



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ANDRESSA ALMEIDA ALBUQUERQUE

ESTABELECIMENTO DE MÉTODOS MOLECULARES PARA DETECÇÃO DE
***Mycobacterium leprae* COMO FERRAMENTA DE DIAGNÓSTICO PARA**
HANSENÍASE

FORTALEZA

2024

ANDRESSA ALMEIDA ALBUQUERQUE

ESTABELECIMENTO DE MÉTODOS MOLECULARES PARA DETECÇÃO DE
Mycobacterium leprae COMO FERRAMENTA DE DIAGNÓSTICO PARA
HANSENÍASE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pela Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutora em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia em saúde.

Orientador: Prof^a. Dra. Aparecida Tiemi Nagao-Dias.

Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá.

FORTALEZA

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A298e Albuquerque, Andressa Almeida.

Estabelecimento de métodos moleculares para detecção de *Mycobacterium leprae* como ferramenta de diagnóstico para hanseníase / Andressa Almeida Albuquerque. – 2023.
116 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (Rede Nordeste de Biotecnologia), Fortaleza, 2023.

Orientação: Profa. Dra. Aparecida Tiemi Nagao-Dias.

Coorientação: Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá.

1. Hanseníase. 2. PCR em tempo real. 3. Anti-PGL1. I. Título.

CDD 660.6

ANDRESSA ALMEIDA ALBUQUERQUE

ESTABELECIMENTO DE MÉTODOS MOLECULARES PARA DETECÇÃO DE
Mycobacterium leprae COMO FERRAMENTA DE DIAGNÓSTICO PARA
HANSENÍASE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pela Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutora em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia em saúde.

Aprovada em: 31/01/2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Aparecida Tiemi Nagao-Dias (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Marco Antônio de Freitas Clementino
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Alexandre Casimiro de Macedo
Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente

Prof. Dr. Gdayllon Cavalcante Meneses
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dra. Danielle Malta Lima
Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por ser aquele que sempre me deu forças e iluminou o meu caminho.

Expresso minha sincera gratidão à minha orientadora, Prof.^a Dra. Aparecida Tiemi Nagao-Dias, por ter sido uma presença constante ao longo desses quase 10 anos de jornada científica. Agradeço pelos valiosos ensinamentos, colaborações enriquecedoras e, sobretudo, pela confiança, paciência e incentivo. Sua crença em mim nos momentos mais desafiadores foi fundamental.

Agradeço ao meu coorientador, Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá, por sua contribuição de extrema importância. Agradeço por compartilhar seu conhecimento, ensinando-me novas habilidades e guiando-me para adquirir o conhecimento que possuo hoje.

Agradeço à Prof.^a Dra. Paula Sacha Frota Nogueira e a todos os dedicados profissionais e alunos da Liga Acadêmica em Doenças Estigmatizantes (LADES- UFC), que deram suporte e participaram ativamente na realização desta pesquisa.

Agradeço ao Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal do Ceará (LACT-UFC) por fornecer equipamentos essenciais para a realização da minha pesquisa. A disponibilidade e o suporte oferecidos foram fundamentais para o progresso do meu trabalho.

Agradeço ao Instituto de Biologia Molecular do Paraná, em particular ao Dr. Luis Gustavo, Dra. Ana Claudia e Dr. Thiago, por gentilmente contribuírem em minha pesquisa.

Agradeço ao Prof. Dr. Célio Lopes Silva, Prof. Dr. Helio Vitoriano Nobre Junior e Prof.^a Dra. Cristiane Cunha Frota. Sua colaboração foi essencial para o progresso e aprimoramento da minha pesquisa.

Agradeço a todos os colegas do laboratório, em especial a Raphael de Oliveira Rodrigues e Camilla dos Santos Mateus, que não só me apoiaram diretamente durante o todo o meu doutorado, mas também pela consideração e disponibilidade para ajudar em qualquer situação.

Agradeço profundamente aos meus pais, Edmar Albuquerque Filho e Jacira Maria de Almeida, pelo apoio emocional singular e incondicional. Mesmo nos momentos em que não sabiam exatamente como me ajudar, permaneciam ao meu lado para me acalantar, acalmar e simplesmente estar presentes por mim.

Agradeço também aos meus irmãos, Vanessa Almeida Albuquerque e Rafael Almeida Albuquerque, que mostraram sua solidariedade e carinho por meio de palavras e ações, principalmente por estarmos todos na mesma situação acadêmica.

Agradeço à minha família pelo apoio, em especial à minha tia Yone Almeida pela dedicação e esforço incansáveis que ela dispensou para me auxiliar da melhor maneira possível.

Agradeço à minha psicóloga, Diana, por seu comprometimento e sua empatia, que foram fundamentais para o desenvolvimento desta tese e para o meu crescimento individual.

Agradeço às instituições FUNCAP/PPSUS/SESA, MCTI/CNPq/MS-SCTIE e à CAPES. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo bacilo *Mycobacterium leprae*. Por se tratar de uma patologia que possui elevado tempo de incubação, crianças com diagnóstico de hanseníase são um indicativo de transmissão ativa na comunidade. A associação das características das lesões de pele da hanseníase, as quais podem ser facilmente confundidas com outras doenças, com a subjetividade da avaliação dermatoneurológica, revela a necessidade de testes laboratoriais que auxiliem no diagnóstico, tornando-o menos subjetivo e, assim, minimizando os riscos e desafios relacionados ao diagnóstico tardio. O objetivo do presente estudo é estabelecer métodos de detecção de *M. leprae* por biologia molecular para identificação de grupos de risco para o desenvolvimento de hanseníase em contatos menores de 15 anos de pacientes com hanseníase e sua associação com resultados de avaliação dermatoneurológica e com positividade de anticorpos séricos para o antígeno glicolipídeo fenólico 1 (PGL1), específico de *M. leprae*. Foram validados dois tipos de técnicas de PCR em tempo real (qPCR) para detecção de DNA de *M. leprae* em amostras de sangue: Sybr Green e Taqman®. O kit comercial NATHANSeníase, recém aprovado para uso com amostras de biópsias de pele, foi também empregado para análise de amostras de DNA extraído de sangue total. Foram selecionados 56 casos-índice e 317 contatos menores de 15 anos residentes em Santana do Ipanema (AL), São Gonçalo do Amarante (CE) e Canindé (CE). Após avaliação dermatoneurológica, foram coletadas amostras de sangue total para detecção de DNA de *M. leprae* por qPCR e soro para dosagem de anti-PGL1 por ELISA indireto. Os alvos escolhidos para a qPCR foram os genes 16SrRNA e RLEP. Foi também empregada uma sequência genética de RLEP desenhada a partir do Programa Primer Express 3.0. Os testes para RLEP e 16S rRNA apresentaram sensibilidades analíticas de 1,57 fg/mL e 97,66 fg/mL. Enquanto os testes de RLEP mostraram especificidade analítica para DNA de *M. leprae*, 16S rRNA mostrou amplificação para DNA de outras micobactérias. Todos os testes apresentaram bom desempenho, conforme esperado, para curvas de amplificação de PCR. Quando foram aplicados nas amostras de DNA extraídas de contatos e casos, não houve correlação entre a sorologia e os testes moleculares. Entre os testes moleculares, houve uma leve correlação entre o kit NATHANSeníase e os testes de Taqman® e Sybr Green. Como conclusão, no presente trabalho foi possível estabelecer dois métodos moleculares para DNA de

Mycobacterium leprae que se mostraram sensíveis, específicos e reprodutíveis, utilizando duas sequências de RLEP e uma de 16S rRNA. No entanto, ainda não podem ser considerados validados para uso com amostras de sangue total, pois o estudo atual mostrou total discrepância entre os métodos.

Palavras-chave: hanseníase; PCR em tempo real; anti-PGL1.

ABSTRACT

Leprosy is a chronic infectious disease caused by the bacillus *Mycobacterium leprae*. As it is a pathology that presents a long time for incubation, children diagnosed with leprosy indicate active transmission in the community. Leprosy skin lesions, which can be easily confounded with other diseases, and the subjectivity of dermatoneurological evaluation, reveal the need for laboratory tests that could assist in the diagnosis, making it less subjective and, thus, minimizing risks and challenges related to late diagnosis. The objective of the present study was to establish methods for detecting *M. leprae* DNA by molecular biology to identify groups at risk for the development of leprosy contacts under 15 years of age and its association with results of dermatoneurological evaluation and with positivity of serum antibodies to the phenolic glycolipid antigen 1 (PGL1), specific to *M. leprae*. Two types of real-time PCR (qPCR) techniques were validated for detecting *M. leprae* DNA in blood samples, that is, Sybr green and Taqman®. The commercial NATHANS-Leprosy kit, recently approved for use with skin biopsy samples, was also used to analyze DNA samples extracted from whole blood. 56 index cases and 317 contacts under the age of 15 living in Santana do Ipanema (AL), São Gonçalo do Amarante (CE) and Canindé (CE) were selected. After dermatoneurological evaluation, whole blood samples were collected for detection of *M. leprae* DNA by qPCR and serum for anti-PGL1 measurement by indirect ELISA. The targets chosen for qPCR were the 16SrRNA and RLEP genes. An RLEP genetic sequence designed from the Primer Express 3.0 Program was also used. The tests for RLEP and 16S rRNA showed analytical sensitivities of 1.57 fg/μL and 97.66 fg/μL. While the tests for RLEP showed analytical specificity to *M. leprae* DNA, 16S rRNA also showed amplification to DNA from other mycobacteria. Nonetheless, 16S rRNA in Taqman® tests presented specificity to *M. leprae* DNA. All tests performed as expected for PCR amplification curves. When they were applied to DNA samples extracted from contacts and cases, there was no correlation between serology and molecular tests. Among the molecular tests, the NATHANS-Leprosy kit shows a slight correlation with the Taqman® and Sybr Green tests. In conclusion, in the present work it was possible to establish two molecular methods for *Mycobacterium leprae* DNA that proved to be sensitive, specific and reproducible using two RLEP sequences and one 16S rRNA sequence. However, they cannot yet be considered validated for use with whole blood samples, as the current study showed a complete discrepancy among the methods.

Keywords: leprosy; Real time PCR; anti-PGL1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Imagem do genoma do <i>Mycobacterium leprae</i>	32
Figura 2	- Métodos de visualização de fitas de nucleotídeo com fluoróforos: através do uso de fluoróforos intercalantes de DNA (<i>Sybr Green</i> , à esquerda) e de sonda de hidrólise (Taqman®, à direita)	34
Figura 3	- PCR em tempo real para DNA de <i>Mycobacterium leprae</i> , empregando o termociclador Bio-rad CFX (Bio-rad, USA) para amplificação das amostras. As curvas de amplificação estão ilustradas em azul (RLEPa), verde (RLEPb) e amarelo (16S r RNA) para as três concentrações testadas de <i>primer</i> , ou seja, 200 nM, 400 nM e 800 nM. Cada concentração foi testada em duplicata	48
Figura 4	- Gráfico de amplificação da validação de sonda. As linhas em azul e verde representam os alvos RLEPa e RLEPb, respectivamente, cujo fluoróforo é o FAM. As linhas em amarelo representam o alvo 16S rRNA, cujo fluoróforo é o VIC.....	49
Figura 5	- Curvas de dissociação de DNA <i>M.leprae</i> , utilizando como <i>primers</i> RLEPa (3a), RLEPb (3b) e 16S RNA (3c). As três concentrações testadas de <i>primer</i> foram 200nM, 400nM e 800nM. Cada concentração foi testada em duplicata. As curvas de menor fluorescência representam as menores concentrações de <i>primer</i>	50
Figura 6	- PCR pelo método <i>Sybr Green</i> , empregando-se como <i>primer</i> RLEPa (Figura 4a) e RLEPb (Figura 4b) e DNA de <i>Mycobacterium leprae</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Mycobacterium bovis</i> , <i>Mycobacterium fortuitum</i> , <i>Mycobacterium gordonae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Houve positividade apenas para DNA de <i>M. leprae</i>	52

