivo	Não realizada	Lupus eritematoso subagudo	Negativo	-

Em relação às amostras de pacientes com hanseníase, foram recuperadas 38 amostras. Deste total, duas amostras foram discordantes entre o diagnóstico clínico e o laudo histopatológico. A primeira teve suspeita diagnóstica de psoríase; não foi realizado o teste de baciloscopia; o paciente não relatou contato com a hanseníase e o resultado da histopatologia sugeriu dermatite psoríaseforme. Entretanto, a clínica tratou como hanseníase PB e esta amostra teve o resultado de qPCR positivo (Ct= 36.66; número de genomas= 10,42). Já a segunda amostra, teve como hipótese diagnóstica hanseníase *borderline* tuberculóide ou ptíriase versicolor; não foi relatado pelo paciente contato domiciliar com hanseníase; o teste de baciloscopia foi negativo; o resultado da histopatologia foi de processo inflamatório inespecífico e o resultado de qPCR foi negativo. Neste caso, a clínica foi soberana e diagnosticou como hanseníase paucibacilar.

Foram diagnosticados 13 pacientes como hanseníase multibacilar. Em relação ao teste de baciloscopia, em apenas em 10 dos 13 pacientes, foi positivo. Como esperado, todos foram positivos para o teste do qPCR. Quanto à forma clínica, seis pacientes foram classificados como MHV, sete como MHD. Entre os pacientes MB, um apresentou recidiva, outro apresentou reação do tipo I (ou reação reversa - RR) e um último paciente apresentou eritema nodoso hansênico (ENH). Este último paciente, apresentou um hansenoma, sabidamente uma lesão com grandes quantidades de bacilos, em pacientes virchovianos e apresentou a maior quantidade de genomas (2.060.229,54), tendo portanto, o menor valor de Ct (18.44). Foram classificadas 25 amostras de pacientes como paucibacilares. Desses, 52% (13/25)

foram positivos para a qPCR. Desses pacientes, 17 foram diagnosticados como MHD, sendo que sete apresentaram resultado negativo para qPCR. Destes que foram negativos para a qPCR, a metade relatou alguma história pregressa com a hanseníase, sendo que um deles era suspeito de recidiva e três eram contatos. Os demais 10 pacientes classificados como MHD, tiveram resultados positivos para a qPCR. Uma porcentagem de 40% (4/10) pacientes tinham histórias pregressas com a hanseníase sendo 2 contatos e 2 pacientes com suspeita de reação pós-alta. Observa-se que as formas dimorfas, dentre as formas clínicas paucibacilares na classificação de Ridley e Jopling, poderia ser considerada multibacilar.

Em relação às formas clínicas que classicamente são muito difíceis de se detectar *M. leprae*, como, a MHT e a MHI, observou-se que dos três pacientes diagnosticados com MHT, todos foram qPCR negativos. E dentre os cinco pacientes com a forma indeterminada (MHI), 60% (3/5) tiveram detecção de DNA por qPCR.

Tabela 2- Desempenho do Teste Molecular para o alvo 16S de *Mycobacterium leprae* em relação a Classificação Operacional em biópsias frescas.

Classificação Operacional	Biópsias frescas (n= 38)	
	Pos % (n)	Neg % (n)
Paucibacilares	52 (13)	48 (12)
Multibacilares	100 (13)	0 (0)
Total	68,5 (26)	31,5 (12)

No grupo de biópsias frescas testadas para a qPCR, identificou-se ainda três amostras de pacientes em que a conclusão diagnóstica foi hanseníase, mas não se inclui nos grupos acima, tendo em vista que na recuperação dos dados, houve alguma incongruência. Por exemplo: um paciente foi tratado por 12 meses e teve diagnóstico de MHV, não está claro a necessidade desta biópsia se teria sido realizada para excluir/incluir reação, por exemplo. Ainda, esse paciente teve teste de qPCR negativo e baciloscopia positiva. Outros 2 pacientes, também negativos ao qPCR, tiveram diagnóstico de hanseníase, com a histopatologia inconclusiva e a baciloscopia também foi negativa para ambas amostras.

E assim dessa forma, com os resultados para biópsias frescas, foi possível calcular a sensibilidade e a especificidade do teste de qPCR

Tabela 3- Análise de desempenho epidemiológico do teste de qPCR para hanseníase com relação às biópsias frescas.

	Hanseníase	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN
	Ausente	presente			
qPCR positivo	3	26	68,5%	66,70%	89,7%
qPCR negativo	6	12			33,3%

VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo

Uma análise subsequente foi realizada para estimar a quantidade de genomas dentre pacientes MB e PB. A Figura 16 indica que, como esperado, a mediana do número de genomas em pacientes MB é maior que em pacientes PB para esse grupo de amostras.

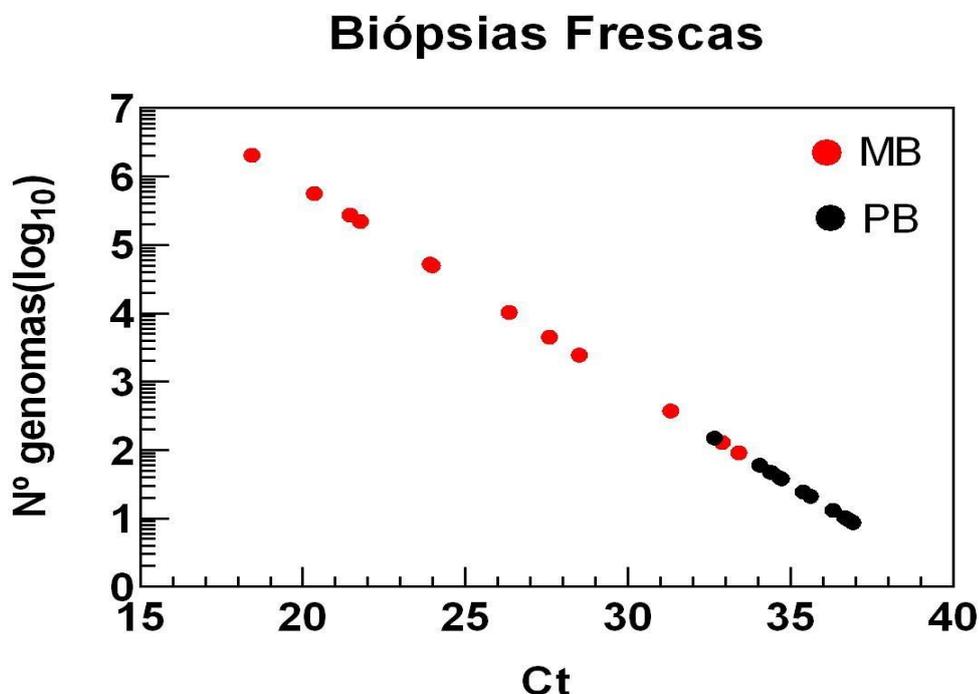


Figura 16 - Gráfico de dispersão em relação à classificação operacional MB e PB versus o número de genomas (MB: multibacilar; PB: paucibacilar; Ct: *Cycle threshold*; Nº: número). A quantidade de genomas está representado em escala logarítmica.

Ainda, 12 amostras tiveram diagnóstico inconclusivo. É importante lembrar, que esse grupo é o alvo principal desse estudo, pois, são amostras as quais a histopatologia não foi capaz de definir um diagnóstico com precisão, ou, que a clínica não conseguiu fechar seu diagnóstico baseado no resultado da patologia. Nesses casos, é comum o laudo histopatológico indicar um processo/infiltrado inflamatório granulomatoso, ou inespecífico (descritivo), compatível com hiperchromia residual, eritema anular centrífugo e pele normal (Tabela 4). Uma análise combinada sugere que a despeito do laudo histopatológico e da conduta clínica, 8 amostras em 12 testadas (66,6%), foram positivas para a qPCR (Tabela 4). A análise da quantidade do número de genomas indica que, juntamente com o histórico clínico e a avaliação dermatoneurológica, associada à quantidade de DNA, poderia auxiliar no diagnóstico. Dado que o teste de qPCR, como visto anteriormente, teve nas condições testadas, baixa especificidade, apenas amostras com muitos genomas ($\geq 48,24$ genomas) poderia ter maior precisão diagnóstica.

Tabela 4 - Análise descritiva dos pacientes com diagnóstico inconclusivo para hanseníase em relação às biópsias frescas.

Hipótese diagnóstica	Histórico de Hanseníase	Laudo histopatológico	Baciloscopia	qPCR (%)	Número de genomas
Hanseníase ou notalgia parestésica	Não	Hiperchromia residual	Negativa	Positivo	12
Hipocromia, eritema	Não	Descritivo	Não realizada	Positivo	20,90
Hanseníase BT	Sim, recidiva?	Descritivo	Negativa	Positivo	11,29
Hanseníase V	Sim, recidiva?	Descritivo	Negativa	Negativo	-
Paniculite, micobacteriose	Não	Descritivo	Não realizada	Negativo	-
Rosácea, Lúpus eritematoso discoide	Não	Descritivo	Não realizada	Negativo	-
MHBT, Granuloma doença de Lyme	Não	Descritivo	Negativa	Positivo	20,34
Lúpus eritematoso discoide	Sim	Processo inflamatório granulomatoso	Não realizada	Positivo	22,64
Eritema anular centrífugo	Não	Eritema anular centrífugo	Não realizada	Positivo	11,83
Hanseníase foliculite		Hanseníase, sífilis	Negativa	Negativo	-

Hipercromia residual, hanseníase, Púrpura pigmentar?	Não	Infiltrado inflamatório	Negativa	Positivo	12,65
Hanseníase indeterminada	Sim	Pele normal	Negativa	Positivo	10,99

5.2. TESTE DE EFICIÊNCIA EM AMOSTRAS DE PARAFINA

A despeito dos resultados anteriores de qPCR não demonstrarem especificidade ou sensibilidade altas, os resultados das amostras inconclusivas indicam que, alguns pacientes podem se valer do teste para auxiliar à conduta clínica. Neste contexto, uma segunda abordagem teve como objetivo analisar a pertinência de realização das biópsias frescas exclusivas para os testes de qPCR, em comparação com as amostras armazenadas em bloco de parafina. Recentemente, Barbieri e colaboradores (2014), apresentaram a sugestão de uma árvore de decisão clínica (Figura 17) que indica que, quando a avaliação histopatológica é inconclusiva, o teste de qPCR pode ser utilizado para auxílio ao diagnóstico. Neste caso, seria muito adequado que o teste pudesse ser realizado em amostras incluídas em parafina devido à logística de colher uma nova amostra para o qPCR.