- Figura 7 - PCR pelo método Taqman[®], empregando-se como *primer* RLEPa (Figura 5a) e RLEPb (Figura 5b) e DNA alvos de *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium gordonae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Houve positividade apenas para DNA de *M. leprae* 53
- Figura 8 - PCR pelo método Sybr Green, empregando-se como *primer* 16S rRNA e DNA alvos de *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium gordonae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Houve amplificação para DNA de *M. leprae* e para as demais espécies de *Mycobacterium*. Não houve amplificação para os demais gêneros..... 54
- Figura 9 - PCR pelo método Taqman[®], empregando-se como *primer* 16S rRNA e DNA alvos de *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium gordonae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Houve amplificação apenas para DNA de *M. leprae*. 54
- Figura 10 - Análise eletroforética dos amplicons obtidos a partir dos *primers* RLEPa, RLEPb e 16S rRNA em gel de agarose 5%. A ordem dos poços em todos os géis foram: 1- Marcador de 100 pares de bases, 2- *Mycobacterium leprae*, 3- *Mycobacterium tuberculosis*, 4- *Mycobacterium bovis*, 5- *Mycobacterium fortuitum*, 6- *Mycobacterium gordonae*, 7- *Staphylococcus aureus*, 8- *Enterococcus faecalis*, 9- *Escherichia coli*, 10- *Pseudomonas aeruginosa*, 11- *Mycobacterium leprae* e 12- Marcador de 100 pares de bases. Os amplicons foram corados com corante Syber Safe DNA stain e identificados pelo fotodocumentador ChemiDoc MP Imaging system (Bio-Rad, USA) 55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Escore Máximo, Cobertura de alinhamento, Valor E e percentual de identidade de <i>primers</i> e sondas para RLEPa e RLEPb com DNA de <i>M. leprae</i> , conforme cálculos realizados pelo BLAST.....	46
Tabela 2	- Escore Máximo, Cobertura de alinhamento, Valor E e percentual de identidade de <i>primers</i> e sondas para 16S rRNA com DNA de <i>Mycobacterium sp.</i> , <i>M. tuberculosis</i> e <i>M. leprae</i> , conforme análises realizadas pelo BLAST.....	47
Tabela 3	- Média dos valores de Cq e de RFU da duplicada de cada concentração de <i>primer</i> . RFU: unidades relativas de fluorescência; Cq: número de ciclos de amplificação necessários para a fluorescência começar a ser detectada.....	48
Tabela 4	- Média dos valores de Cq e de RFU da duplicada de cada concentração de sonda. RFU: unidades relativas de fluorescência; Cq: Número de ciclos de amplificação necessários para a fluorescência começar a ser detectada.....	49
Tabela 5	- Curvas padrão de DNA de <i>M. leprae</i> utilizando os <i>primers</i> RLEPa, RLEPb, 16S RNA pelo protocolo de Syber Green. Foram calculados os valores de eficiência (E), linearidade (r^2) e <i>slope</i> de três curvas realizadas para cada <i>primer</i> . Para a realização das curvas, utilizou-se DNA extraído de <i>M. leprae</i> (BEI RESOURCES, USA), em concentrações que variaram de 1,53 a 50.000fg/ μ L.....	56
Tabela 6	- Curvas padrão de DNA de <i>M. leprae</i> utilizando o <i>primer</i> RLEPa, RLEPb, 16S RNA pelo protocolo de Taqman®. Foram calculados os valores de eficiência (E), linearidade (r^2) e <i>slope</i> de três curvas realizadas para cada <i>primer</i> . Para a realização das curvas, utilizou-se DNA extraído de <i>M. leprae</i> (BEI	

	RESOURCES, USA), em concentrações que variaram de 1,53 a 50.000fg/ μ L.....	57
Tabela 7	- Valor de <i>cut-off</i> , ou limiar de reatividade, baseado no número de ciclos necessários para atingir a menor concentração de DNA de <i>M. leprae</i>	58
Tabela 8	- Análise descritiva dos dados coletados nos casos de hanseníase (n = 56) e nos contatos entre 4 e 15 anos de idade (n = 317).	58
Tabela 9	- Frequência de positividade e negatividade em casos-índice de hanseníase (n = 56) e em seus contatos (n = 317), com relação à sorologia (anti-PGL1) e testes moleculares para DNA de <i>M. leprae</i>	60
Tabela 10	- Análise descritiva da frequência de positividade em 9 casos de hanseníase e em 134 contatos, com relação à sorologia (anti-PGL1) e testes moleculares para DNA de <i>M. leprae</i> , incluindo NATHANS.....	61
Tabela 11	- Análise de concordância entre sorologia anti-PGL1 e testes moleculares de Taqman® para <i>M. leprae</i> entre 56 casos-índice de hanseníase e seus 317 contatos. Para efeitos de cálculo do fator kappa, amostras com 0 isotipos de anticorpos foram consideradas negativas, aquelas com 1 isotipo de anticorpo foram consideradas inconclusivas e as que apresentavam 2 ou mais isotipos de anti-PGL1 foram consideradas positivas.....	62
Tabela 12	- Análise de concordância entre sorologia anti-PGL1 e teste molecular de <i>Sybr Green</i> para <i>M. leprae</i> entre 56 casos-índice de hanseníase e seus 317 contatos. Para efeitos de cálculo do fator kappa, amostras com 0 isotipos de anticorpos foram consideradas negativas, aquelas com 1 isotipo de anticorpo foram consideradas inconclusivas e as que apresentavam 2 ou mais isotipos de anti-PGL1 foram consideradas positivas.....	62

Tabela 13	- Análise de concordância entre os testes moleculares de <i>Sybr Green</i> e de Taqman® para <i>M. leprae</i> entre 56 casos-índice de hanseníase e 317 contatos.....	63
Tabela 14	- Análise de concordância entre a sorologia e o teste molecular de NATHANS para <i>M. leprae</i> entre 9 casos de hanseníase e 134 contatos. Para efeitos de cálculo do fator kappa, amostras com 0 isotipos de anticorpos foram consideradas negativas, aquelas com 1 isotipo de anticorpo foram consideradas inconclusivas e as que apresentavam 2 ou mais isotipos de anti-PGL1 foram consideradas positivas.....	64
Tabela 15	- Análise de concordância entre os testes moleculares de NATHANS e Taqman® para <i>M. leprae</i> entre 9 casos de hanseníase e 134 contatos.....	64
Tabela 16	- Análise de concordância entre os testes moleculares de NATHANS e Taqman® para <i>M. leprae</i> entre 9 casos de hanseníase e 134 contatos.....	65
Tabela 17	- Parâmetro de especificidade diagnóstica (ED) para os testes moleculares de Taqman®, <i>Sybr Green</i> e NATHANS. Para tanto, foram testadas amostras de contatos de hanseníase sem qualquer alteração clínica (ausência de lesões e ausência de espessamento de nervos) e com ausência de anti-PGL1.....	66
Tabela 18	- Parâmetro de sensibilidade diagnóstica (SD) para os testes moleculares de Taqman®, <i>Sybr Green</i> . Para tanto, foram testadas amostras de casos de hanseníase multibacilar. Estão mostrados os resultados de 9 amostras testadas pelo teste de NATHANS.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%GC	Percentual guanina citosina
AL	Alagoas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APS	Atenção Primária à Saúde
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosina trifosfato
BCG	Bacilo de Calmette & Guérin
BHC	Black Hole Quencher
BLAST®	Basic Local Alignment Search Tool
CE	Ceará
CI	Intervalo de Confiança
COVID-19	Corona Virus Disease - 2019
Cq	Ciclo de quantificação
DATASUS	Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde
DENF-UFC	Departamento de enfermagem – Universidade Federal do Ceará
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico)
DO	Densidade óptica
ED	Especificidade diagnóstica
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid (ácido etilenodiamino tetra-acético)
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (Ensaio Imunoenzimático em Fase Sólida)

FRET	Transferência de Energia de Ressonância Förster
G1I	Grau 1 de Incapacidade
G2I	Grau 2 de Incapacidade
HEMOCE	Hemocentro do Estado do Ceará
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IBMP	Instituto de Biologia Molecular do Paraná
ID	Intradomiciliar
IDT	Integrated DNA Technologies
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
LABIMAN	Laboratório de Bioprospecção de Moléculas Antimicrobianas
LADES	Liga Acadêmica de Doenças Estigmatizantes
MB	Multibacilar
MS	Ministério da Saúde
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OD	Odds Ratio
OMS	Organização Mundial de Saúde
PB	Paucibacilar
PBS-SFB	Tampão Fosfato- Soro Fetal Bovino

PCDT	Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Hanseníase
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PD	Peridomiciliar
PEP	Profilaxia Pós-Exposição
PGL-1	Antígeno Glicolípídeo Fenólico 1
PQT-U	Poliquimioterapia única
qPCR	PCR quantitativo ou em tempo real
RFU	Unidade Relativas de Fluorescência
RLEP	Região específica do elemento repetitivo
RNA	ácido ribonucleico
rRNA	RNA ribossômico
SD	Sensibilidade diagnóstica
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SPSS	Statistical Package for the Social Science
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TMB	Tetrametilbenzidina
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Epidemiologia.....	21
1.2	<i>Mycobacterium leprae</i>.....	23
1.3	Classificação da hanseníase	27
1.4	Diagnóstico clínico.....	28
1.5	Testes sorológicos.....	30
1.6	Testes Moleculares	32
2	OBJETIVO.....	36
2.1	Objetivo geral.....	36
2.2	Objetivo específico.....	36
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
3.1	Aspectos éticos.....	37
3.2	Seleção dos participantes.....	37
3.3	Critério de inclusão.....	38
3.4	Critério de exclusão.....	38
3.5	Avaliação dermatoneurológica.....	38
3.6	Coleta e preparo das amostras.....	38
3.7	Extração de DNA.....	39
3.8	Escolha dos alvos para o qPCR.....	39
3.9	Validação dos testes de qPCR para <i>M. leprae</i>.....	40
3.10	Análise de amostras de casos e contatos por PCR em tempo real....	43
3.11	NATHANS.....	43

3.12	Pesquisa de Anticorpos por ELISA indireto.....	43
3.13	Análise estatística.....	44
4	RESULTADOS.....	46
4.1	<i>Primers</i> e sondas.....	46
4.2	Validação dos testes de qPCR.....	47
4.3	Perfil clínico e demográfico de casos e contatos.....	58
4.4	Sorologia e testes moleculares nos casos de hanseníase e contatos	59
5	DISCUSSÃO.....	68
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	80
7	CONCLUSÕES.....	81
8	REFERÊNCIAS.....	82
	APÊNDICE A - QUESTIONÁRIO DO CONTATO.....	94
	APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO.....	98
	APÊNDICE C - TERMO DE ASSENTIMENTO.....	100
	APÊNDICE D - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA.....	102
	APÊNDICE E - EMENTA DO PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA.....	105
	ANEXO A - OS ISOTIPOS DE ANTICORPOS ANTI-PGL-I PODEM DIFERENCIAR CONTATOS COM HANSENÍASE E PACIENTES COM HANSENÍASE?.....	109

1 INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença infecciosa transmitida pelo *Mycobacterium leprae*, também chamado de Bacilo de Hansen. A doença tem como principal sintoma o aparecimento de manchas na pele, com perda de sensibilidade térmica, dolorosa e/ou tátil (Ceará, 2021). A hanseníase também afeta os nervos periféricos, podendo resultar em deformidades e incapacidades, as quais são características associadas ao estigma que o paciente sofre (OMS, 2017).

A hanseníase apresenta como via de transmissão a inalação de gotículas contendo *M. leprae* a partir da fala, espirros, tosse e durante contato próximo e prolongado com pacientes não tratados (OMS, 2021a). Após a transmissão, não há aparecimento dos primeiros sintomas por duas razões, principalmente: (a) longo período de incubação da doença, que é, em média, de 5 anos, e (b) estado de portador, ou seja, indivíduos que estão próximos ao caso, mas que ainda não desenvolveram a doença (OMS, 2017; Brasil, 2022a).

Durante o diagnóstico da hanseníase, o grau de incapacidade física deve ser avaliado. O grau 1 de incapacidade física (GIF 1) indica que o paciente possui apenas diminuição ou alteração de sensibilidade, força muscular ou lubrificação de pele, enquanto o grau 2 de incapacidade física (GIF 2) indica que o paciente possui lesões mais graves e deformidades irreversíveis, caracterizadas por mãos e pés em garras ou opacidade corneana central (Brasil, 2017). O acometimento de incapacidade física indica diagnóstico tardio e, portanto, é um indicador de grande relevância para a epidemiologia da doença, devendo ser considerado um alerta para estratégias na redução de sua transmissão (Brasil, 2017). O diagnóstico precoce significa que o paciente irá receber tratamento em momento oportuno, com maiores chances de resolatividade e, ao mesmo tempo, reduz os riscos de eventos adversos durante e após o tratamento, que resultariam na piora de qualidade de vida do indivíduo (Brasil, 2008).

Atualmente, o diagnóstico de hanseníase é realizado por meio de avaliação dermatoneurológica, na qual é verificada a presença de manchas suspeitas em toda a extensão da pele do indivíduo e a presença de espessamento dos nervos. Verifica-se que há um aspecto subjetivo que perpassa a avaliação, uma vez que se trata de um método fundamentalmente clínico. Assim sendo, as manchas da hanseníase podem ser confundidas com outras doenças de pele, como a psoríase, sífilis,

leishmaniose, entre outras. Dessa forma, verifica-se com frequência um diagnóstico tardio da doença em decorrência de equívocos dos profissionais de saúde (Brasil, 2022a). Em crianças, soma-se ainda outras questões, como a dificuldade em se concentrar em um exame não lúdico e o desafio de responder de forma objetiva durante o momento da avaliação das manchas de peles, no que diz respeito à verificação da sensibilidade térmica, dolorosa e/ou tátil (Narang; Kumar, 2019). Neste sentido, o presente trabalho visa contribuir com o estabelecimento de métodos moleculares para pesquisa de DNA de *M. leprae* em diferentes tipos de amostras biológicas. Para tanto, foi considerado como público-alvo contatos na faixa etária de 4 a 15 anos de idade e casos-índice tratados ou não tratados

Segundo a Organização Mundial da Saúde (2023), o Brasil é o segundo país com maior número de casos novos de hanseníase por ano. Apenas em 2022, foram notificados 19.635 casos novos da doença, ou seja, um coeficiente de incidência de 16,25 casos por 100 mil habitantes. De acordo com o Sistema de notificação (SINAN), no ano de 2022, o estado do Ceará apresentou 1.142 casos novos, tendo sido a taxa de detecção correspondente a 12,99 casos por 100 mil habitantes, e Alagoas apresentou 278 casos novos, tendo sido a taxa de detecção correspondente a 8,96 casos por 100 mil habitantes. Os municípios cearenses de São Gonçalo do Amarante e Canindé e o município alagoense de Santana do Ipanema apresentaram as seguintes taxas de detecção: 16,66; 20,22; 30,29 por 100 mil habitantes, respectivamente, no ano de 2022. No mesmo ano, a taxa de casos novos entre crianças e jovens até 15 anos foi de 1,68 e 1,66 por 100 mil habitantes nos mesmos municípios, respectivamente (Brasil, 2023). A incidência da doença entre crianças revela transmissão ativa na comunidade e menor tempo de incubação da doença (Salgado *et al.*, 2016).

Em 2016, a OMS apresentou a “Estratégia Global para Hanseníase 2016-2020”, que possuía como metas principais que a taxa de casos recém-detectados com GIF 2 fosse menor que 1 caso por milhão de habitantes e que reduzissem os casos de diagnóstico em crianças (OMS, 2016). Apesar da diminuição de casos da doença, porém, não foi possível alcançar as metas definidas na Estratégia Global de Hanseníase 2016-2020. Em 2021, a OMS redefiniu novas metas com o objetivo de controlar a hanseníase por meio da interrupção da transmissão (OMS, 2021a). A Estratégia Global de Hanseníase 2021–2030 define como objetivos que ao menos 120 países não tenham mais novos casos autóctones, redução do número anual de novos

casos detectados em 70%, redução da taxa por milhão de habitantes de novos casos com GIF 2 em 90% e a redução da taxa por milhão de casos novos de hanseníase em crianças também em 90% (OMS, 2021a).

O atual objetivo possui diversos entraves para seu alcance. Um dos mais relevantes é a falta de estratégias nacionais e locais para a implementação de busca ativa da doença de forma continuada. Estudos têm mostrado que o *M. leprae* está presente na mucosa nasal de 5% a 8% dos contatos intradomiciliares (Job; Jayakumar; Kearney, 2008) e que os pacientes multibacilares não tratados são uma importante fonte de transmissão durante a infecção subclínica (Rodrigues; Lockwood, 2011). A magnitude do risco individual para o desenvolvimento da doença depende da frequência de contato, da proximidade do domicílio do paciente e da carga bacteriana (Rodrigues; Lockwood, 2011).

A vacinação de contatos de pacientes com hanseníase com o Bacillus Calmette-Guerin (BCG) é recomendado quando aqueles são maiores de um ano e receberam uma ou nenhuma dose da vacina (Brasil, 2022a). A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda o uso de uma dose única de rifampicina como Profilaxia Pós-Exposição ou, em inglês, Post-Exposure Prophylaxis (PEP). A profilaxia só pode ser usada em contatos maiores de dois anos de idade com dose variando de 10mg a 600mg, a depender da idade do contato (OMS, 2020). A OMS também recomenda avaliação clínica de contatos intradomiciliares de hanseníase e educação em saúde como parte da estratégia de controle da doença (Rodrigues; Lockwood, 2011). Entretanto, o exame físico não identifica os estágios iniciais da doença, quando as manifestações clínicas raramente estão presentes (Cardona-Castro; Beltrán-Alzate; Romero-Montoya, 2009; Banerjee *et al.*, 2010).

1.1 Epidemiologia

Um indicador importante para a verificação da tendência evolutiva de uma doença em um determinado local é o coeficiente de detecção. Este índice é calculado dividindo-se o número de casos novos na população residente em um determinado local pelo número total de habitantes naquele local. A seguir, multiplica-se o resultado por 100 mil. Um coeficiente de detecção menor que 2,0 é considerado baixo, taxa entre 2,0 e 9,99 é média, entre 10,0 e 19,99 é considerada alta, entre 20,0 e 39,99 é

considerada muito alta e acima de 40,0 por cem mil habitantes é considerada uma taxa hiperendêmica (Brasil, 2021).

Segundo a OMS, durante 2022, 174.087 novos casos foram identificados no mundo (OMS, 2023). O Brasil, no mesmo ano, detectou 19.635 casos novos, tendo o Nordeste registrado o maior número de casos, ou seja, 8.879 notificações. Desses novos casos, 1142 foram notificados no Ceará (12,86 % dos casos do Nordeste) e 278 em Alagoas (3,13 % dos casos do Nordeste) (Brasil, 2023).

Outro indicador importante é o número de casos diagnosticados entre crianças e jovens abaixo de 15 anos de idade. Como já mencionado anteriormente, o aparecimento de manifestações clínicas em crianças indica uma alta carga bacilar no ambiente e menor período de incubação da doença (Brasil, 2022; Salgado *et al.*, 2016). Em 2022, o Brasil diagnosticou 836 novos casos em menores de 15 anos de idade, totalizando 4,9% do total de novos casos. Destes, 432 (51,67% dos casos em menores de 15 anos de idade) foram notificados no Nordeste, sendo 33 proveniente do Ceará e 13 de Alagoas (Brasil, 2023). De 2009 a 2022, a taxa de detecção de casos novos em menores de 15 anos de idade por 100.000 habitantes do Nordeste reduziu de 8,25 para 3,42 e, apesar da diminuição, a taxa continuava classificada como alta, pois valores entre 2,50 e 4,99 casos por 100.000 habitantes são considerados altos. Essa alta taxa de casos novos em menores de 15 anos no Nordeste indica que a transmissão ainda permanece ativa (Brasil, 2022b, 2023).

No Brasil, dentre os 19.635 casos novos de 2022, 85,1% foram avaliados quanto à incapacidade física no momento do diagnóstico. Um total de 5654 casos (28,8%) e de 1917 (11,5%) foram diagnosticados com GIF 1 e GIF 2, respectivamente (Brasil, 2023).

O Nordeste possui a menor taxa de avaliação de incapacidades do Brasil, com 81,7% de casos avaliados, sendo que 9,6% dos avaliados foram diagnosticados já com GIF 2 em 2022. Ceará e Alagoas realizaram avaliação de 72,4% e de 83,9% e tiveram 12,1% e 15,0% dos avaliados diagnosticados com GIF 2, respectivamente (Brasil, 2023).

Segundo a OMS, o Brasil notificou 334 novos casos em menores de 15 anos de idade que foram diagnosticados com GIF 2 no período de 2015 a 2022 (Brasil, 2023). Esse indicador revela um diagnóstico tardio mesmo em regiões com alta carga bacilar.

O Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Hanseníase (PCDT) é um importante documento que tem como objetivo normatizar uma diretriz baseada em evidências no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS). O PCDT estabelece os critérios para diagnóstico e tratamento de indivíduos acometidos pela hanseníase e promove uma efetiva descentralização do cuidado em hanseníase para a Atenção Primária à Saúde (APS). O PCDT define como contato “toda e qualquer pessoa que resida ou tenha residido, conviva ou tenha convivido com o doente de hanseníase, no âmbito domiciliar, nos últimos cinco anos anteriores ao diagnóstico da doença, podendo ser familiar ou não” (Brasil, 2022a).

A avaliação dos contatos é um método para realizar um diagnóstico precoce, uma vez que são um grupo de maior risco para o desenvolvimento da hanseníase. No Brasil, o modo de detecção é um fato preocupante, pois no ano de 2022, 46,1% foram diagnosticados por encaminhamento, 37,5% por demanda espontânea e apenas 9,6% dos novos casos foram diagnosticados pelo exame de contatos. É possível observar que o número de casos novos detectados por exame de contato está abaixo do esperado, pois apenas 76,9% dos contatos foram avaliados (Brasil, 2022b).

Por definição, o diagnóstico por encaminhamento ocorre quando outras unidades de saúde encaminham um indivíduo com suspeita. A demanda espontânea ocorre quando o próprio indivíduo se dirige ao serviço de saúde devido a manifestações clínicas dermatológicas e/ou neurológicas. Tais situações são consideradas busca passiva (Brasil, 2002). As chances de se encontrar lesões mais discretas e assintomáticas geralmente ocorrem na busca ativa. Raramente tais situações ocorrem na busca passiva. A única estratégia de busca ativa se dá através de campanhas de diagnóstico e de exame de contatos (Brasil, 2022a).

1.2 *Mycobacterium leprae*

Mycobacterium leprae é um bacilo intracelular obrigatório, imóvel, não esporulado, com tamanho médio de $0.3\text{--}0.4 \times 4.0\text{--}7.0 \mu\text{m}$ (Britton; Lockwood, 2004). Reproduz-se por divisão binária de forma lenta, entre 12 e 14 dias (Chavarro-Portillo; Soto; Guerrero, 2019). A temperatura de crescimento ideal para o *M. leprae* é de 30°C , de forma que o bacilo possui tropismo por regiões mais frias do corpo, como a pele (Jin; Ahn; An, 2018).

Os antígenos das micobactérias podem ser agrupados em polipeptídeos, lipossacarídeos, glicolipopeptídeos e glicolipídios fenólicos 1, 2 e 3. Eles conferem especificidade às micobactérias, sendo que os glicolipídios fenólicos são os antígenos mais específicos de *M. leprae* (Lyon; Grossi, 2013).

Em 1981, foi descrita a estrutura química do glicolipídeo fenólico 1 (PGL-1), antígeno da parede de *M. leprae* (Lyon; Grossi, 2013; Moura *et al.*, 2008). O PGL-1 é composto por um esqueleto de fitiocerol com duas cadeias laterais de ácido micoceroídico ligados por meio de um radical fenólico a uma estrutura trissacarídeo, o 3,6-di-O-metila- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3-di-O-metila- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-3-O-metila- α -L-ramnopiranosose (Lyon; Grossi, 2013; Bühner-Sékula, 2008). A grande capacidade antigênica do PGL-1 só foi descoberta no ano seguinte (Lyon; Grossi, 2013; Moura *et al.*, 2008).

O PGL-1 está presente na parede celular do bacilo e corresponde a 2% da massa total do bacilo. Possui grande importância para o hospedeiro, pois pode induzir produção de anticorpos, interfere na função macrófaga e, portanto, atua provocando alterações na qualidade da resposta imunológica do indivíduo (Lyon; Grossi, 2013).

A capacidade antigênica do PGL1 se deve às regiões de di- e trissacarídeo da molécula (Spencer; Brennan, 2011) e à porção terminal 3,6 – di-O-metil-glucose (Macieira, 2000). Os polissacarídeos e lipídios são os responsáveis pela ativação de linfócitos via T-independente. Nesse tipo de ativação, o macrófago apresenta o antígeno diretamente para a célula B da zona marginal do baço, induzindo a produção majoritariamente do isotipo IgM (Mesquita Júnior *et al.*, 2010).

Quando o *M. leprae* se encontra em um ambiente favorável, como o macrófago ativado via alternativa, pode haver produção de grande quantidade de PGL-1 (Singh; Bishai, 2017). Este pode persistir no fagolisossoma, levando o macrófago a permanecer em estado alternativamente ativado. Pode também ser liberado na corrente sanguínea, onde pode persistir. Como é uma molécula altamente insolúvel em água, o organismo possui dificuldade em excretá-la (Miller; Gorder; Harnisch, 1987). Como mencionado anteriormente, persistência do PGL-1 no sangue pode induzir a produção de uma quantidade elevada de IgM anti-PGL-1. Embora tais títulos estejam particularmente elevados em indivíduos com alta carga bacilar, sua pesquisa não tem sido realizada para o diagnóstico da doença, uma vez que pessoas que ainda não apresentaram a doença, ou seja, os contatos, podem também, eventualmente, apresentar níveis elevados de IgM anti-PGL-1 (Froes Júnior; Trindade;

Sotto, 2022).