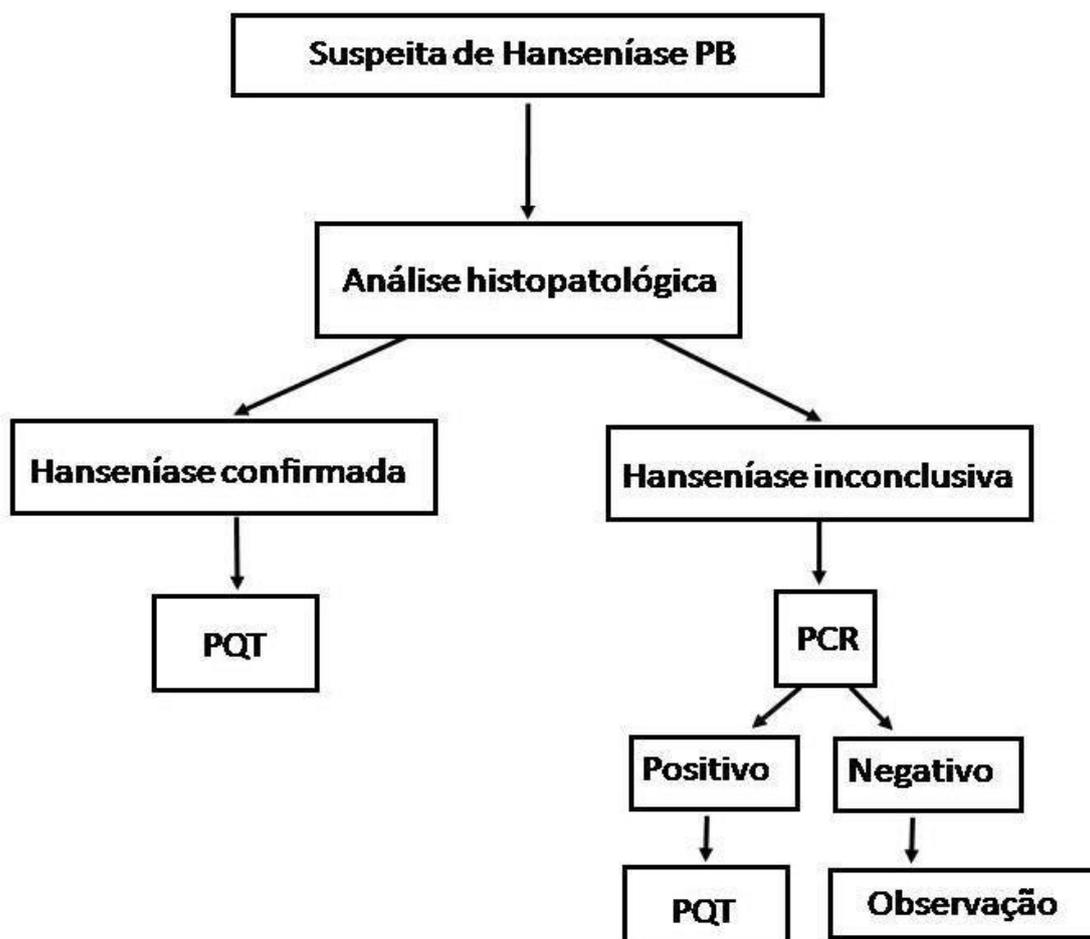


Figura 17- Árvore de decisão clínica proposta por Barbieri *et al.*, 2014.

Assim, das 98 amostras que foram colhidas, sete tiveram diagnósticos inconclusivos, seis tiveram diagnóstico de outras dermatoses e não foram testadas. Outras 24 amostras não tiveram qPCR realizado por problemas técnicos (recuperação de pouquíssimo ou nenhum DNA, ausência de tecido nos blocos após extração da parafina, etc). Das amostras restantes, 31 eram de pacientes multibacilares e 30 de pacientes paucibacilares. Os resultados da eficiência dos testes podem ser vistos na Tabela 5. Os resultados são inesperados e sugerem que a eficiência do ensaio de qPCR para 16S DNA é menos sensível em amostras de pacientes multibacilares do que pacientes paucibacilares (69% em MB *versus* 80% em PB). Curiosamente, em paucibacilares a sensibilidade de detecção do alvo 16S foi também maior em amostras recuperadas de parafina, quando comparadas às amostras frescas (80% em amostras de parafina *versus* 52% em amostras frescas) (Tabelas 2 e 5).

Tabela 5- Desempenho do Teste Molecular para o alvo 16S de *Mycobacterium leprae* em relação a Classificação Operacional em biópsias parafinadas.

Classificação	Biópsias de Parafina	
	Positivas % (N)	Negativas % (N)
Multibacilares	69 (21)	31 (10)
Paucibacilares	80 (24)	20 (6)

Em amostras MB, os resultados foram esperados, onde a sensibilidade de detecção da amostra fresca foi superior (Tabela 2). Ainda, uma análise do perfil das formas clínicas das amostras incluídas no grupo “parafinizados” poderia explicar um viés por formas mais bacilíferas. O resultado indica que, dentre as formas clínicas, havia mais pacientes classificados como MHD (23/30, 76,6%), quatro pacientes com a forma indeterminada, outros três com a forma MHT. Como descrevemos anteriormente nas amostras frescas tivemos 17 pacientes MHD (68%), cinco pacientes MHI, 3 pacientes MHT. Portanto, o aumento de formas clínicas BT no grupo da parafina não explica consistentemente a diferença na sensibilidade.

A partir destes resultados, foi possível calcular a sensibilidade (73,8%) do teste de qPCR para biópsias parafinadas. No entanto, não foi possível calcular a especificidade neste grupo, pois não havia um grupo de não doentes para usar como comparação.

A estimativa da quantidade de genomas dentre os pacientes MB e PB provenientes das biópsias parafinadas é mostrada na Figura 18, e, como esperado, mostrou que o número de genomas em pacientes MB é maior que em pacientes PB, assim como visto anteriormente nas biópsias frescas (Figura 16).

Biópsias Parafinadas

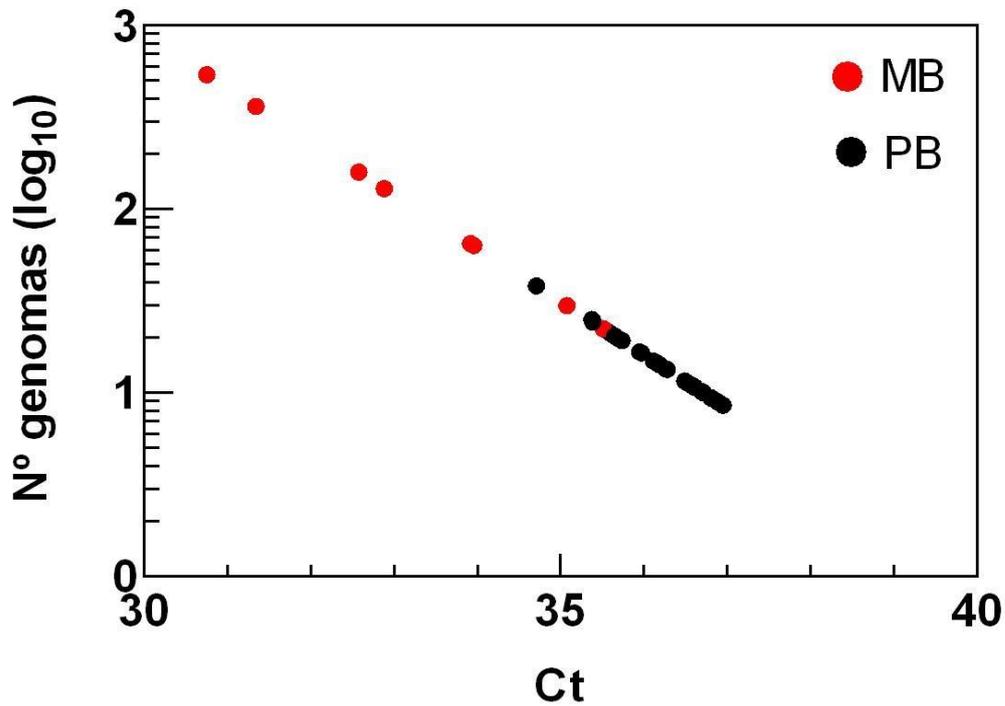


Figura 18 - Relação entre a classificação operacional MB e PB *versus* o número de genomas (MB: multibacilar; PB: paucibacilar; Ct: *Cycle threshold*; N^o: número). A quantidade de genomas está representado em escala logarítmica.

Por fim, uma análise estatística comparando o número de genomas nos dois grupos de biópsias (frescas e parafinadas) estudadas também foi surpreendente e mostrou-se significativo após a correção de Bonferroni ($p \leq 0,05$) (Figura 19).

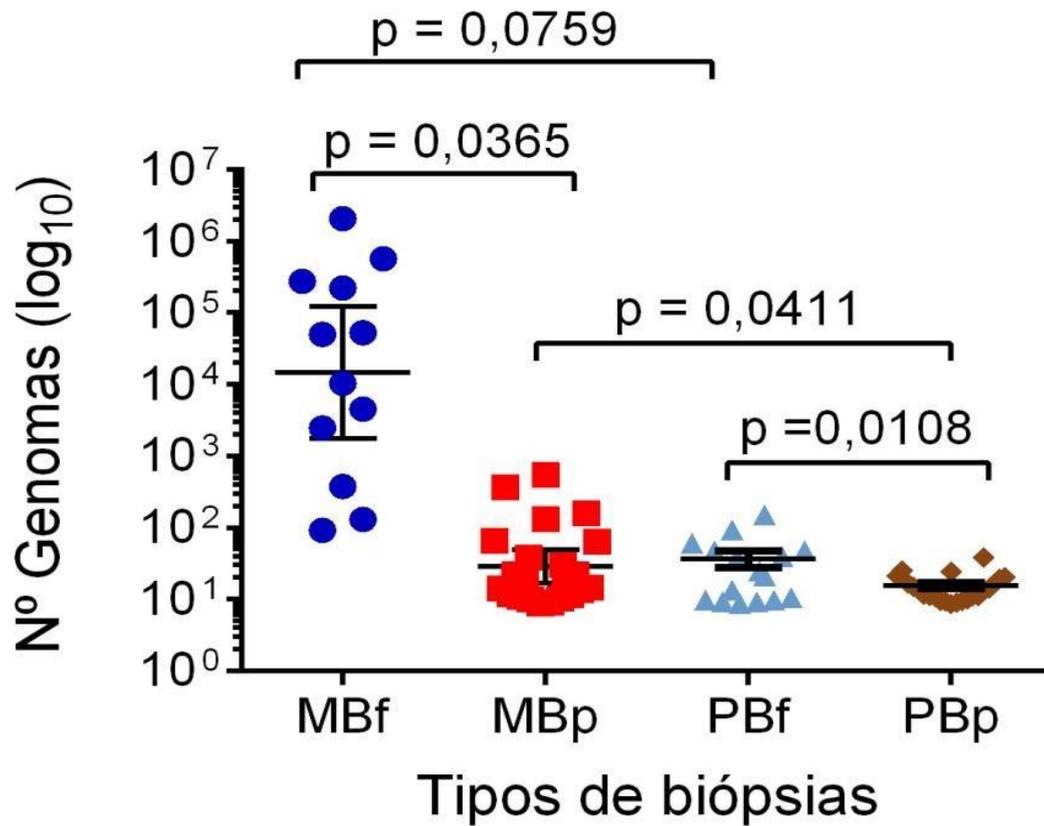


Figura 19 - Relação entre os tipos de biópsias *versus* o número de genomas (MBf: multibacilar biópsia fresca; MBp: multibacilar biópsia parafinada; PBf: paucibacilar biópsia fresca; PBp: paucibacilar biópsia parafinada; Ct: *Cycle threshold*; Nº: número; p: p-valor). A quantidade de genomas está representado em escala logarítmica.

6. DISCUSSÃO

Nos últimos 10 a 15 anos, uma quantidade relevante de estudos surgiu a respeito do uso de tecnologias do tipo *point-of-care* para o diagnóstico de doenças infecciosas. Várias técnicas baseadas na Biologia Molecular, bem como, ensaios imunológicos, têm se mostrado úteis, especialmente em tuberculose e em HIV. Paralelamente, ensaios de detecção de ácidos nucleicos semi-automáticos, em média/larga escala, de custo acessível também estão disponíveis, embora, as validações desses métodos para doenças negligenciadas, como a hanseníase, ainda não estejam disponíveis.

A literatura demonstra que a detecção do diagnóstico de hanseníase por PCR tem avançado de maneira relevante (Martinez *et al.*, 2014). É interessante que o desenvolvimento da técnica aplicada à detecção de *M. leprae* tem pouco mais de 25 anos (Woods & Cole, 1989). Os estudos originais baseavam-se em PCR associado à hibridação radioativa (Santos *et al.*, 1993), técnica que era muito laboriosa. Atualmente, os métodos de detecção baseados em fluorescência possibilitam a leitura da amplificação literalmente em “tempo real”, onde, a quantidade de fluorescência é proporcional à quantidade de DNA amplificado no sistema e detectado simultaneamente a replicação do DNA *in vitro*. Os métodos para extração de ácidos nucleicos também se modernizaram rapidamente e os métodos artesanais foram eliminados, como diversas etapas de purificação e utilização de reagentes de difícil manuseio. Atualmente, kits com soluções simples e purificação baseada em cartuchos ou outros dispositivos, facilitam a utilização do usuário. Assim, os métodos de extração acoplados a sistemas de qPCR possibilitam hoje análises quantitativas precisas, onde o número de genomas (dentre outras aplicações para quantificação de ácidos nucleicos, não discutidos aqui) é realizado sem etapas de pósprocessamento, que restringem inibição e/ou contaminação, dentre outros problemas inerentes à técnica de PCR.

Nos últimos anos, é muito interessante que realmente a PCR convencional ou quantitativa estejam sendo usadas em diferentes países endêmicos para detecção de DNA de *M. leprae*, em diferentes tipos de amostras (Martinez *et al.*, 2014). Além disso, a qPCR tem se mostrado valiosa especialmente para detectar casos difíceis de formas clínicas classificadas operacionalmente como paucibacilares (Barbieri *et al.*, 2014).

Mais recentemente, alguns grupos de pesquisa estão estabelecendo coortes de contatos domiciliares de pacientes para estimar a chance de indivíduos com PCR positivo avançar da infecção latente (contatos), para a doença ativa, indicando que indivíduos com PCR positivo, têm de fato, maior risco de adoecimento (Reis *et al.*, 2013). Mais recentemente, este mesmo grupo apresentou um resultado importante onde alguns doadores de sangue assintomáticos, com resultado de qPCR positivo, desenvolveram hanseníase em um acompanhamento de 5 anos (Goulart *et al.*, 2015).

Apesar dos recentes avanços no combate à doença, onde o tratamento eficiente está disponível, a hanseníase é uma infecção silenciosa que pode durar longos períodos de incubação. Assim, visando a interrupção da cadeia de transmissão, uma abordagem mais ousada seria a quimioprofilaxia de indivíduos infectados, que poderia ser definida pelo qPCR positivo, por exemplo.

Neste estudo, procurou-se validar resultados anteriores (Martinez *et al.*, 2011, Barbieri *et al.*, 2014) de forma independente para utilização da técnica de detecção de DNA de *M.leprae* pela reação de qPCR. No entanto, há uma lacuna importante para estudos multicêntricos bem desenhados utilizando-se ensaios de qPCR únicos que possam ser comparados.

A comparação de novos métodos diagnósticos na hanseníase tem uma característica peculiar, que é a ausência de padrão-ouro para comparação desses novos métodos. O estudo de Martinez e colaboradores (2011), um dos poucos trabalhos na literatura que empregou uma comparação de amostras de pacientes hansenianos e de pacientes com outras dermatoses, para fins de estimativas de sensibilidade e especificidade, respectivamente, detectou DNA de *M.leprae* dentre amostras classificadas como outras dermatoses. A detecção pode ser devido ao diagnóstico equivocado da histopatologia ou da clínica. É curioso que algumas amostras diagnosticadas para histopatologia como granuloma anular sejam positivas para qPCR de DNA de *M.leprae* (Moraes MO, comunicação pessoal), como foi o caso de uma das amostras desse grupo de biópsias frescas. Algumas das doenças granulomatosas são especialmente confundidoras, como a sarcoidose, pois a presença de granuloma epitelióide é um sinal cardinal na histopatologia que define uma “chave” de classificação onde está também a hanseníase, indicando a probabilidade média de ser hanseníase, mas não exclui outra inflamação granulomatosa (Barbieiri *et al.*, 2014). A detecção de DNA de *M.leprae*, dentre

pacientes com outras dermatoses, pode ainda ser devido a possibilidade de terem uma infecção subclínica. De fato, muitas das amostras positivas ao qPCR, nesse grupo de outras dermatoses, relatam histórico de contato com a hanseníase. Portanto, poderia sugerir que haveria algum DNA de *M. leprae* na pele. Se esse DNA é associado à lesão, é difícil de se estabelecer.