O PGL-1 pode reagir com compostos de radicais livres de forma a proteger o bacilo dos efeitos tóxicos de enzimas lisossomais e metabólitos oxidativos produzidos pelos macrófagos durante a resposta imunológica (Macieira, 2000). Além disso, é uma molécula responsável pela ligação do bacilo com as células de Schwann, responsáveis pela formação da bainha de mielina no sistema nervoso periférico (Girardi *et al.*, 2022). O acometimento dos nervos periféricos é resultante de tal interação (Vincent *et al.*, 2000). Ocorrem dois fenômenos aparentemente paradoxais: por um lado, as células de Schwann são desprovidas de componentes que possam eliminar os microrganismos, como ocorrem nos fagócitos, o que favorece a multiplicação bacteriana no seu interior (Spierings *et al.*, 2001); por outro lado, a presença de micobactérias e de seus componentes no interior das células pode provocar a indução da expressão de moléculas co-estimulatórias na superfície das células produtoras de bainha de mielina. Assim sendo, as células de Schwann podem se tornar elas mesmas, células apresentadoras de antígeno não profissionais, cuja função seria de apresentação de antígenos micobacterianos aos linfócitos T, o que resultará em sua destruição (Spierings *et al.*, 2001).

É possível extrair o PGL-1 nativo com clorofórmio e metanol, entretanto, como a sua obtenção em grandes quantidades é um processo dificultoso, os antígenos sintéticos começaram a ser preparados (Lyon; Grossi, 2013; Brett *et al.*, 1986). As moléculas sintéticas são obtidas a partir de açúcares produzidos de forma sintética, ligando-os à albumina sérica bovina (BSA), seja de forma direta, seja através de uma ligação octil (O), ou fenil (P). Tais antígenos sintéticos são o monossacarídeo-octil-BSA (M-O-BSA), o dissacarídeo-BSA (D-BSA), o dissacarídeo-octil-BSA natural (ND-O-BSA) e o trissacarídeo-fenil-BSA (NT-P-BSA) (Silva *et al.*, 2013). As duas principais vantagens dos antígenos sintéticos são a sua solubilidade em água e a capacidade de produção dessas moléculas em grandes quantidades (Lyon; Grossi, 2013; Silva, 2013).

O genoma completo do *M. leprae* foi sequenciado e descrito pela primeira vez em 2001. Ele contém 3.268.203 pares de bases com percentual de G+C de 57,8% e um peso de 10fg para 3 bacilos, ou seja, aproximadamente 3,3fg para o genoma de 1 bacilo (Cole *et al.*, 2001; Truman *et al.*, 2008). Com o sequenciamento de genomas completos em vigor, 4 genótipos e 16 subtipos do *M leprae* foram identificados (Tió-Coma *et al.*, 2020).

Quando o genoma da *M. leprae* é comparado ao de outras micobactérias homólogas de outros ancestrais, como a *Mycobacterium tuberculosis* (4,411,532 pares de bases), são observados um tamanho menor e uma quantidade mais reduzida de proteínas codificantes (Cole *et al.*, 2001; Tió-Coma *et al.*, 2020). A partir de análises de bioinformática, verificou-se que 1614 genes são codificantes para proteínas e mais de 50 genes codificam RNAs estáveis. Isso compõe apenas 49,5% do genoma de *M. leprae*, enquanto o restante é formado por pseudogenes e genes não codificantes, que podem ser sequências regulatórias ou que apresentam muitas mutações (Singh; Cole, 2011). O acúmulo de 1116 pseudogenes, com consequente perda de função desses genes, pode ser responsável pela taxa de crescimento excepcionalmente lenta do bacilo e pela incapacidade de replicação dessas bactérias *in vitro* (Monot *et al.*, 2009; Borah *et al.*, 2020).

A perda de muitos genes levanta a possibilidade que a inabilidade de *M. leprae* de crescer em culturas axênicas é decorrente da perda mutacional de vias biossintéticas importantes com consequente dependência externa de nutrientes complexos provenientes do hospedeiro, que não estariam disponíveis em meios de cultura sintéticos (Borah *et al.*, 2020). No entanto, análises das sequências do genoma demonstraram que a capacidade anabólica do patógeno, quando comparada ao de *M. tuberculosis*, parece intacta, mantendo sistemas enzimáticos completos para a síntese dos aminoácidos, com exceção da metionina e da lisina (Cole *et al.*, 2001). O mesmo ocorre para as vias biossintéticas de purinas, pirimidinas, nucleosídeos, nucleotídeos, vitaminas e cofatores. Assim, as deleções parecem ter afetado principalmente diversos sistemas catabólicos e respiratórios (Cole *et al.*, 2001). Um exemplo é a cadeia respiratória aeróbica ser truncada devido à perda de diversos genes na operon oxidase NADH, eliminando potencialmente a capacidade do patógeno de produzir ATP a partir da oxidação de NADH. Essa redução evolutiva gênica, associada à perda de função em sistemas importantes, torna possível a compreensão de que a *M. leprae* seja considerada uma bactéria intracelular obrigatória, ou seja, completamente dependentes de um hospedeiro para o seu crescimento, o que também justifica o fato de não ser um bacilo cultivável (Scollard *et al.*, 2006; Borah *et al.*, 2020). Os principais hospedeiros naturais encontrados na atualidade são o tatu e o ser humano (Mi; Liu; Zhang, 2023).

1.3 Classificação da hanseníase

A hanseníase é uma doença que se apresenta com amplos espectros clínicos, podendo as lesões serem hipocrômicas e bem delimitadas, mas também podem se apresentar em forma de pápulas e nódulos. Com o intuito de facilitar o diagnóstico e o tratamento, foram propostas algumas classificações, tanto em relação à sua forma clínica quanto aos fins terapêuticos. Podemos citar a Classificação de Madri (1953), a classificação de Ridley e Jopling (1966) e a classificação da OMS (Lastória; Abreu, 2012).

Segundo a classificação de Madri, as formas de manifestação clínica da hanseníase são: indeterminada, tuberculóide, virchowiana e dimorfa. A forma indeterminada é a forma inicial da doença, na qual há a presença de uma única mancha de pele, portanto há uma dificuldade no diagnóstico por meio da avaliação dermatoneurológica (Brasil, 2017).

A partir da forma indeterminada, o paciente pode vir a evoluir para uma das outras três formas. A forma tuberculóide caracteriza-se clinicamente por lesões em placa na pele, com bordas bem delimitadas, eritematosas, ou por manchas hipocrômicas nítidas e bem definidas, enquanto a forma virchowiana caracteriza-se clinicamente pela disseminação de lesões de pele que podem ser eritematosas, infiltrativas, de limites imprecisos, brilhantes e de distribuição simétrica. A forma dimorfa oscila entre a tuberculóide e a virchowiana (Brasil, 2017).

A classificação de Ridley e Jopling foi criada principalmente com finalidade de pesquisa científica e para suprir uma deficiência que a classificação de Madri possui, que era o fato de os critérios serem puramente baseados na clínica do paciente. Portanto, essa classificação considera, além da clínica do paciente, a imunidade celular do paciente em relação à doença, baseando-se no teste de Mitsuda (avalia a resposta imune celular ao bacilo, de forma similar ao teste de Mantoux, utilizado na tuberculose). A classificação de Ridley e Jopling subdivide a hanseníase em cinco formas diferentes: tuberculóide, dimorfa tuberculóide, dimorfa dimorfa, dimorfa virchowiana e virchowiana. A forma tuberculóide e virchowiana seriam representadas por uma presença total ou ausência de imunidade celular, respectivamente, e as outras 3 formas oscilariam entre esses dois polos (Ridley; Jopling, 1966).

Por fim, para fins de tratamento, tem sido adotada a classificação da OMS, que divide os pacientes em dois grupos, sendo eles forma paucibacilar e forma multibacilar (Brasil, 2017). A forma paucibacilar é definida como a presença de 1 a 5 lesões cutâneas e ausência de bacilos no raspado intradérmico. A forma multibacilar é definida como a presença de mais de 5 lesões cutâneas, baciloscopia de raspado intradérmico positiva e envolvimento dos nervos (Brasil, 2022a).

O tratamento da hanseníase é chamado de poliquimioterapia única (PQT-U). O tratamento de primeira linha inclui a rifampicina, clofazimina e dapsona, sendo a rifampicina apenas uma dose mensal supervisionada e a clofazimina e dapsona uma dose mensal supervisionada e doses diárias autoadministradas. A dose é definida a partir da idade e peso do paciente, enquanto a duração do tratamento é definida a partir da forma clínica, sendo os pacientes com a forma multibacilar da doença tratados por 12 meses e os pacientes com a forma paucibacilar são tratados por 6 meses. O tratamento de primeira linha não é indicado para mais de 12 meses de uso, de forma que é necessário uso dos medicamentos do tratamento de segunda linha para casos de suspeita de resistência do *M. leprae* a antimicrobianos (Brasil, 2022a).

1.4 Diagnóstico clínico

O diagnóstico clínico da hanseníase é baseado, essencialmente, no quadro clínico. O primeiro passo do diagnóstico é a anamnese, sendo importante observar tanto o histórico clínico do indivíduo como o histórico epidemiológico. A segunda etapa é realizar a avaliação dermatoneurológica, considerada exame padrão ouro para diagnosticar um caso de hanseníase (Brasil, 2002; Brasil, 2017).

A avaliação dermatoneurológica procura a presença de lesões suspeitas de hanseníase em toda a extensão da pele do indivíduo e/ou nervos acometidos. Há locais onde as lesões são mais frequentes, como face, orelhas, nádegas, braços, pernas e costas, mas elas podem ocorrer, também, na mucosa nasal. Caso seja encontrada alguma lesão, os testes de sensibilidade térmica, dolorosa e tátil devem ser realizados. Além disso, realiza-se a apalpação de alguns nervos para verificação de possível espessamento. Estes nervos estão localizados na face (nervo trigêmeo e facial), nos membros superiores (radial, ulnar e mediano) e membros inferiores (fibular comum e tibular posterior). Observa-se ainda se o indivíduo apresenta alguma queixa

de dor e/ou formigamento, ressecamento da pele ou perda da sudorese no local suspeito (Lehman *et al.*, 1997; Brasil, 2002).

Quanto a alterações de sensibilidade na lesão, a primeira sensação a ser alterada costuma ser a térmica, seguida da dolorosa e da tátil, porém nem sempre há a perda da sensibilidade tátil. Para a avaliação da sensibilidade térmica nas lesões, podem ser usados dois tubos de vidro, um contendo água fria e o outro contendo água aquecida a 45°C. A avaliação da sensibilidade dolorosa é realizada encostando a ponta de uma agulha na pele do paciente, sem que haja sangramento, e alternando a ponta e o cabo da agulha (Brasil, 2017). Para a avaliação da sensibilidade tátil, utiliza-se o estesiômetro.

O estesiômetro é um conjunto de 6 microfilamentos de diferentes forças de flexão empregado para avaliação de sensibilidade tátil. Em geral, como parâmetro de avaliação, se o indivíduo não sentir o monofilamento violeta, cuja força é de 2,0 gramas, significa que sua sensibilidade tátil está comprometida. Em seguida, é realizado o teste de força muscular, no qual é solicitado ao indivíduo que realize uma série de movimentos. Caso ele seja capaz de realizar os movimentos, é pedido para repetir movimentos frente à resistência aplicada pelo avaliador (OMS, 2020a; Brasil, 2022a).

Durante a avaliação da pele, também é possível realizar o teste da pilocarpina e teste da histamina. No teste da pilocarpina, avalia-se a capacidade de produção de suor no local da lesão. Pincela-se uma tintura de iodo na lesão suspeita, a seguir injeta-se 0,1 a 0,2mL de solução de pilocarpina de 0,5% a 1% e, em seguida, é polvilhado amido. Se a lesão tiver integridade das terminações nervosas autônomas, a pilocarpina irá ativar as glândulas sudoríparas e o suor produzido irá misturar o iodo e o amido, resultando em uma solução de iodeto de amido de coloração azulada, o que não ocorrerá em caso de hanseníase devido à ausência de sudorese nas lesões de hanseníase (Lyon; Grossi, 2013; Brasil, 2017).

O teste da histamina avalia se o organismo possui capacidade de resposta ao estímulo de liberação de histamina endógena no local da lesão. Inicialmente, realiza-se uma pressão através da utilização de uma tampa de caneta sobre o local da lesão e observa-se a formação do eritema. Na pele normal, espera-se o aparecimento da tripla reação completa de Lewis, a qual é caracterizada por eritema primário, eritema reflexo (halo eritematoso) e pápula. Caso haja ausência do halo

eritematoso, denomina-se reação incompleta de Lewis, o que indica que o eritema reflexo decorrente do estímulo de nervos locais não está ocorrendo (Brasil, 2022a).

Outros exames subsidiários podem ser realizados, como biópsia de pele e baciloscopia de raspado intradérmico (Brasil, 2017). A baciloscopia de raspado intradérmico utiliza 5 amostras, sendo 2 dos lóbulos da orelha direita e esquerda, 2 dos cotovelos direito e esquerdo e 1 da lesão. A técnica de coloração utilizada tem sido a de Ziehl-Neelsen. O resultado é fornecido em termos de índices que variam de 0 a 6. Positividade indica hanseníase multibacilar, no entanto, negatividade não exclui a doença (Lastória; Abreu, 2012; Pimentel *et al.*, 2018).