Uma limitação desse estudo foi incluir apenas nove amostras de outras dermatoses. Na verdade, um painel com amostras isoladas de doenças de pele infecciosas, com apresentações clássicas, como, leishmaniose tegumentar ou tuberculose cutânea, poderia aumentar o número amostral e a clareza de definição diagnóstica poderia melhorar a análise. De fato, a única forma de esclarecer o confundimento, dado que duas das seis das amostras de outras dermatoses (34%) foram positivas ao qPCR, é a prova terapêutica, pois como são doenças crônicas, a remissão completa da lesão pode ser demorada. E eventualmente, pacientes com diagnóstico de outras dermatoses que não apresentam remissão da lesão poderiam ser reavaliados. Portanto é possível que as amostras diagnosticadas hoje, como granuloma anular, possam ainda ser classificadas como hanseníase no futuro. De fato, no estudo de Martinez e colaboradores (2011) houve a detecção de 7 amostras positivas (em 20 testadas) para o ensaio de *RLEP* de qPCR real, em amostras diagnosticadas como outras dermatoses, pelo Ambulatório Souza Araújo. Como se tratava de um estudo retrospectivo, uma busca no SINAN indicou que 3 desses pacientes, foram encontrados no registro do Ministério da Saúde, indicando que foram diagnosticados com hanseníase alguns anos depois do diagnóstico.

Uma das análises interessantes foi avaliação do teste de qPCR para diagnóstico de amostras consideradas inconclusivas. Os resultados do presente estudo para as amostras inconclusivas, sugerem que quando avaliado o resultado da histopatologia “descritivo”, apenas frente ao número de genomas, é possível inferir que a amostra é de um paciente de hanseníase, claramente apoiada por suspeita clínica dermatológica. Quando a amostra apresenta um alto número de genomas, é razoável dizer que a probabilidade do diagnóstico ser hanseníase é alta. Entretanto, dado a especificidade do ensaio de 67%, algumas amostras são provavelmente falsos positivos. Isso considerando que o estabelecimento do ponto de corte, ainda que empírico, seja baseado em estudos anteriores (Martinez *et al.*, 2011; Barbieri *et al.*, 2014), onde o valor do Ct (*Cycle threshold*), faz uma inferência a partir de curvas padrão utilizadas anteriormente, que indicam que o valor de Ct de 37, apresenta algo

como 8 genomas. Este valor, teoricamente, sugeriria uma chance maior de termos mais especificidade. Assim, apenas um acompanhamento de longo prazo e eventualmente a prova terapêutica quando indicado pelo dermatologista que poderiam auxiliar na análise definitiva dos resultados.

Mesmo assim, os dados em pacientes confirmaram a maior parte dos estudos da literatura que conseguem detectar DNA em 100% das amostras frescas, de pacientes multibacilares, e, 52% das amostras paucibacilares. Estudos realizados com qPCR indicam uma positividade de 50-75% no grupo de pacientes com poucos bacilos (Kramme *et al.*, 2004; Martinez *et al.*, 2006; Rudeeaneksin *et al.*, 2008). Curiosamente, assim como observado neste estudo, Yan e colaboradores (2014) demonstraram uma positividade em torno de 75% em biópsias parafinadas de pacientes paucibacilares (PB). O resultado é surpreendente dado que usando o mesmo ensaio, o 16S rDNA, a positividade nas amostras recuperadas de parafina foi maior que nas amostras frescas. E, o inverso foi observado na comparação entre biópsias de pacientes multibacilares, quando comparados aos dois tipos de armazenamento (fresca/álcool *versus* parafina), ou seja, em pacientes MB as biópsias frescas tiveram um melhor rendimento. É surpreendente que a positividade nesse grupo de MB tenha sido baixa em amostras de parafina (69%).

A degradação de DNA em amostras parafinadas é um fato descrito e está associado ao período de fixação. Normalmente, a fixação rápida (3-4h) gera amostras com DNA de qualidade para análises posteriores. Entretanto, na rotina e nos procedimentos de laboratórios estruturados, a fixação é feita por mais de 24h, o que conhecidamente, leva a degradação do DNA. Entretanto, parece que esse efeito foi proeminente apenas em amostras com muitos bacilos. As amostras de pacientes paucibacilares não apresentaram essa perda de eficiência e pelo contrário, parecem mais adequadas à realização de ensaios de qPCR. Curiosamente, os pacientes com diagnóstico difícil são justamente de formas paucibacilares. Portanto, é interessante sugerir uma árvore de decisão clínica para diagnóstico (Figura 17). Antes, entretanto, é necessário aumentar o número amostras, especialmente entre o grupo de outras dermatoses no sentido de qualificar e aumentar a robustez das análises de especificidade e sensibilidade. De qualquer forma, há a possibilidade de utilizar amostras de arquivo para ensaios de qPCR, quando o resultado da patologia for inconclusivo. Isso é uma novidade e pode sugerir, caso reproduzido independentemente, uma nova estratégia de menor custo para a realização do qPCR.

Mesmo assim, o estudo carece da comparação da mesma amostra incluída em parafina e armazenada em álcool 70% para estimativas precisas do número de genomas de uma mesma amostra clivada e testada com as duas técnicas de armazenamento.

A análise do número de genomas é muito interessante, pois de fato, confirma que as amostras de pacientes MB têm mais DNA e conseqüentemente, mais bacilos que os pacientes PB, sugerindo que a metodologia seria capaz de inferir uma espécie de índice baciloscópico molecular (Figura 19). Mesmo assim, uma surpresa foi justamente a detecção de boa quantidade de DNA das amostras recuperadas de parafina dentre os pacientes paucibacilares. Como dito anteriormente, há necessidade da melhoria do teste de qPCR nas condições utilizadas nesse estudo para aplicação clínica, mas a detecção de alta carga molecular é certamente compatível com hanseníase e pode antever algumas aplicações interessantes. Por exemplo, parte dos dados para tentar correlacionar o número de genomas entre de formas clínicas específicas não apresenta a linearidade esperada.

Na classificação MHV, há variações grandes nas cargas moleculares (onde números de genomas altos e médios são observados) e esse resultado é interessante que sugere que carga total pode ser muito variável na biópsia (mesmo considerando que algumas amostras podem haver artefatos técnicos, como inibição do qPCR, por exemplo). Mesmo assim, pacientes com formas bacilíferas podem ter variações de mais de 10.000X, todos classificados como Virchovianos. De fato, pacientes do pólo lepromatoso apresentam diferenças importantes no índice baciloscópico e portanto, essa grande variabilidade no número de genomas em uma mesma forma clínica, não é novidade. Entretanto, a possibilidade de quantificar precisamente o número de bacilos em pacientes com alta carga bacilar pode ser uma estratégia para personalizar tratamentos e eventualmente avaliar a ausência da melhora frente ao tratamento e/ou falha terapêutica. Portanto, a técnica poderia ser usada em análises de seguimento nos mesmos pacientes para avaliar a eficácia do tratamento.

Atualmente, vem se discutindo a uniformização do tratamento PQT para todos os pacientes com hanseníase, independente da forma clínica. Um grande estudo clínico chamado de MDT-U preconiza o uso dos três medicamentos em PB e MB por 6 meses (Penna *et al.*, 2014). Portanto, a introdução de um novo esquema terapêutico pode se valer de uma técnica precisa e quantitativa para o acompanhamento longitudinal de pacientes, na tentativa de avaliar cuidadosamente a melhora associada

ao clareamento da carga bacilar estimada molecularmente. Ainda, uma variação da técnica não estudada aqui, mas que teria uma grande utilidade seria a aplicação de RT-PCR quantitativo para estimar não apenas a quantidade de bactérias, mas a viabilidade a partir de detecção do RNAm (Martinez *et al.*, 2009). Essa metodologia vem sendo largamente empregada em estudos para acompanhar longitudinalmente em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* a viabilidade do *M.leprae* (Lobato *et al.* , 2014; Teles *et al.*, 2015). Portanto, o estudo apresentado aqui, embora com limitações, abre uma perspectiva interessante porque define bases para análises quantitativas e cria a infra-estrutura de Biologia Molecular para o desenvolvimento e aprimoramento de outros métodos baseados em qPCR (como o desenvolvido para detecção de RNA), mais aprofundados e necessários aos enfrentamentos da hanseníase, no futuro próximo.

A distinção entre os estágios da hanseníase uma doença crônica e de evolução lenta, como, exposição, infecção latente e doença ativa é um desafio atual. Na verdade, devido às dificuldades específicas associadas a biologia do bacilo, como, a incapacidade de replicação em meios de cultura *in vitro*, houve um relativo atraso no desenvolvimento de ferramentas para a detecção inequívoca da doença. E, infelizmente, até hoje, não há testes eficientes para especialmente distinguir doença ativa, da infecção latente. Um dos complicadores é justamente a característica espectral da doença, onde os bacilos podem ou não ser detectados em formas com pouco ou nenhum bacilo *versus* muitos bacilos. Claramente, as formas bacilíferas (com exceções) não tem diagnóstico complicado. O problema é notadamente entre os pacientes do pólo paucibacilar, que ainda apresenta diversas outras dermatoses de etiologia desconhecida, que são parecidas tanto na observação clínica, quanto nas análises clássicas, como a contagem bacilar (que é negativa para todos), e a histopatologia que apresenta, por exemplo, um granuloma epitelióide em sarcoidose ou hanseníase. Esses métodos clássicos, portanto não são capazes em alguns casos de aumentar a precisão diagnóstica. Para isso, análises alternativas utilizando-se parâmetros imune como ensaios sorológicos ou de secreção de interferon-gama (IFN γ) podem ser utilizados. Os ensaios sorológicos são muito pouco específicos e tendem a apresentar-se como a baciloscopia, ou seja, é positivo em pacientes bacilíferos e negativos em pacientes do pólo PB (Fabri *et al.*, 2015). E, os estudos de secreção de interferon, frente desafio a antígenos específicos, não distinguem contatos, de pacientes paucibaciliares com clareza (Martins *et al.*, 2012). Por isso, os

resultados indicam que a PCR quantitativa ainda seria uma técnica mais promissora (Martinez *et al.*, 2014). Nesse primeiro estudo na FUAM, o método necessita de ajustes para poder melhorar a especificidade.

Estudos conduzidos nos últimos 15 anos, desde a publicação do genoma de *M. leprae*, levaram ao desenvolvimento de melhores ensaios para a amplificação de alvos/genes específicos a partir de PCR para o diagnóstico da hanseníase e monitoramento de contatos. E também a validação de tecnologias do tipo *point-of-care*, baseadas em testes sorológicos ou para a detecção de DNA. Em *M. tuberculosis* tem se utilizado amplamente a tecnologia de detecção em cartuchos individuais que podem ser realizados ambulatorialmente. Não há motivos para crer que as mesmas vantagens de uma rápida detecção não possam ser observadas na hanseníase, embora alternativas mais eficazes em termos de custos, poderiam ser adequadas como a de ensaios em média escala, já que, atualmente, há termocicladores com a possibilidade de realizar 384 amostras por ensaio.

Em resumo, observamos nesse estudo especialmente devido à especificidade baixa, que o método testado de qPCR para 16S rDNA precisa de ajustes. Como perspectiva, antevemos a necessidade de análise dos resultados utilizando-se método baseado em aprendizado de máquina, que é uma inferência matemática para estimar o valor de corte para amostras positivas e negativas. Baseado neste resultado, será possível recalcular os valores de especificidade e reavaliar a necessidade de modificações mais detalhadas, para o aprimoramento da técnica. É curioso que o mesmo ensaio conduzido no Rio de Janeiro estime valores mais específicos (Moraes MO, comunicação pessoal). Entretanto, pequenas variações na calibração do equipamento ou adequação da infra-estrutura podem ser determinantes e deverão ser investigadas. Mesmo assim, podemos concluir que há indicações que o teste pode ser utilizado para algumas aplicações, como, estimativas mais precisas do número de genomas e eventualmente (baseado na carga bacilar), casos de difícil diagnóstico poderiam recorrer ao método para incluir (ou excluir) a hanseníase. Ainda, os dados indicam a possibilidade de utilização de amostras parafinadas que, surpreendentemente, apresentaram rendimento muito superior ao de biópsias frescas. Isso indica que pode ser realizado um algoritmo de decisão clínica (Figura 17) em situação para casos de difícil diagnóstico com as amostras de parafina, diminuindo os custos e facilitando a logística. Os resultados indicam ainda que, no futuro próximo, há possibilidade de

montar uma infra-estrutura para os ensaios de qPCR para vigilância de contatos e estudos para estimativa do risco de adoecimento.

7. CONCLUSÃO

- O desempenho do teste molecular para o alvo 16S foi satisfatório, tanto em biópsias frescas quanto parafinadas. Novos ajustes necessitam ser realizados na técnica e visando a eficiência do teste;
- A quantificação do número de genomas corroborou com a classificação operacional de pacientes com hanseníase: um maior número de genomas em MB e uma menor quantidade em PB;
- Apenas no grupo de biópsias frescas foi possível fazer comparação dos resultados entre pacientes com hanseníase e pacientes de outras dermatoses, a partir desses dados foi obtida a sensibilidade de 68,5% e especificidade de 67,70% em biópsias frescas;
- Mais uma vez foi possível observar que a utilização da qPCR pode ser de grande importância, principalmente em casos considerados de difícil diagnóstico;
- Mesmo que preliminares, estes resultados demonstram que o 16S pode auxiliar no diagnóstico da hanseníase, mesmo quando os parâmetros clínicos e laboratoriais são inconclusivos;
- Comparando os resultados entre biópsias frescas e parafinadas, as biópsias frescas de pacientes multibacilares, tiveram um melhor rendimento.

8. REFERÊNCIAS

ALMEIDA EC, MARTINEZ AN, MANIERO VC, SALES AM, DUPPRE NC, *et al.* (2004) Detection of *Mycobacterium leprae* DNA by polymerase chain reaction in

the blood and nasal secretion of Brazilian household contacts. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 99: 509–511.

AMAZONAS; Superintendência de Saúde do Estado; Instituto de Dermatologia Tropical e Venereologia Alfredo da Matta. **Instituto "Alfredo da Matta" ontem e hoje: uma história de saúde pública: 1955-1997**. Manaus: IDTVAM, 1997. 245 p.

BARBIERI, R.R. *et al.*, 2014. Diagnostic challenges of single plaque-like lesion paucibacillary leprosy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 109(7), pp.944–947.

BHAT, R. M.; PRAKASH, C. “Leprosy: an overview of pathophysiology.” **Interdisciplinar Perspectives on Infectious Diseases**, 2012: 1-6.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO. Manaus: Fundação Alfredo da Matta, 2014 - .Anual.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Guia para o Controle da hanseníase**. Brasília: Ministério da Saúde, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Coordenação Geral de Hanseníase e Doenças em Eliminação. Indicadores epidemiológicos e operacionais de hanseníase Brasil 2012.

BRITTON WJ, LOCKWOOD DN. **Leprosy**. **Lancet**. 2004; 363: 1209-1219.

COLE ST, EIGLMEIER K, PARKHILL J, JAMES KD, THOMSON NR, WHEELER PR, *et al.* Massive gene decay in the leprosy bacillus. **Nature**. 2001; 409(6823): 1007-11.

COURA JR *et al.* Hanseníase: Aspectos Epidemiológicos, Clínicos e Imunológicos. In: **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara- Koogan, 2005.

DOULL JA, GUINTO RS, RODRIGUES JN, BANCROFT H. The incidence of leprosy in Cordova and Talisay, Cebu, PI. (1942). **Int. J. Lepr.** 10, 107-31.

DUTHIE MS, TRUMAN RW, GOTO W, O'DONNELL J, HAY MN, *et al.* (2011) Insight toward early diagnosis of leprosy through analysis of the developing

antibody responses of *Mycobacterium leprae*-infected armadillos. **Clin Vaccine Immunol** 18: 254–259.

EICHELMANN K, ET AL. Lepra: Puesta al día. Definición, patogénesis, clasificación, diagnóstico y tratamiento. **Actas Dermosifiliogr**. 2013;104:554-63

EIDT, L. M., Breve história da hanseníase: sua expansão do mundo para as Américas, o Brasil e o Rio Grande do Sul e sua trajetória na saúde pública brasileira. **Saúde e Sociedade** v.13, n.2, p.76-88, 2004.

FABRI A, CARVALHO AP, ARAUJO S, GOULART LR, DE MATTOS AM, TEIXEIRA HC, GOULART IM, DUTHIE MS, CORREA-OLIVEIRA R, LANA FC. Antigen-specific assessment of the immunological status of various groups in a leprosy endemic region. **BMC Infect Dis**. 2015 30;15:218.

FOSS, N. T. Hanseníase: aspectos clínicos, imunológicos e terapêuticos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 74, n. 2, p. 113-19, 1999.

FUAM, Disponível em <http://www.fuam.am.gov.br/institucional/historico/> acesso em agosto de 2015.

GOMES, A. C. B. O processo de Armauer Hansen. **Jornal do Conselho Regional de Medicina do Rio Grande do Sul**, p.13, fev. 2000 .

GOULART IM, ARAUJO S, FILHO AB, DE PAIVA PH, GOULART LR. Asymptomatic leprosy infection among blood donors may predict disease development and suggests a potential mode of transmission. **J Clin Microbiol**. 2015 Jul 22. pii: JCM.01305-15. [Epub ahead of print]

JARDIM MR, ANTUNES SL, SANTOS AR, NASCIMENTO OJ, NERY JA, et al. (2003) Criteria for diagnosis of pure neural leprosy. **J Neurol** 250: 806–809.

KELLERSBERGER, E. R. “The social stigma of leprosy. ” **Ann N Y Sci**, v. 34 (1951): 126.

KIRCHHEIMER WF, STORRS EE, BINFORD CH. Attempts to establish the Armadillo (*Dasypos novemcinctus* Linn.) as a model for the study of leprosy. II.

Histopathological and bacteriological post-mortem findings in lepromatoid leprosy in the Armadillo. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**. 1972 Jul-Sep; 40(3): 229-42.

KRAMME S, BRETZEL G, PANNING M, KAWUMA J, DROSTEN C. Detection and quantification of *Mycobacterium leprae* in tissue samples by real-time PCR. **Med Microbiol Immunol**. 2004;193(4):189-93.

LOBATO LS, ROSA PS, FERREIRA JDA S, NEUMANN ADA S, DA SILVA MG, DO NASCIMENTO DC, SOARES CT, PEDRINI SC, OLIVEIRA DS, MONTEIRO CP, PEREIRA GM, RIBEIRO-ALVES M, HACKER MA, MORAES MO, PESSOLANI MC, DUARTE RS, LARA FA. Statins increase rifampin mycobactericidal effect. **Antimicrob Agents Chemother**. 2014;58(10):5766-74.

MACIEIRA, S. Aspectos Microbiológicos do *Mycobacterium leprae*, Em **Noções de hansenologia**. Opromolla, D. V. A., Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato, São Paulo, Bauru, 2000.

MADRID – A International Congress of Leprosy. Propositions of a group of leprologists of Madrid regarding the classification of leprosy. **Actas Dermosifiliogr**. 1953 Jun; 44(9): 706-8.

MARTINEZ A.N., LAHIRI R., PITTMAN T.L., SCOLLARD D., TRUMAN R., MORAES M.O. Molecular Determination of *Mycobacterium leprae* Viability by Use of Real-Time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, July 2009.