A biópsia de pele auxilia na classificação da hanseníase. A técnica de coloração proposta é a de Faraco-Fite. Um resultado positivo indica hanseníase multibacilar, entretanto, resultado negativo não exclui o diagnóstico da doença (Brasil, 2017).

1.5 Testes sorológicos

Estudos mostram que a imunidade na hanseníase é controlada por determinação genética de suscetibilidade e resistência ao *M. leprae*, de forma que os indivíduos podem apresentar diferentes padrões de resposta imune quando em contato com o microrganismo (Scollard *et al.*, 2006).

A partir da obtenção de antígenos nativos e sintéticos de PGL-1, foram desenvolvidos ao longo dos anos testes imunoenzimáticos em fase sólida (ELISA), bem como testes de imunocromatografia para detecção de anticorpos, utilizando-se soro (Bührer-Sékula, 2008; Silva *et al.*, 2010; Montanha *et al.*, 2023) ou saliva (Cabral *et al.*, 2013; Macedo *et al.*, 2017; Mayangsari *et al.*, 2020).

Entre as vantagens do uso do teste sorológico em fase sólida, estão a obtenção de resultados semiquantitativos ou quantitativos, bem como a discriminação dos isotipos envolvidos na reação (Cunha, 2012; Macedo *et al.*, 2018). Entretanto, é importante observar que necessitam de uma infraestrutura laboratorial apropriada e profissionais aptos para realizar essa técnica.

A presença de IgM anti-PGL-1 na circulação sistêmica indica risco aumentado em pelo menos três vezes de desenvolvimento da hanseníase (Penna *et al.*, 2016). Entretanto, existem indivíduos que desenvolvem a doença, mas que não apresentam positividade de anticorpos (Sinha *et al.*, 2004; Penna *et al.*, 2016), o que

indica um fator limitante dos marcadores.

O anti-PGL-1 da classe IgM é o isotipo mais estudado em pacientes e contatos, pois o antígeno PGL-1 é um antígeno T independente. Entretanto, já foi demonstrada a presença de outros isotipos específicos, como IgG e IgA anti-PGL1. O isotipo IgA apresentou boa correlação com IgM (Macedo *et al.*, 2017), enquanto a presença do isotipo IgG em contatos de 4 a 15 anos demonstrou um risco relativo para o desenvolvimento da doença (Nagao-Dias *et al.*, 2019). Dessa forma, é importante a avaliação dos três isotipos em conjunto para o monitoramento dos contatos (Nagao-Dias *et al.*, 2019).

Anticorpos salivares do isotipo IgA podem indicar contato antigo ou recente. Quando são do isotipo IgM, indicam contato recente. Em nenhum dos casos, porém, indica doença (Macedo *et al.*, 2018; Cabral *et al.*, 2013; Nahas *et al.*, 2018).

A pesquisa de anticorpos anti-PGL-1, associada com avaliação dermatoneurológica, tem sido considerada útil para o rastreo da hanseníase entre contatos, sendo que seu monitoramento periódico pode auxiliar no diagnóstico precoce de contatos de pacientes com hanseníase (Macedo *et al.*, 2018; Albuquerque *et al.*, 2022; Sagica *et al.*, 2020).

Em dezembro de 2021, por meio da Portaria SCTIE/MS nº 84, o Ministério da Saúde incorporou o teste rápido imunocromatográfico para hanseníase no SUS com o objetivo de avaliar contatos intradomiciliares ou peridomiciliares que conviveram com o doente de hanseníase nos últimos cinco anos anteriores ao diagnóstico da doença (Brasil, 2022a).

O teste rápido se trata de um teste qualitativo que avalia a presença ou ausência de anticorpos anti-PGL-1 da classe IgM. Esse exame tem como vantagens o fato de o resultado sair em apenas 20 minutos e não precisar de nenhuma estrutura laboratorial aprimorada. Além disso, o teste pode ser realizado com soro, plasma ou sangue total, portanto, foi preconizado o uso de sangue total coletado por meio de punção digital a fim de facilitar a realização do teste. Quando comparado com o teste de ELISA, o teste rápido apresentou 99,1% de concordância e possui sensibilidade diagnóstica e especificidade diagnóstica de 90,8% e 98,0%, respectivamente (Quibasa, 2022).

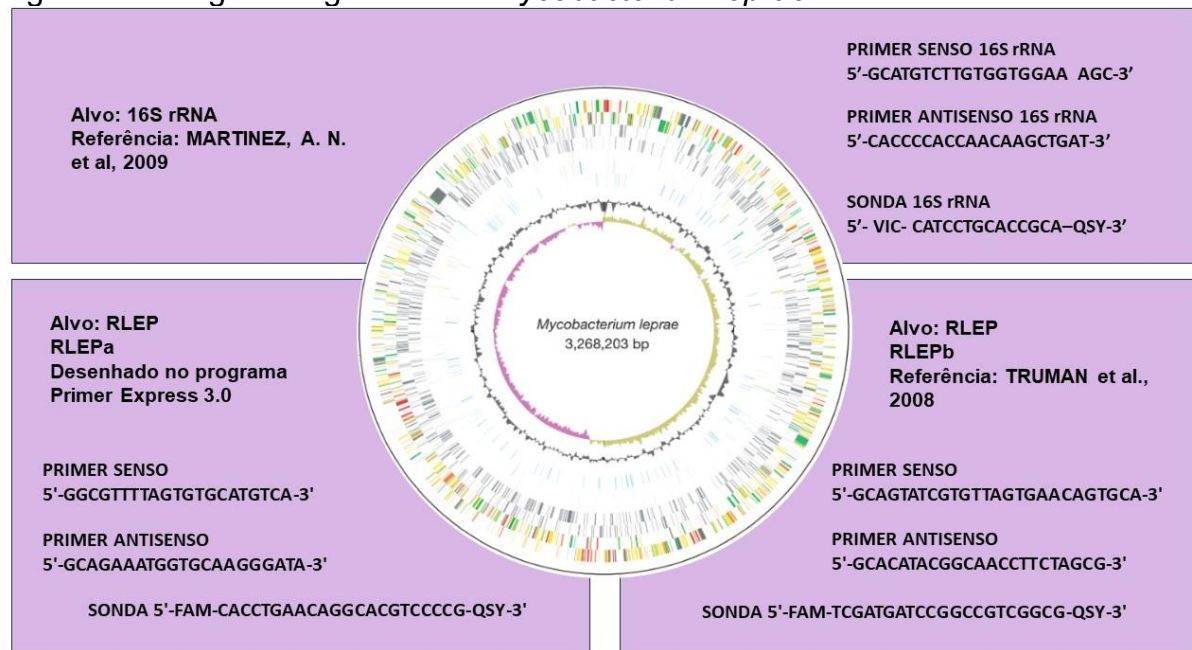
A detecção isolada de anticorpos não pode ser utilizada para diagnosticar um indivíduo. Deve-se analisar o resultado do teste rápido associando-o com a clínica e a avaliação dermatoneurológica do indivíduo e, a partir de todos esses resultados,

o contato poderá ser encaminhado para a realização de outros exames ou apenas ser acompanhado por meio do posto de saúde ou do autoexame (Brasil, 2022a).

1.6 Testes Moleculares

A partir do sequenciamento do genoma de *M. leprae*, foi possível o desenvolvimento de testes moleculares, tais como a reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de DNA de bacilos em amostras clínicas com maior sensibilidade e especificidade analíticas (Turankar *et al.*, 2015). Foram testados diversos tipos de matrizes biológicas, como sangue, e realizada biópsia de pele e de nervo, *swab* nasal e orofaríngeo, além de diversas regiões genômicas terem sido alvos de estudo. Dentre as regiões estudadas, as que apresentaram um maior potencial para padrão ouro para a hanseníase foram RLEP3, 85-B e 16S rRNA (Goulart; Goulart, 2008).

Figura 1 - Imagem do genoma do *Mycobacterium leprae*.



Fonte: Imagem adaptada de Cole *et al.* (2001).

O RLEP é uma sequência de repetição no genoma do *M. leprae*. Apresenta um total de 37 cópias, ocorrendo predominantemente nas extremidades 3' dos genes e, em vários casos, até dentro dos pseudogenes (Cole; Supply; Honoré, 2001). Testes para RLEP conseguem detectar o equivalente a 10 fg de DNA bacteriano (Truman *et al.*, 2008; Turankar *et al.*, 2015).

Quanto ao 16S rRNA, ele corresponde a um gene conservado nas bactérias, responsável por codificar o RNA ribossomal da porção de 16S rRNA do ribossomo. Testes de PCR em tempo real (RT PCR), usando alvos de 16S rRNA, têm sido úteis para a identificação dos bacilos viáveis em amostras biológicas, no entanto não é específico para *M. leprae* (Turankar *et al.*, 2015). De todo modo, Martinez *et al.* (2009) relataram que testes de RT PCR para detecção associada de RLEP e 16S rRNA apresentam melhores resultados, visto que RLEP corresponde a um alvo específico de *M. leprae* e 16S rRNA à viabilidade bacteriana. Segundo achados dos estudos de Beissner *et al.* (2019), a testagem molecular por RT-PCR com alvos combinados de RLEP e 16S rRNA funciona como uma ferramenta específica e sensível para determinar a carga bacteriana e a viabilidade de *M. leprae* em amostras de *swabs* nasais, sugerindo sua possível aplicação para o diagnóstico precoce, monitoramento da resposta ao tratamento e investigação da transmissão comunitária (Beissner *et al.*, 2019).

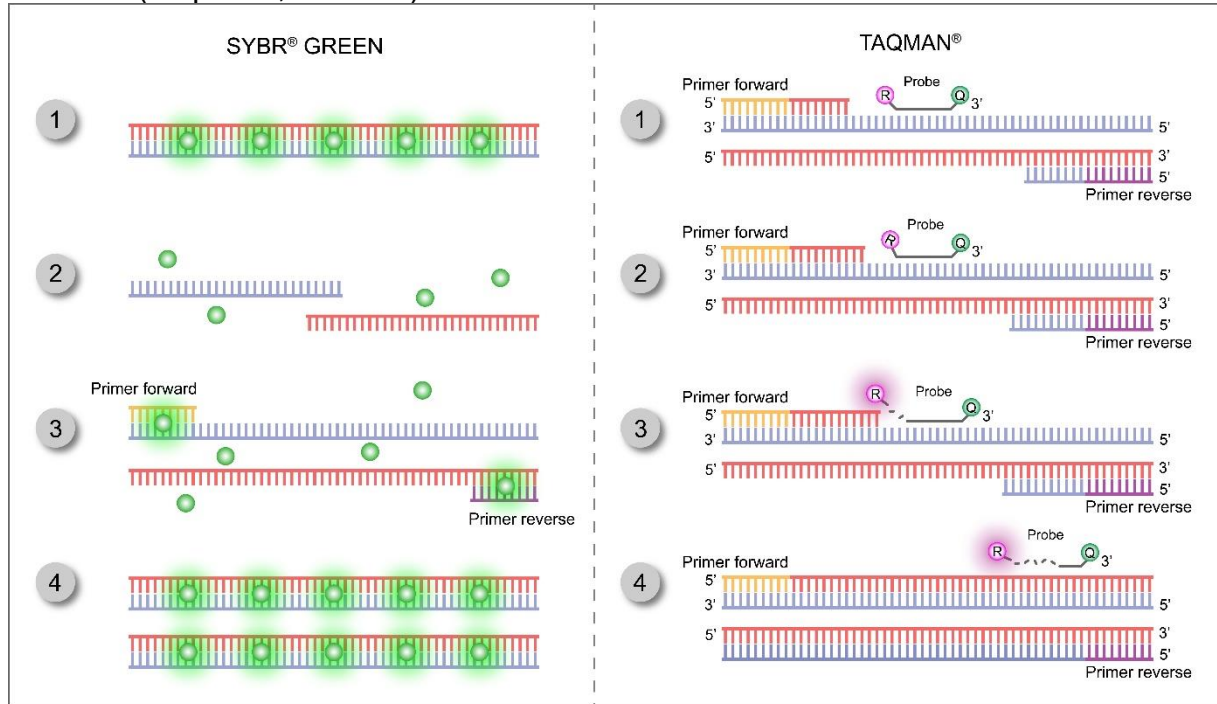
Desenvolvida em 1985 por Randall Saiki e aperfeiçoada por Kary Mullis em 1986, a reação em cadeia da polimerase (PCR) é capaz de amplificar uma única sequência de DNA, gerando cópias em quantidades exponenciais (Vieira, 2002; Arya *et al.*, 2005) a partir do uso de uma enzima DNA polimerase, geralmente Taq polimerase, nucleotídeos, iniciadores senso e anti-senso, DNA alvo, magnésio, cálcio e um termociclador (Tamay de Dios; Ibarra; Velasquillo, 2013; Alberts, 2017). No final dos ciclos de amplificação, os produtos de PCR ou amplicons são analisados por eletroforese em gel de agarose ou acrilamida. Este tipo de técnica é denominado de PCR convencional e foi utilizado até há alguns anos por alguns pesquisadores para a detecção de DNA de *M. leprae*, principalmente em amostras de *swab* nasal (Pathak *et al.*, 2019; Adriaty *et al.*, 2020).