MARTINEZ A.N., RIBEIRO-ALVES M., SARNO E.N., MORAES M.O., Evaluation of qPCR-Based Assays for Leprosy Diagnosis Directly in Clinical Specimens. **PLoS Negl Trop Dis** Volume 5 October 2011.

MARTINEZ AN, BRITTO CF, NERY JA, SAMPAIO EP, JARDIM MR, SARNO EN, MORAES MO. Evaluation of real-time and conventional PCR targeting complex 85 genes for detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin biopsy samples from patients diagnosed with leprosy. **J Clin Microbiol**. 2006;44(9):3154-9.

MARTINEZ AN, LAHIRI R, PITTMAN TL, SCOLLARD D, TRUMAN R, MORAES MO, WILLIAMS DL. Molecular determination of Mycobacterium leprae viability by use of real-time PCR. **J Clin Microbiol**. 2009;47(7):2124-30.

MARTINEZ AN, TALHARI C, MORAES MO, TALHARI S (2014) PCR-Based Techniques for Leprosy Diagnosis: From the Laboratory to the Clinic. **PLoS Negl Trop Dis** 8(4): e2655. doi:10.1371/journal.pntd.0002655.

MARTINS MVSB, GUIMARÃES MMDS, SPENCER JS, HACKER MAVB, COSTA LS, et al. Pathogen-Specific Epitopes as Epidemiological Tools for Defining the Magnitude of Mycobacterium leprae Transmission in Areas Endemic for Leprosy. **PLoS Negl Trop Dis** 6(4): e1616. doi:10.1371/journal.pntd.0001616 2012.

MATHESON C.D., VERNON K.K., LAHTI A., FRATPIETRO R., SPIGELMAN M., et al. (2009) Molecular Exploration of the First-Century Tomb of the Shroud in Akeldama, Jerusalem. **PLoS ONE** 4(12): e8319.

NOORDEEN SK. Infectivity of leprosy. In: Chatterjee BR (ed). A Window on leprosy. Ghandi Memorial Foundation, New Delhi, pp 59-63

OPROMOLLA, D.V. A. **Noções de hansenologia**. Bauru: Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato, 2000.

PENNA ML, BÜHRER-SÉKULA S, PONTES MA, CRUZ R, GONÇALVES HDE S, PENNA GO. Results from the clinical trial of uniform multidrug therapy for leprosy patients in Brazil (U-MDT/CT-BR): decrease in bacteriological index. **Lepr Rev**. 2014;85(4):262-6.

RIDLEY D.S. Histological classification and the immunological spectrum of leprosy. *Bull World Health Organ*. 1974; 51(5): 451-65.

RIDLEY, D. S.; JOPLIN, W. H., "Classification of leprosy according to immunity a five group system. " **Int J Lepr**, 1966: 255-73.

ROSA, F.B. DA et al., 2013. Detection of Mycobacterium leprae in saliva and the evaluation of oral sensitivity in patients with leprosy. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, 108(5), pp.572–577.

RUDEEANEKSIN J, SRISUNGNGAM S, SAWANPANYALERT P, SITTIWAKIN T, LIKANONSAKUL S, PASADORN S, PALITTAPONGARNPIM P, BRENNAN PJ, PHETSUKSIRI, B. LightCycler real-time PCR for rapid detection and quantitation of Mycobacterium leprae in skin specimens. **FEMS Immunol Med Microbiol**. 2008;54(2):263-70.

SABIN, T. D.; SWIFT T. R.; JACOBSON, R. R. **Leprosy**. Vol. 2, em, Peripheral Neuropathy, por Thomas PK Dick PJ, 2081-108. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005.

SANTOS AR, DE MIRANDA AB, SARNO EN, SUFFYS PN, DEGRAVE WM. Use of PCR-mediated amplification of Mycobacterium leprae DNA in different types of clinical samples for the diagnosis of leprosy. **J Med Microbiol**. 1993 Oct;39(4):298304.

SCOLLARD D. M., ADAMS L. B., GILLIS T. P., KRAHENBUH J. L. L, TRUMAN R. W., WILLIAMS D. L., The Continuing Challenges of Leprosy. **Clinical Microbiology Reviews**, Apr. 2006.

SINGH, P.; COLE, S., Mycobacterium leprae: genes, pseudogenes and genetic diversity **Future Microbiol**. 2011 January ; 6(1): 57–71.

SISTEMA DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÕES/ SINAN- Secretaria de vigilância em saúde. Disponível em: www.saude.gov.br/sinan_net/ acesso em agosto de 2015.

SKINSNES, O. Immunopathology os leprosy: the century in review. **International Journal Leprosy**, Washington, v. 42, p. 329-360, 1973.

SPENCER JS, DOCKRELL HM, KIM HJ, MARQUES MA, WILLIAMS DL, et al. (2005) Identification of specific proteins and peptides in mycobacterium leprae suitable for the selective diagnosis of leprosy. **J Immunol** 175: 7930–7938

SPENCER JS, KIM HJ, WHEAT WH, CHATTERJEE D, BALAGON MV, et al.

(2011) Analysis of antibody responses to Mycobacterium leprae phenolic glycolipid I, lipoarabinomannan, and recombinant proteins to define disease subtype-specific antigenic profiles in leprosy. **Clin Vaccine Immunol** 18: 260–267.

TALHARI, S. **Hanseníase**, 5 ed., Manaus, 2015 Pág 248 Ilust. 290.

TELES RM, KELLY-SCUMPIA KM, SARNO EN, REA TH, OCHOA MT, CHENG G, MODLIN RL. IL-27 Suppresses Antimicrobial Activity in Human Leprosy. **J Invest Dermatol**. 2015 ;135(10):2410-7.

WILLIAMS DL, GILLIS TP, BOOTH RJ, LOOKER D, WATSON JD (1990) The use of a specific DNA probe and polymerase chain reaction for the detection of Mycobacterium leprae. **J Infect Dis** 162: 193–200.

WOODS SA, COLE ST. A rapid method for the detection of potentially viable Mycobacterium leprae in human biopsies: a novel application of PCR. **FEMS Microbiol Lett**. 1989;53(3):305-9.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. A guide to leprosy control. Geneva: WHO, 2 ed; 1988.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chemotherapy for leprosy. Report of a WHO Study Group. World Health Organ Tech Rep Ser. 1994; 847: 1-24.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global leprosy situation. Wkly Epidemiol Rec. 2012 Aug 24;87(34):317-28.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Taxas de prevalência mundial da hanseníase em 2011. Disponível em <http://www.who.int/lep/situation/Leprosy/> acesso em agosto de 2015.

WOROBEC SM. Current Approaches and Future Directions in the Treatment of Leprosy. **Research and Reports in Tropical Medicine** 2012; 3: 79–91.

YAN W., XING Y., YUAN L.C., YANG R. D., TAN F.Y., ZHANG Y. LIH. Y., Application of RLEP Real-Time PCR for Detection of *M. leprae* DNA in Paraffin-Embedded Skin Biopsy Specimens for Diagnosis of Paucibacillary Leprosy **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 90(3), 2014, pp. 524–529.

9. ANEXOS

ANEXO I - TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Título do Estudo: “A importância da Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa na detecção do *Mycobacterium leprae* em casos de hanseníase de difícil diagnóstico”

Investigadoras Responsáveis: Carolina Chrusciak Talhari Cortez e Maria Gláucia Silva de Lima

Instituição: Fundação Alfredo da Matta.

Você foi convidado a participar de uma pesquisa científica. É importante que você entenda algumas informações gerais que serão dadas a você e a todas as pessoas que participarão deste estudo: (1) Sua participação é totalmente voluntária. (2) Você poderá interromper sua participação em qualquer momento do estudo. (3) Não haverá nenhum tipo de punição ou perda de seus direitos caso não queira participar. Depois de lidas as explicações você pode fazer qualquer pergunta necessária para que não restem dúvidas a respeito da forma como será feito o estudo.

A hanseníase é doença infecto-contagiosa que afeta principalmente a pele e nervos periféricos e pode causar incapacidades físicas, as quais evoluem, potencialmente, para deformidades físicas permanentes. Segundo o Ministério da Saúde, o diagnóstico precoce da hanseníase e o seu tratamento adequado evitam a instalação das incapacidades físicas mais graves. Neste projeto propõe-se a utilização da reação em cadeia da polimerase quantitativa em biópsias cutâneas inconclusivas de pacientes com suspeita clínica de hanseníase atendidos na Fundação Alfredo da Matta. Caso venha se confirmar que a precisão diagnóstica deste método, pretende-se sugerir implantação na rotina como auxílio ao diagnóstico médico.

Procedimentos: As amostras coletadas serão biópsias cutâneas conforme recomendação do Ministério da Saúde e da OMS. Essas amostras serão fragmentadas e armazenadas de duas formas diferentes. Em etanol a 70% e armazenadas em freezer -70°C ou nitrogênio líquido, e a outra será armazenada em bloco de parafina até seu processamento.

Riscos e Desconfortos: inerentes ao procedimento da biópsia cutânea – sangramento, hematoma e infecção bacteriana secundária.

Benefícios: A participação neste estudo pode ajudar a esclarecer o diagnóstico da sua doença mais rapidamente e ajudará ainda na implantação da técnica na rotina da Fundação, caso os resultados confirmem a alta precisão diagnóstica do teste.