Na atualidade, tal tipo de técnica tem sido suplantado pelo PCR em tempo real, também denominado qPCR ou PCR quantitativo. A técnica possui várias vantagens frente ao seu predecessor, tais como sensibilidade e especificidade analíticas e possibilidade de testagem de várias amostras ao mesmo tempo.

A qPCR apresenta o mesmo princípio da PCR convencional, sendo sua fundamental diferença residindo na visualização da amplificação, que pode ser acompanhada de forma gráfica em tempo real devido à presença de fluoróforos. Existem dois métodos de visualização com fluoróforos, sendo eles através do uso de fluoróforos intercalantes (ex: *Sybr Green*) de DNA e de sonda de hidrólise (ex:

Taqman®) (Novais; Pires-Alves, 2004; Arya et al., 2005).

Figura 2 - Métodos de visualização de fitas de nucleotídeo com fluoróforos: através do uso de fluoróforos intercalantes de DNA (*Sybr Green*, à esquerda) e de sonda de hidrólise (Taqman®, à direita).



Fonte: Elaborada pela autora (2024).

O corante *Sybr Green* é um fluoróforo que se intercala apenas em fitas duplas. Desta forma, a cada duplicação de DNA, o corante se intercala, liberando fótons que são identificados pelo detector de fluorescência do aparelho (Figura 2). Apesar de ter menor custo, o *Sybr Green* tem a grande desvantagem de ser um fluoróforo inespecífico por se ligar em qualquer fita dupla (Arya et al., 2005).

Apesar de ser mais caro quando comparado ao *Sybr Green*, o método Taqman® é mais específico. A sonda de hidrólise é uma sequência de DNA assim como os iniciadores, entretanto existe um fluoróforo, ou *fluorescent repórter*, na extremidade 5', sendo representado pela letra R na figura 2, e um silenciador, ou *quencher*, na extremidade 3', o qual é representado pela letra Q na figura 2. O fluoróforo pode ser o FAM, VIC, Cy5, entre outros, e possui a função de emitir fluorescência para visualização da amplificação do DNA ao ser fisicamente separado do *quencher*, conforme ilustrado na figura 2. O *quencher*, como o Black Hole Quencher (BHQ), funciona por proximidade, baseado no princípio de Transferência de Energia de Ressonância Förster (FRET). Ele absorve a energia emitida pelo fluoróforo e a

perde por diferentes vias (Arya *et al.*, 2005).

Martinez *et al.* (2011) aplicaram qPCR utilizando vários alvos, dentre eles o RLEP e 16S rRNA. Foi utilizada biópsia de pele de lesões de pacientes com variadas formas clínicas da doença e de indivíduos saudáveis. Foi observada uma maior sensibilidade em RLEP quando comparada ao alvo 16S rRNA, entretanto, o alvo 16S rRNA apresentou uma especificidade de 100% (Martinez *et al.*, 2011).

Como a nasofaringe é a principal porta de entrada para o bacilo (Lavanaia *et al.*, 2013; Silva, 2013), o uso de *swab* nasal foi sempre considerado relevante em estudos de investigação científica em hanseníase (OMS, 2021a). Beissner *et al.* (2019) validaram um método de PCR em tempo real utilizando *swab* nasal de pacientes recém diagnosticados com a forma multibacilar da doença. As regiões analisadas foram RLEP e 16S rRNA, tendo sido observado 100% de especificidade e 75% de sensibilidade diagnósticas.

Em 2021, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprovou o primeiro kit de biologia molecular de uso comercial para o diagnóstico da hanseníase, o Kit NATHANS. Esse teste é realizado utilizando biópsia de lesões ou nervos, com o intuito de auxiliar no diagnóstico e na vigilância epidemiológica da doença (Conitec, 2021). Como o foco desse kit é em indivíduos com lesão ou alteração no nervo, ainda há a necessidade de buscar métodos capazes de realizar um diagnóstico precoce.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estabelecer um método de detecção de *M. leprae* por biologia molecular para identificação de grupos de risco para o desenvolvimento de hanseníase em contato menores de 15 anos de pacientes com hanseníase em municípios endêmicos e hiperendêmicos.

2.2 Objetivos específicos

- a) Estabelecer métodos de qPCR para *Mycobacterium leprae*;
- b) Analisar a presença de material genético de *M. leprae* em amostras de sangue total de casos índices de hanseníase;
- c) Analisar a presença de material genético de *M. leprae* em amostras de sangue total de contatos de hanseníase abaixo de 15 anos de idade;
- d) Verificar possíveis associações entre positividade de qPCR com avaliação dermatoneurológica entre contatos suspeitos de hanseníase;
- e) Avaliar possíveis associações entre positividade de qPCR com títulos de anticorpos séricos anti-PGL1 dos casos e contatos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal do Ceará sob o parecer número 532.850/2014. Após explicação sobre o projeto, os responsáveis dos participantes que aceitaram participar do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O Termo de Assentimento foi aplicado aos jovens de 8 anos de idade ou mais. Foram garantidos o sigilo dos dados e o anonimato a todos os participantes.

3.2 Seleção dos participantes

Foi realizado um levantamento dos casos-índice dos municípios de São Gonçalo do Amarante (CE), Canindé (CE) e Santana do Ipanema (AL), notificados no Sistema Nacional de Vigilância em Agravos (SINAN) até 5 anos antes da realização do estudo. A partir desses dados, contabilizou-se os casos em áreas onde havia maior concentração dos casos. Foram definidos como contatos intradomiciliares aqueles que residiam com o caso-índice e como contatos peridomiciliares aqueles que residiam até 5 casas à esquerda e à direita da moradia do caso-índice, bem como 3 casas diante da moradia do caso-índice, ou ainda aqueles que apresentavam convivência intradomiciliar, mas que não residiam no domicílio. Ao todo, foram selecionados 56 casos-índice e 317 contatos abaixo de 15 anos de idade.

Foram realizadas visitas domiciliares juntamente com os agentes comunitários de saúde durante os anos de 2018 e 2019. Após explanação do projeto aos responsáveis das crianças e jovens entre 4 e 15 anos de idade, era realizado o agendamento no posto de saúde para avaliação dermatoneurológica dos participantes e coleta das amostras biológicas (sangue com e sem anticoagulante). Também foi solicitado que os participantes e responsáveis respondessem a um questionário para obtenção dos dados sociodemográficos. Os casos-índice também foram convidados a participar do projeto, tendo sido coletada amostra de sangue total com anticoagulante para extração de DNA, bem como amostra sem anticoagulante para obtenção do soro.

3.3 Critério de inclusão

Casos-índice, conforme descrito acima, e seus contatos intra e peridomiciliares entre 4 e 15 anos de idade. Todos os responsáveis das crianças e jovens, bem como os casos-índice, foram convidados a assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Jovens entre 8 e 15 anos de idade, após explanação do projeto, foram convidados a assinarem o Termo de Assentimento.

3.4 Critério de exclusão

Participantes que faltaram à avaliação dermatoneurológica e aqueles que se recusaram ou que não foi possível a obtenção dos materiais biológicos.

3.5 Avaliação dermatoneurológica

A avaliação dermatoneurológica dos contatos e casos em São Gonçalo do Amarante e Canindé, CE, foi realizada pela Liga Acadêmica de Doenças Estigmatizantes (LADES), sob supervisão da professora Paula Sacha Frota Nogueira (DENF-UFC), da Universidade Federal do Ceará. Foram avaliados: quantidade e aspectos das lesões de pele, alteração de sensibilidade (térmica, dolorosa e tátil) nas lesões e espessamento de nervos. Quando se fazia necessário, era realizada a prova da histamina endógena.

A avaliação dermatoneurológica em Santana do Ipanema foi realizada pelos profissionais de Enfermagem e Fisioterapia do próprio município.

3.6 Coleta e preparo das amostras

A coleta das amostras foi realizada no posto de saúde dos municípios entre os anos de 2018 e 2019. Foram coletados 4 mL de sangue total em um tubo contendo anticoagulante e outro tubo com gel separador. O tubo com gel separador foi centrifugado após 15 minutos da coleta, sendo o soro separado em alíquotas e armazenado em congelador. A seguir, as amostras eram encaminhadas ao laboratório de pesquisa em Imunologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da UFC. As amostras de sangue total e soro foram armazenadas em caixa de isopor com

gelo a -20°C durante o transporte para Fortaleza até o momento da realização do ensaio.

3.7 Extração de DNA

Foi extraído DNA de sangue total de casos e contatos utilizando o Kit de Extração Biopur Mini Spin Plus (Mobius Life Science, Brasil), conforme as recomendações do fabricante.

Resumidamente, em um microtubo foram adicionados 25 µL de proteinase K, 200 µL de sangue total e 200 µL de tampão de lise. Após homogeneização vigorosa, o microtubo foi colocado em banho seco a 56°C por 30 minutos, com nova homogeneização a cada 10 minutos. Após isso, foram adicionados 200 µL de etanol 96%. Em seguida, a suspensão foi transferida para uma coluna de sílica e submetida à centrifugação a 11.000g por 1 minuto. O filtrado foi descartado, tendo sido adicionados 500 µL de tampão de lavagem 1 na coluna. Após nova centrifugação a 11.000g por 1 minuto, o filtrado foi novamente descartado e 600 µL de tampão de lavagem 2 foram adicionados à coluna. Após nova centrifugação e descarte do filtrado, repetiu-se a operação sem a solução de lavagem para a retirada completa do etanol. A coluna foi transferida para um novo microtubo, tendo sido adicionados 100 µL de tampão de eluição pré-aquecidos a 56°C na coluna, deixando-se incubar por 3 minutos à temperatura ambiente. Após centrifugação, repetiu-se a operação, adicionando-se novamente o tampão de eluição. O volume final do eluato foi de 200 µL.

As amostras de sangue total de Santana de Ipanema foram realizadas utilizando volume dobrado de amostra, proteinase k, tampão de lise e etanol 96%. A etapa de eluição foi feita apenas 1 vez utilizando 50 µL. O objetivo dessas alterações foi aumentar a concentração de DNA extraído das amostras.

O DNA extraído de todas as amostras foi armazenado a -20°C até o momento da análise pelos testes moleculares.

3.8 Escolha dos alvos para o qPCR

Os iniciadores e sondas foram definidos a partir do trabalho de Martinez *et al.* (2009) e de Truman *et al.* (2008) para o gene 16S rRNA e o gene RLEP,

respectivamente. Uma outra sequência de iniciadores para o alvo RLEP foi desenhado empregando-se o programa *Primer Express*® 3.0. Para fins de identificação, daqui em diante, os iniciadores desenhados no programa *Primer Express*® 3.0 serão identificados como RLEPa e aqueles descritos por Truman *et al.* (2008), como RLEPb (Quadro 1). Como controle interno de reação, foi decidido utilizar RNase P humana (Lu, 2020).

Quadro 1 - Iniciadores e sondas empregadas nos testes de validação de qPCR para *Mycobacterium leprae*.

Região	Sonda e iniciadores	Sequência
16S rRNA (Martinez <i>et al.</i> , 2009)	16S rRNA (senso)	5'-GCATGTCTTGTGGTGGAA AGC-3'
	16S rRNA (Antisenso)	5'-CACCCCACCAACAAGCTGAT-3'
	16S rRNA (Sonda)	5'- VIC- CATCCTGCACCGCA-QSY-3'
RLEPa (Desenhado no programa Primer Express 3.0)	RLEPa (Senso)	5'-GGCGTTTTAGTGTGCATGTCA-3'
	RLEPa (Antisenso)	5'-GCAGAAATGGTGCAAGGGATA-3'
	RLEPa (Sonda)	5'-FAM-CACCTGAACAGGCACGTCCCCG-QSY-3'
RLEPb (Truman <i>et al.</i> , 2008)	RLEPb (Senso)	5'-GCAGTATCGTGTTAGTGAACAGTGCA-3'
	RLEPb (Antisenso)	5'-GCACATACGGCAACCTTCTAGCG-3'
	RLEPb (Sonda)	5'-FAM- TCGATGATCCGGCCGTCGGCG-QSY-3'

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Foi realizada uma análise das sequências genômicas dos iniciadores e das sondas no *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST – Disponível em: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para verificação da especificidade *in silico* com o *M. leprae*. Foram calculados os seguintes parâmetros realizados no BLAST: escore máximo, cobertura de alinhamento, valor E e percentual de identidade de *primers* e sondas para DNA de *M. leprae*. Após análise, foi solicitada a síntese dos iniciadores e sondas (Thermo Fisher, EUA).

3.9 Validação dos testes de qPCR para *M. leprae*

Para a validação dos testes de qPCR, empregou-se o DNA de *M. leprae* extraído de bacilos liofilizados (BEI Resources, ATCC, EUA). A concentração do DNA extraído foi de 0,2 ng/μL (200.000 fg/μL), determinada pelo kit de alta sensibilidade Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Thermo Scientific, EUA), conforme recomendações do fabricante. Diferentes concentrações de iniciadores foram testadas, de 200nM a 800nM.

Dois protocolos de qPCR foram testados:

- a) **Sybr Green** - O protocolo utilizado foi o PowerUp™ SYBR® Green Master Mix (Thermo Scientific, EUA), modificando-se apenas a etapa de ativação de 2 minutos para 10 minutos a 95°C em relação às instruções do fabricante. Empregou-se, para a realização dos testes, o termociclador BIO RAD CFX 96 (BIO RAD, USA), gentilmente cedido pelo Laboratório de Análises Clínicas do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Ceará.
- b) **Taqman®** - Foram testadas diferentes concentrações de *primers*, de 200nM a 800nM e de 50nM a 250nM para as sondas. Empregou-se o protocolo recomendado pelo fabricante para Taqman® Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher, USA).

Para a escolha das concentrações dos testes, utilizou-se DNA de *M. leprae* na concentração de 400fg. Após a definição das melhores concentrações de *primer* e sondas, procedeu-se à realização das curvas padrão.

Curva padrão

Curvas padrão foram realizadas para *M. leprae* utilizando-se, para tanto, os *primers* e as sondas de RLEPa, RLEPb e 16S rRNA nas concentrações previamente definidas e DNA extraído de *M. leprae* nas concentrações de 1,53 a 50.000 fg/μL. Os testes foram repetidos 3 vezes em dias diferentes, tendo sido cada concentração testada em duplicata. Como controle negativo, foram incluídos dois poços contendo todos os reagentes, exceto o DNA bacteriano, a fim de verificar possível contaminação da PCR. As curvas padrão foram também analisadas nos seguintes aspectos: a eficiência da curva (E), a linearidade (r^2) e o *slope* (coeficiente angular da reta).

Foram também realizadas curvas de dissociação com o intuito de se verificar a temperatura de dissociação para cada *primer*. Para tanto, realiza-se a curva de dissociação de um amplicon de um controle positivo, iniciando com a temperatura de 55°C a 60°C, quando todas as fitas de DNA estão aneladas. Nessas temperaturas, o corante *Sybr Green* está completamente intercalado entre as fitas duplas, ocorrendo o máximo de emissão de fluorescência. A seguir, programa-se de tal forma que haja um aumento gradual de 5°C até atingir 95°C, quando todas as fitas estão completamente separadas e não há mais emissão de fluorescência do *Sybr Green* (Ririe; Rasmussen; Wittwer, 1997). A temperatura de dissociação é aquela em que metade dos amplicons estão na forma de fita dupla e a outra metade está dissociada.

Sensibilidade analítica

Após a realização das curvas padrão para cada alvo, foi definido o valor de *threshold* e o *cut-off*. O *threshold* representa o índice relativo de fluorescência necessário para que a amostra comece a ser detectada e o *cut-off* é o maior número de ciclos necessários para que a fluorescência que começou a ser detectada ainda seja considerada como resultado positivo.

Especificidade analítica

Utilizou-se DNA extraído de bactérias gram positivas, gram negativas e de bactérias do gênero *Mycobacterium*. As bactérias gram positivas *Staphylococcus aureus* (6538P ATCC) e *Enterococcus faecalis* (19433 ATCC) e gram negativas *Pseudomonas aeruginosa* (9027 ATCC) e *Escherichia coli* (8739 ATCC) foram gentilmente fornecidas pelo Prof. Dr. Hélio Nobre Vitoriano Júnior, do Laboratório de Bioprospecção de Moléculas Antimicrobianas (LABIMAN) da Universidade Federal do Ceará. A *Mycobacterium tuberculosis* foi gentilmente fornecida pela Prof.^a Dra. Cristiane Cunha Frota, do Laboratório de Micobactérias da Universidade Federal do Ceará e as *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium fortuitum* e *Mycobacterium gordonae* foram gentilmente fornecidas pelo Prof. Dr. Célio Lopes Silva, do Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Imunobiológicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP). Após a extração de DNA das bactérias, cada amostra contendo 10 ng de DNA foi testada em duplicata, inclusive DNA de *M. leprae*.

Foram realizados os testes qPCR tanto pelo método de *Sybr Green* como pelo método de Taqman®, empregando-se os mesmos iniciadores e sondas utilizadas anteriormente, ou seja, RLEPa, RLEPb e 16S rRNA.

Para posterior comparação, os produtos de PCR foram submetidos à separação por eletroforese em gel de agarose, corados com corante fluorescente SYBR Safe DNA Gel Stain (Thermo, EUA) e identificados pelo fotodocumentador ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad, EUA).

3.10 Análise de amostras de casos e contatos por PCR em tempo real

Após validação, os testes foram utilizados para avaliação de amostras de DNA extraídas de sangue total de casos e contatos residentes em São Gonçalo do Amarante (CE), Canindé (CE) e Santana do Ipanema (AL).

Algumas amostras foram também testadas pelo kit NATHANS (gentilmente doado pelo Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP), adotado por nosso grupo como sendo o teste padrão ouro.

3.11 NATHANS

O kit NATHANS, como mencionado anteriormente, foi validado em setembro de 2021 pela ANVISA para uso com biópsia de lesões cutâneas com o objetivo de auxiliar no diagnóstico de pacientes com hanseníase e em contatos suspeitos. O protocolo da PCR foi realizado de acordo com as informações do próprio kit, tendo sido empregado o *QuantStudio 5™ System* (Thermo Fisher, USA), gentilmente cedido pelo hemocentro do Ceará (HEMOCE) para realização dos testes.

Devido à limitante quantidade de reagente, foi necessário escolher um n amostral para o kit NATHANS. A escolha das amostras baseou-se nos seguintes critérios: 1) contatos com sorologia positiva para 2 ou mais isotipos de anticorpos; (2) casos que ainda não tivessem iniciado o tratamento; e (3) casos e contatos que possuísem resultado positivo ou inconclusivo nos demais testes de qPCR.

3.12 Pesquisa de Anticorpos por ELISA indireto

Inicialmente, placas de poliestireno (Costar, USA) foram sensibilizadas com

50µL de solução de antígeno PGL-1 a 5µg/mL etanol absoluto em cada poço por 2 horas. A seguir, foram adicionados 100µL de solução fosfato de salina (PBS)- soro fetal bovino (SFB) 1%. Após 2 horas de incubação a 37°C, foram realizadas lavagens (5x) com 400µL de PBS-SFB 0,05% em cada poço. Amostras de soro de controles e testes foram diluídos (1:50 para o teste de IgA e 1:200 para os testes de IgM e IgG) com PBS-SFB 1% e 50 µL foram adicionados em cada poço. Os controles foram testados em quadruplicata e as demais amostras em duplicata.

As placas foram incubadas a 37°C por 2 horas. Durante a incubação, os conjugados anti-IgA (Thermo Fisher, USA), anti-IgG (Sigma, USA) e anti-IgM (Thermo Fisher, USA) foram previamente diluídos na razão de 1:12.000, 1:20.000 e 1: 2.500, respectivamente. As placas foram lavadas, seguindo o mesmo procedimento anteriormente mencionado, e 50µL do conjugado de interesse foram adicionados nos poços. Após nova incubação a 37°C por 1 hora e 30 minutos, as placas foram novamente lavadas e 100µL de solução de tetrametilbenzidina 1 mg/mL (Bio Rad, USA) foram adicionados a cada poço, seguido de 30 minutos de incubação à temperatura ambiente e protegido da luz. A reação foi interrompida, aplicando-se 25µL de ácido sulfúrico 2,5N para finalizar a reação e a leitura foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 450nm.

Como controle positivo, foi utilizada uma amostra de soro de paciente com nível elevado de anticorpos. Como controle negativo, foi utilizada uma amostra de soro de indivíduo não doente com ausência de anticorpos. Foi aplicada em todos os testes uma amostra de *pool* de soro humano normal (constituído de soro de 50 doadores de pessoas que não referiam contato com pacientes com hanseníase, obtido no HEMOCENTRO, CE), considerado como soro *cut-off*. Os resultados foram expressos de acordo com a seguinte fórmula: média da densidade óptica (DO) da amostra teste (menos branco) dividida pela DO do soro cut-off. Índices correspondentes ou acima de 1,2 eram considerados positivos, 1,0 a 1,1, indeterminados, abaixo de 1,0, negativos (Nagao-Dias *et al.*, 2019).

3.13 Análise estatística

As variáveis escalares estão descritas como média e desvio-padrão. As variáveis categóricas, por sua vez, estão descritas por frequência absoluta (n amostral) e relativa (percentual).

Os parâmetros de sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo (VPP) foram estimados para os métodos de biologia molecular.

No intuito de avaliar a concordância entre os métodos de biologia molecular e de sorologia, foram calculados os índices kappa para cada par de métodos através do programa JAMOV versão 2.3.28.0. Foi realizada interpretação dos índices por meio dos critérios de Landis & Koch (1977). Apresentaram concordâncias desprezíveis aquelas com coeficiente kappa entre 0,00 e 0,20; concordância suave, aquelas com coeficiente kappa entre 0,21 e 0,40; concordância moderada, aquelas com coeficiente kappa entre 0,41 e 0,60; concordância substancial (grande), aquelas com coeficiente kappa entre 0,61 e 0,80; e concordância quase perfeita, aquelas com coeficiente kappa entre 0,81 e 1,00. Considerou-se a análise estatisticamente significativa, quando $p \leq 0,05$.

Visando verificar se a forma clínica constituía um preditor do diagnóstico de hanseníase pelos métodos de biologia molecular, foram realizadas análises multivariadas. Para os casos, foram conduzidas regressões logísticas binárias, tendo como variáveis dependentes os métodos Taqman®, *Sybr Green* e NATHANS). Para os contatos, foram realizadas regressões logísticas binárias, tendo como variáveis dependentes os métodos (Taqman®, *Sybr Green* e NATHANS) e como preditores possíveis a forma clínica e o tipo de contato residencial.

Previamente à execução das regressões, os seguintes pressupostos foram avaliados: 1) ausência de multicolinearidade para cada par de preditores por meio dos parâmetros de tolerância e VIF e 2) ausência de outliers entre os resíduos. Para cada análise de regressão foi adotado o teste Qui-Quadrado de Likelihood Ratio para verificar a significância do modelo gerado. A significância dos preditores foi avaliada pelo teste de Wald. O nível de significância adotado foi de $\alpha=0,05$.

Todas as análises foram realizadas no programa estatístico SPSS (IBM, Greenville, SC) versão 25.0.

4 RESULTADOS

4.1 Primers e sondas

Com relação ao **alvo RLEP** (Quadro 1), decidiu-se, no presente trabalho, adicionar um par de sequências (ao qual se denominou RLEPa), além daquele proposto por Truman *et al.* (2008): RLEPb. Para tanto, foi utilizado o programa *Primer Express*® 3.0.

Considerando o genoma completo do *Mycobacterium leprae* (GenBan: AL450380.1), foi observado que os amplicons formados a partir dos iniciadores para RLEPa, RLEPb 16S rRNA apresentavam os seguintes tamanhos: 127, 70 e 71 pares de bases, respectivamente.

Quanto aos *primers* e sonda do RLEPa, quando alinhados ao BLASTn, apenas *M. leprae* apresentou 100% de alinhamento (Tabela 1). Foram obtidos os escores máximos e os menores valores de E para *M. leprae*. **Escore máximo** é um parâmetro que o BLAST calcula, considerando a sequência de alinhamento e os números de pares de bases alinhadas. **Valor E** é o valor de expectativa, ou seja, se o índice for menor, significa dizer que o alinhamento não ocorreu ao acaso. A totalidade de alinhamento é dada pela cobertura de identidade, que está relacionada a como as sequências estão alinhadas e o percentual de identidade está relacionado à similaridade das sequências. Semelhantes observações foram feitas para RLEPb (Tabela 1).

Tabela 1 - Escore Máximo, Cobertura de alinhamento, Valor E e percentual de identidade de *primers* e sondas para RLEPa e RLEPb com DNA de *M. leprae*, conforme cálculos realizados pelo BLAST.

		Escore Máximo	Cobertura de identidade	Valor E	Percentual de identidade
RLEPa	Senso	42,1	100%	0,61	100%
RLEPa	Antisenso	42,1	100%	0,61	100%
RLEPa	Sonda	44,1	100%	0,16	100%
RLEPb	Senso	52,0	100%	0,001	100%
RLEPb	Antisenso	46,1	100%	0,039	100%
RLEPb	Sonda	42,1	100%	0,61	100%

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

A sequência de 16S rRNA apresentou 100% de alinhamento para *M. tuberculosis* e *M. sp.*, entretanto, devido ao número limitado de respostas de análises fornecida pelo BLAST, não foi obtida informação sobre seu alinhamento com o *M. leprae* (Tabela 2).