Acompanhamento Assistencial: Os indivíduos participantes deste estudo terão, sempre que necessário, esclarecimentos de dúvidas, acompanhamento clínico e laboratorial no que diz respeito à infecção por *Mycobacterium leprae*, podendo entrar em contato com a Médica Dermatologista Carolina Chrusciak Talhari Cortez (Departamento de Ensino e Pesquisa 3632-5858) e com a Biomédica Maria Gláucia Silva de Lima (Laboratório de Biologia Molecular 3632-4843) no horário de 09:00 as 15:00h. Sempre que necessário será prestada orientação médica da Fundação Alfredo da Matta.

Voluntariedade: A participação neste estudo é voluntária. Os participantes podem desistir de sua participação a qualquer momento, sem que isso atrapalhe o seu atendimento na Fundação Alfredo da Matta.

Confidencialidade, Privacidade e Anonimato: Os dados pessoais referentes à participação dos indivíduos neste estudo permanecerão confidenciais, não sendo divulgadas as suas identidades.

Uso de Material Biológico Coletado: O material biológico coletado (Biópsias) será utilizado para o que se propõe este estudo e será armazenado para estudos posteriores, que tenham o mesmo objetivo proposto neste estudo.

CONSENTIMENTO PÓS – INFORMAÇÃO

Manaus, ___/___/___

Assinatura do paciente

Nome do paciente

Assinatura do pesquisador

Nome do pesquisador

Este formulário foi lido para _____ (nome do paciente) em ___/___/___ pelo _____ (nome do pesquisador) enquanto eu estava presente.

Assinatura da testemunha

Nome da testemunha

Continuação

ANEXO II - Tabela geral dos pacientes avaliados neste estudo.

Biópsia	Amostra	Histórico MH	Hipótese	Histopatologia	Baciloscopia	Clínica	Classificação Operacional	Threshold 0,02	gPCR	Nº genomas
F	39	Contato	MHBT?	MHBT forma neural	Negativo	MHD	PB	37.04	Negativo	-
F	41	Não	Miralgia Parestésica? Hipercl. Residual? MH?	ç/ç com pele normal	Negativo	MHT	PB	37.05	Negativo	-
F	47	Não	MHBT?	GT incipiente c/c HBT/HT	Negativo	MHD	PB	37.16	Negativo	-
F	68	Sim	MHBT?	Descritivo c/c MHBT ou Tem involução	Negativo	MHT	PB	37.78	Negativo	-
F	77	Não	MHI?	Descritivo	Negativo	MHI	PB	*	Negativo	-
F	79	Contato	MHBT?	GT c/c HT/BT	Negativo	MHD	PB	*	Negativo	-
F	81	Não	MHD?	ç/ç MHBT	Negativo	MHD	PB	*	Negativo	-
F	85	Não	MHT/MHBT?	ç/ç MHI	Negativo	MHI	PB	37.96	Negativo	-
F	11	Sim	MHI?	MH reacional tipo I	Negativo	MHD	MB	33.4	Positivo	92,3
F	14	Não	MHBV?	MHV	4,25%	MHD	MB	28.5	Positivo	2452,99
F	26	Contato	MH(V/ BV)?	MHBV	3,25%	MHD	MB	26.34	Positivo	10412,62
F	29	Sim	MHV?	Eritema nodoso hansenico	Positivo	MHV + eritema nodoso	MB	32.89	Positivo	129,90
F	33	Não	MHBV/VV?	MHBV/VV	Positivo	MHV	MB	21.45	Positivo	274773,6
F	35	Ausente	MHV?	MHV	Positivo	MHV	MB	31.31	Positivo	374,02
F	50	Não	MHBT? MHBV/V?	MHV	Positivo	MHD	MB	36,93	Positivo	8,76
F	42	Sim	MHV?	MHV hansenoma	Positivo	MHV	MB	18.44	Positivo	2060230
F	57	Sim	MHV recidiva?	MHV	Positivo	MHV	MB	21.77	Positivo	221798,3
F	65	Não	Lupus Subagudo? MHV?	MHV	Positivo 3,0	MHV	MB	23.91	Positivo	52955,05

F: Frescas

P: Parafinadas

Continuação

Biópsia	Amostra	Histórico MH	Hipótese	Histopatologia	Baciloscopia	Clínica	Classificação Operacional	Threshold 0,02	gPCR	Nº genomas
F	19	Sim	Erro de classificação MH? MHBT?	Proc. Inflatatório Granulomatoso c/c reação tipo I em MHBT	Negativo	MHD	PB	36.78	Positivo	9,61
F	20	Contato	Granuloma anular? MH?	c/c MHBT	Negativo	MHD	PB	34.38	Positivo	47,29
F	27	Sim	MHD?	MHD em regressão	Negativo	MHD	PB	34.67	Positivo	39,46
F	44	Contato	MH?	c/c pele normal	Negativo	MHI	PB	34.04	Positivo	60,16
F	49	Não	MHBV? MHBT?	c/c MHBT	Negativo	MHD	PB	36.91	Positivo	8,81
F	55	Não	Psoríase?	Dermatite psoriaseforme	Não fez	MHD	PB	36.66	Positivo	10,42
	59	Não	MHI?	Descritivo	Negativo	MHI	PB	35.60	Positivo	21,18
F	70	Não	MH?	GT incipiente c/c HBT/HT	Ausente	MHD	PB	36.76	Positivo	9,74
F	71	Não	LES?MH?	1 e 2 descritivo	Negativo	MHI	PB	34.42	Positivo	46,65
F	72	Não	MHD?	c/c MHBT	Negativo	MHD	PB	32.66	Positivo	151,52
F	73	Sim	MH tratado?	c/c Dermatite Perivascular Superficial	Negativo	MHD	PB	36.86	Positivo	9,11
F	74	Não	MHBT	Descritivo	Não realizou	MHD	PB	36.30	Positivo	13,26
F	78	Sim	MHBT reação?	Descritivo	Negativo	MHD	PB	34.71	Positivo	38,42
F	13	Contato	Ausente	MHD	Negativo	MHD	PB	37.48	Negativo	-
F	15	Não	MHT/BT?	c/c MHBT	Negativo	MHD	PB	37.47	Negativo	-
F	28	Sim	MHI?	GT c/c HT	Negativo	MHT	PB	37.56	Negativo	-
F	32	Sim	Recidiva	Sem bacilo/2000 - MHBT, 2004 - Condrite	Negativo	MHD	PB	41.17	Negativo	-

F: Frescas

P: Parafinadas

Continuação

Biópsia	Amostra	Histórico MH	Hipótese	Histopatologia	Baciloscopia	Clínica	Classificação Operacional	Threshold 0,02	qPCR	Nº genomas
F	67	Não	MHV?	MHBV	Negativo	MHD	MB	27.58	Positivo	4540,66
F	69	Não	Urticária? Vasculite? MHBB?	MHBV	Negativo	MHD	MB	23.99	Positivo	50194,16
F	76	Não	MHBB / MHBL	MHV	Positivo	MHD	MB	20.36	Positivo	569920,1
F	2	Não	MH? Lupus Túmido?	c/c lupus túmido	Não tem	OD - Lupus túmido	*	*	Negativo	-
F	6	Não	MH? LUES? Pseudolinfoma ? Sweet?	Ausente	Negativo	OD - Micose fungóide granulomatosa	*	37.17	Negativo	-
F	21	Não	MHBT?Granuloma Anular?Pseudolinfoma?	Linfoma	Negativo	OD - Linfoma	*	39.02	Negativo	-
F	36	Não	Sarcoma? Micobacteriose?	Carcinoma	Não tem	OD - Lesão tumoral	*	35.81	Positivo	18,40
F	37	Não	Eritema nodoso?	Paniculite/ eritema nodoso	Não fez	OD - Eritema nodoso	*	*	Negativo	-
F	38	Não	Granuloma anular? MHBT?	Granuloma anular elastolítico	Negativo	OD - Granuloma anular	*	34.37	Positivo	48,24
F	56	Não	D. Bowen?	C/C ceratose actinica	Negativo	OD - Melanoma	*	37.49	Negativo	-
F	61	Não	Erupção Liquenóide? Micose?	Descritivo	Negativo	OD - Púrpura Pigmentar	*	*	Negativo	-
Biópsia	Amostra	Histórico MH	Hipótese	Histopatologia	Baciloscopia	Clínica	Classificação Operacional	Threshold 0,02	qPCR	Nº genomas

F: Frescas

P: Parafinadas

Continuação

Biópsia	Amostra	Histórico MH	Hipótese	Histopatologia	Baciloscopia	Clínica	Classificação Operacional	Threshold 0,02	qPCR	Nº genomas
F	75	Não	Lupus Cutâneo Subagudo? Erup. Polimorfa?	Descritivo	Não fez	OD - L.E subagudo	*	37.75	Negativo	-
F	3	Sim	MH?	Descritivo	Negativo	Inconclusivo	*	39.50	Negativo	-
F	5	Não	MH? Notalgia parestésica?	c/c hiperchromia residual	Negativo	Inconclusivo	*	36.44	Positivo	12,0
F	7	Sim	MHBT?	Descritivo	Negativo	Inconclusivo	*	36.54	Positivo	11,29
F	8	Sim	MHBV Recidiva?	Descritivo	Negativo	Inconclusivo	*	37.32	Negativo	-
F	18	Não	MHBT, Granuloma doença de Lyme	Descritivo Eritemas	Negativo	Inconclusivo	*	35.66	Positivo	20,34
F	23	Não	Eritema anular centrífugo	Sem bacilo/ Eritema anular centrífugo	N/realizada	Inconclusivo	*	36.47	Positivo	11,83
F	25	Não	Ausente	BAAR Ausente MHBB/Bowen	Negativo	Inconclusivo	*	38.6	Negativo	-
F	30	Contato	MHI?	Sem bacilo/ pele normal	Negativo	Inconclusivo	*	36.58	Positivo	10,99
F	34	Sim	LED?	Proc. Inflamatório Granulomatoso	Ausente	Inconclusivo	*	35.5	Positivo	22,64
F	40	Não	Hiperchromia? MH? Púrpura pigmentar?	Sem bacilo/ Descritivo infiltrado inflamatório	Negativo	Inconclusivo	*	36.37	Positivo	12,65
F	43	Não	Hiperchromia? Eritema?	Descritivo	Não tem	Inconclusivo	*	35.62	Positivo	20,90
F	53	Não	Rosácea? Lediscoide?	Descritivo	Não fez	Inconclusivo	*	41.49	Negativo	-

F: Frescas

P: Parafinadas

Continuação

Biópsia	Amostra	Histórico MH	Hipótese	Histopatologia	Baciloscopia	Clínica	Classificação Operacional	Threshold 0,02	qPCR	Nº genomas
P	1170	Não	MHBT?	ç/ç MHBT	Negativo	MHD	PB	35.97	Positivo	16,53
P	1301	Contato	Granuloma anular? MH?	ç/ç MHBT	Negativo	MHD	PB	36.12	Positivo	14,95
P	1304	Sim	Erro de classificação MH? MHBT?	Proc. Inflamatório Granulomatoso c/c reação tipo I em MHBT	Negativo	MHD	PB	36.94	Positivo	8,63
P	1492	Não	MHBT?	GT c/c HBT	Negativo	MHD	PB	34.71	Positivo	38,42
P	188	Não	MHBT	GT C/C MHT/BT	Ausente	MHD	PB	37.12	Negativo	-
P	221	Não	MHBT?	ç/ç MHBT	Negativo	MHD	PB	40.68	Negativo	-
P	324	Não	MHD?	ç/ç MHBT	Negativo	MHD	PB	37.16	Negativo	-
P	1150	Contato	MHBT?	ç/ç MHT/BT	Negativo	MHT	PB	38.14	Negativo	-
P	1182	Não	MHBT?	ç/ç MHBT	Negativo	MHD	PB	37.73	Negativo	-
P	1219	Não	MHT/BT?	ç/ç MHBT	Negativo	MHD	PB	41.25	Negativo	-
P	38	Não	MHBB?	MHBB/BV	Positiva	MHD	MB	35.08	Positivo	29,99
P	44	Sim	MHV históide? Recidiva?	Bacilos fragmentados, reação tipo II	Positivo	MHV/históide	MB	32.58	Positivo	159,86
P	94	Não	MHBB/BL?	MHBB/BL	1,25%	MHD	MB	33.92	Positivo	65,20
P	114	Não	MHV-VV históide?	MHV históide	5,00%	MHV	MB	31.35	Positivo	364,13
P	128	Contato	MHBV?	MHBV/VV	3,25%	MHD	MB	36.49	Positivo	11,67
P	129	Sim	MHV? Pteríase? Recidiva MHV?	MHV históide?	Positivo	MHV	MB	32.89	Positivo	129,90
P	246	Sim	MH?	MHV	5,25%	MHV	MB	36.19	Positivo	14,27
P	258	Não	MHV?	MHVV	Positivo	MHV	MB	35.54	Positivo	22,05

F: Frescas

P: Parafinadas

Continuação

Biópsia	Amostra	Histórico MH	Hipótese	Histopatologia	Baciloscopia	Clínica	Classificação Operacional	Threshold 0,02	qPCR	Nº genomas
P	267	Não	MHV?	MHV	4,25%	MHV	MB	36.15	Positivo	14,65
P	292	Não	MHBV?	MHBV	4,25%	MHD	MB	35.95	Positivo	16,75
P	312	Sim	Reação?	MHV em regressão	Positivo	MHV	MB	36.27	Positivo	13,52
P	348	Contato	MHBV?	MHBV?	1,75%	MHD	MB	36.89	Positivo	8,93
P	523	Sim	MHV?	Reação Tipo I	Positivo	MHV	MB	36.69	Positivo	10,21
P	545	Sim	MH?	Descritivo c/c MHMB	Negativo	MHV	MB	35.59	Positivo	21,32
P	586	Sim	MHLL-BL?	MHV-LL	5,25%	MHV	MB	33.96	Positivo	63,47
P	610	Sim	Recidiva MHV?	HV ativa com reação tipo II	Positivo	MHV	MB	34.71	Positivo	38,42
P	630	Não	MH históide?	sem bacilo/hanseníase históide	Positivo/0,5 %	MHV	MB	36.95	Positivo	8,58
P	702	Não	MHBV?	MHBV	Positivo	MHV	MB	36.61	Positivo	10,77
P	1090	Não	MHBT?ENH?	MHBV?	Positivo	MHD	MB	36.71	Positivo	10,07
P	1172	Sim	Ausente	MHV	Positivo	MHV	MB	30.76	Positivo	540,46
P	1218	Sim	MHD(BB-BV)	MHMB Tratado/ BAAR Fragmentados	Positivo	MHD	MB	36.53	Positivo	11,33
P	338	Não	MHD? MHBT? MHBB?	MHBT	Positivo	MHD	MB	37.29	Negativo	-
P	478	Sim	Psoríase? Eritema? Recidiva?	Descritivo	Ausente	MHV	MB	37.60	Negativo	-
P	737	Não	MHT? Hipocromia residual?	GT c/c HBT	Negativo	MHD	MB	37.83	Negativo	-
P	798	Contato	MHV?	MH-MB em involução	3,50%	MHV	MB			-
P	819	Sim	MHV?	BAAR Integors MHV	Positivo	MHV	MB	37.25	Negativo	-

F: Frescas

P: Parafinadas

Continuação

Biópsia	Amostra	Histórico MH	Hipótese	Histopatologia	Baciloscopia	Clínica	Classificação Operacional	Threshold 0,02	gPCR	Nº genomas
P	24	Não	MHBT?	ç/ç MHBT	Negativo	MHD	PB	35.69	Positivo	19,93
P	62	Contato	MHI?	ç/ç MHBT	Negativo	MHD	PB	36.88	Positivo	8,99
P	157	Sim	Recidiva?	MHBT- recidiva	Negativo	MHD	PB	35.95	Positivo	16,75
P	251	Contato	MH neural? MHI?	Descritivo	Negativo	MHI	PB	35.39	Positivo	24,37
P	261	Contato	MHT? Granuloma anular? Esclerodermia	GT c/c HT	Negativo	MHT	PB	35.59	Positivo	21,32
P	271	Contato	MHT?	ç/ç MHI/T	Negativo	MHI	PB	36.82	Positivo	9,36
P	299	Não	MHD?	Descritivo	Negativo	MHD	PB	36.49	Positivo	11,67
P	311	Contato	MHBT?	ç/ç MHT/BT	Negativo	MHT	PB	36.58	Positivo	10,99
P	376	Contato	MHBT? MHT?	Descritivo	Negativo	MHD	PB	36.19	Positivo	14,26
P	400	Não	MHI?MHT?	Descritivo	Negativo	MHD	PB	36.55	Positivo	11,21
P	401	Contato	MHBT?	Descritivo	Negativo	MHD	PB	35.38	Positivo	25,24
P	449	Não	MHBT?	Descritivo	Negativo	MHD	PB	36.28	Positivo	13,43
P	476	Sim	Ausente	Eczema numular	Não fez	MHD	PB	36.80	Positivo	9,48
P	493	Sim	MH?	Descritivo c/c MHT/BT	Não fez	MHD	PB	36.24	Positivo	13,80
P	497	Sim	MHI? Recidiva?	Dermatite perivascular superficial?	Negativo	MHD	PB	36.55	Positivo	11,21
P	544	Contato	MHI?	Descritivo	Negativo	MHI	PB	36.60	Positivo	10,84
P	712	Não	MH? Lupus Tumido?	Descritivo	Negativo	MHD	PB	35.65	Positivo	20,48
P	1034	Sim	MHBT? Recidiva?	ç/ç MHI/T Descritivo	Negativo	MHI	PB	36.72	Positivo	10,00
P	1038	Não	Ausente	GT c/c MHBT	Negativo	MHD	PB	35.74	Positivo	19,28
P	1115	Não	MHT/BT?	ç/ç MHT/BT	Negativo	MHD	PB	36.80	Positivo	9,49

F: Frescas

P: Parafinadas

Continuação

Biópsia	Amostra	Histórico MH	Hipótese	Histopatologia	Baciloscopia	Clínica	Classificação Operacional	Threshold 0,02	gPCR	Nº genomas
P	992	Não	MHBV?	MHBB/BV	3%	MHD	MB	37.43	Negativo	-
P	994	Não	MHV BV?	MHV	Positivo	MHD	MB	38.12	Negativo	-
p	1201	Não	MHBV?	MHV	4,25%	MHD	MB			-
P	1539	Sim	MHV/BV Recidiva	MHBV	Positiva	MHV	MB	37.74	Negativo	-
P	1472	Sim	Varicela?	Recidiva MHV	Positivo	MHV	MB			-
P	1504	Sim	MHB/DV?	MH MB/ reação tipo I	Negativo	MHV	MB	37.42	Negativo	-
P	1561	Sim	MHBV?	ζ/ζ MHBV	Negativo	MHD	MB	37.77	Negativo	-
P	1567	Não	Reação tipo I? MHBV?	Reação hansenica tipo I	Positivo	MHD	MB	37.05	Negativo	-