Tabela 2 - Escore Máximo, Cobertura de alinhamento, Valor E e percentual de identidade de *primers* e sondas para 16S rRNA com DNA de *Mycobacterium sp.*, *M. tuberculosis* e *M. leprae*, conforme análises realizadas pelo BLAST.

16S rRNA	<i>Mycobacterium sp</i>				<i>M. tuberculosis</i>			
	Escore Máximo	Cobertura de identidade	Valor E	Percentual de identidade	Escore Máximo	Cobertura de identidade	Valor E	Percentual de identidade
Senso	42,1	100%	0,61	100%	42,1	100%	0,61	100%
Anti senso	40,1	100%	2,4	100%	40,1	100%	2,4	100%
Sonda	Não foi possível sua realização							

Fonte: Elaborada pela autora (2023). Obs.: Informação não fornecida pelo BLAST para *M. leprae*.

4.2 Validação dos testes de qPCR

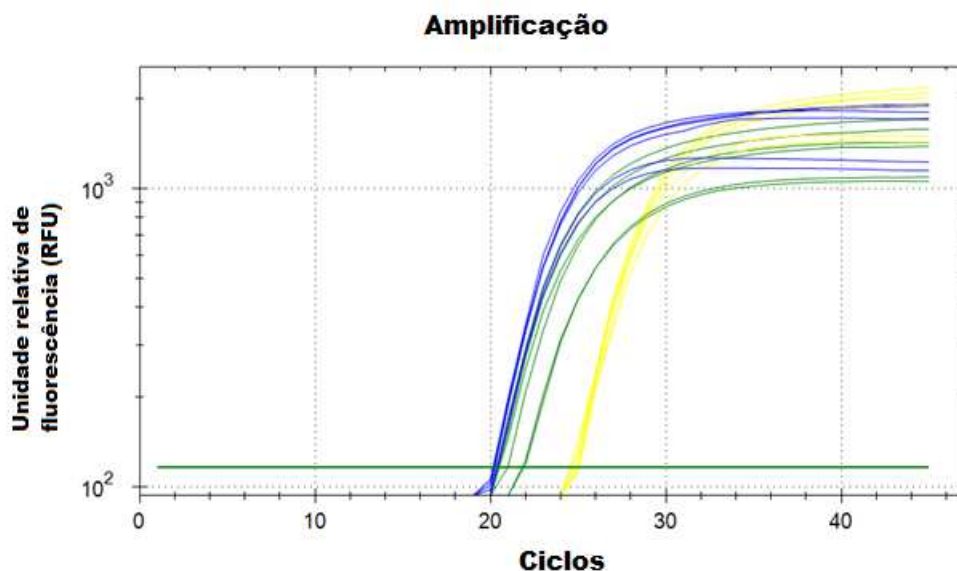
Para a realização dos testes de validação da PCR, empregou-se DNA extraído de *M. leprae* (BEI Resources, USA) e, como controle negativo, água para injeção.

Determinação da concentração de primers e sondas

Foi realizado o protocolo baseado no uso do reagente PowerUp™ SYBR® Green Master Mix para os testes, tendo as amostras sido amplificadas no termociclador Bio-rad CFX (Bio-rad, USA). O critério utilizado para a escolha da concentração de *primer* foi aquele em que o controle positivo apresentasse o menor Cq e a maior fluorescência (RFU) no final da reação, em que Cq representa o número de ciclos necessários para começar a ser detectada a fluorescência.

A figura 3 e a tabela 3 apresentam os ciclos de amplificação para todas as concentrações dos *primers*.

Figura 3 - PCR em tempo Real para DNA de *Mycobacterium leprae*, empregando o termociclador Bio-rad CFX (Bio-rad, USA) para amplificação das amostras. As curvas de amplificação estão ilustradas em azul (RLEPa), verde (RLEPb) e amarelo (16S r RNA) para as três concentrações testadas de *primer*, ou seja, 200 nM, 400 nM e 800 nM. Cada concentração foi testada em duplicata.



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Tabela 3 - Média dos valores de Cq e de RFU da duplicata de cada concentração de *primer*. RFU: unidades relativas de fluorescência; Cq: número de ciclos de amplificação necessários para a fluorescência começar a ser detectada.

Concentração de <i>primers</i>	RLEPa		RLEPb		16SrRNA	
	Cq	RFU	Cq	RFU	Cq	RFU
800nM	20,20	1905,04	20,42	1650,31	24,87	2134,91
400nM	20,13	1753,62	20,80	1407,20	24,94	1955,21
200nM	20,40	1187,74	21,93	1075,41	24,81	1466,15

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Considerando o Cq como o menor número de ciclos necessários para a fluorescência começar a ser detectada, assim como levando-se em conta a maior fluorescência emitida, as concentrações de 800 nM para RLEPb e 16S rRNA e de 400 nM para RLEPa foram escolhidas. Não foi observada qualquer amplificação nos controles negativos.

Quanto ao protocolo de Taqman®, foram analisadas as seguintes concentrações de sonda: 50nM, 100nM, 150nM e 250nM.

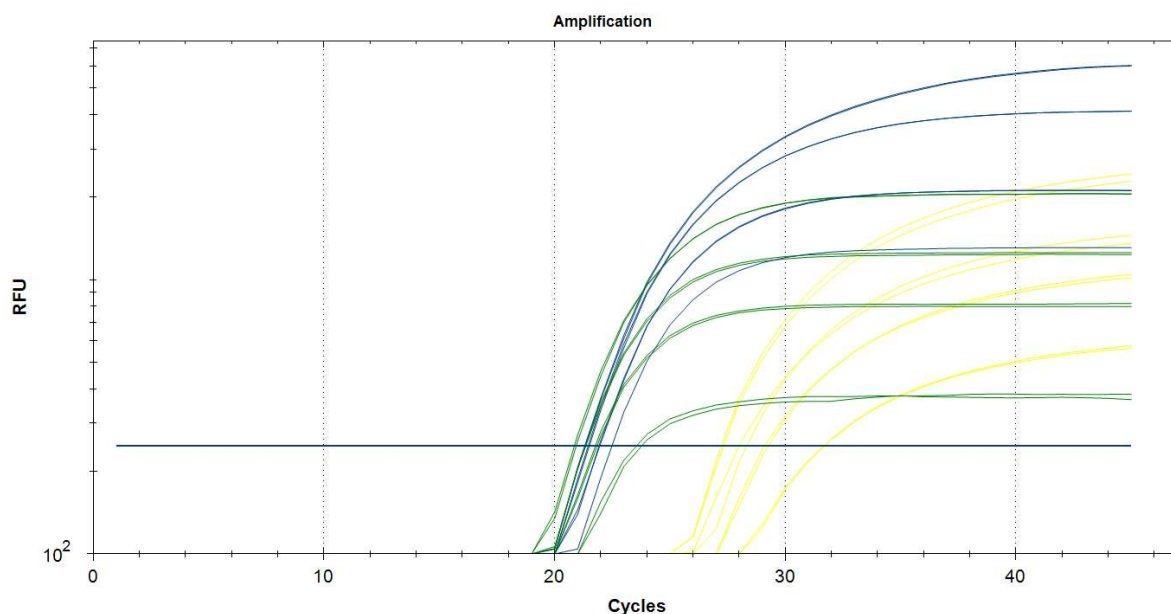
Conforme mostram a tabela 4 e a figura 4, considerando o Cq a maior fluorescência emitida, decidiu-se pela concentração de 250 nM para todas as sondas. Não houve amplificação nos controles negativos para as sondas testadas.

Tabela 4 - Média dos valores de Cq e de RFU da duplicada de cada concentração de sonda. RFU: unidades relativas de fluorescência; Cq: número de ciclos de amplificação necessários para a fluorescência começar a ser detectada.

Concentração de sondas	RLEPa		RLEPb		16SrRNA	
	Cq	RFU	Cq	RFU	Cq	RFU
250nM	21,26	6036,83	20,87	2053,54	25,08	2360,50
150nM	21,41	4121,50	21,29	1244,03	25,59	1405,92
100nM	21,93	2114,76	21,77	809,24	26,36	1031,94
50nM	22,42	653,92	23,66	373,98	27,36	569,11

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Figura 4 - Gráfico de amplificação da validação de sonda. As linhas em azul e verde representam os alvos RLEPa e RLEPb, respectivamente, cujo fluoróforo é o FAM. As linhas em amarelo representam o alvo 16S rRNA, cujo fluoróforo é o VIC.



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

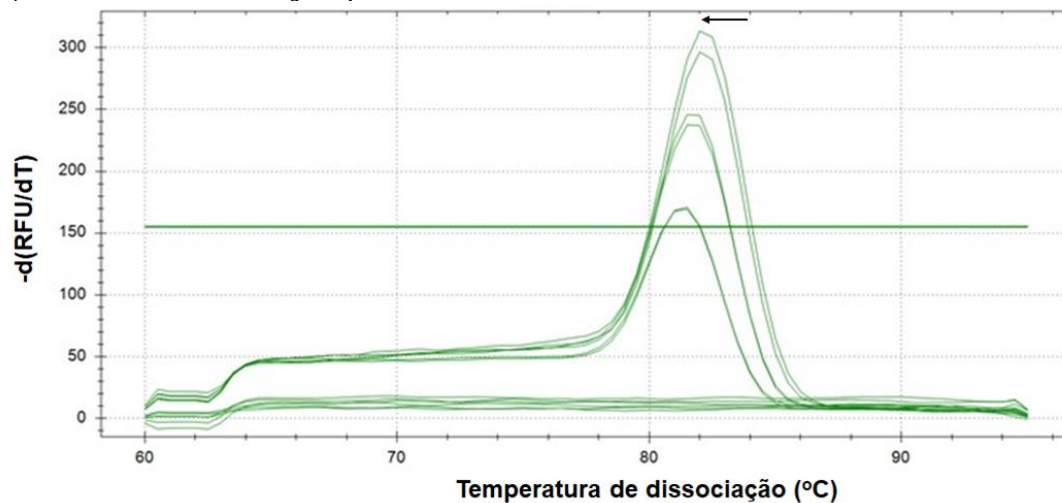
Curva de dissociação

Foi realizada, a seguir, uma curva de dissociação para que os amplicons almejados fossem diferenciados de dímeros de *primers*, contaminações ou amplicons inespecíficos (Ririe; Rasmussen; Wittwer, 1997).

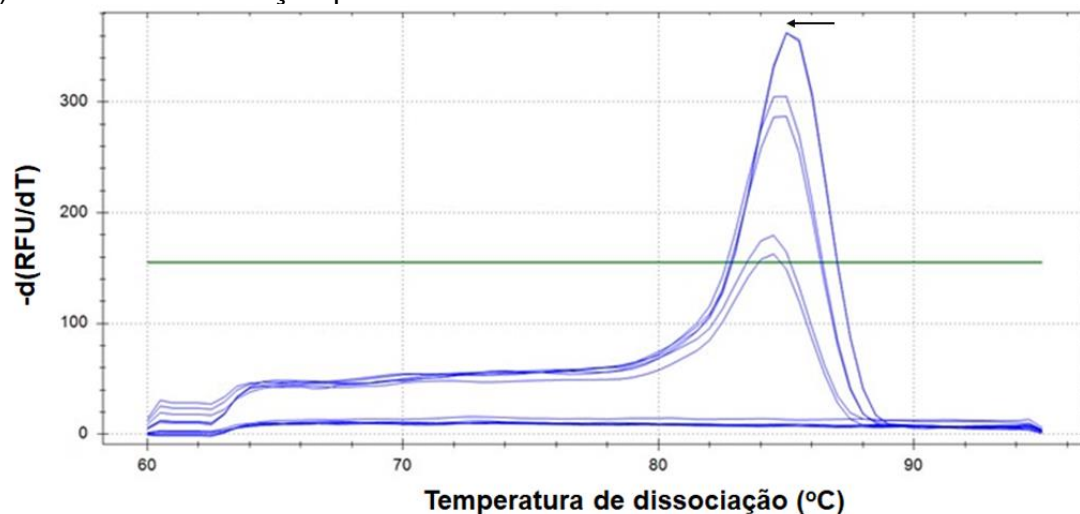
As temperaturas de dissociação foram 85,0°C para RLEPa, 81,5°C para RLEPb e 82,5°C para 16S rRNA (Figura 5). É possível ocorrer uma variação de 0,5°C de uma concentração para outra do mesmo *amplicon*, o que de fato foi observado. Não se observou amplificação para o controle negativo com nenhum dos *primers* testados.

Figura 5 - Curvas de dissociação de DNA *M. leprae*, utilizando como *primers* RLEPa (5a), RLEPb (5b) e 16S RNA (5c). As três concentrações testadas de *primer* foram 200 nM, 400 nM e 800 nM. Cada concentração foi testada em duplicata. As curvas de menor fluorescência representam as menores concentrações de *primer*.
-d(RFU)/dT – Regressão negativa da fluorescência em relação à temperatura.

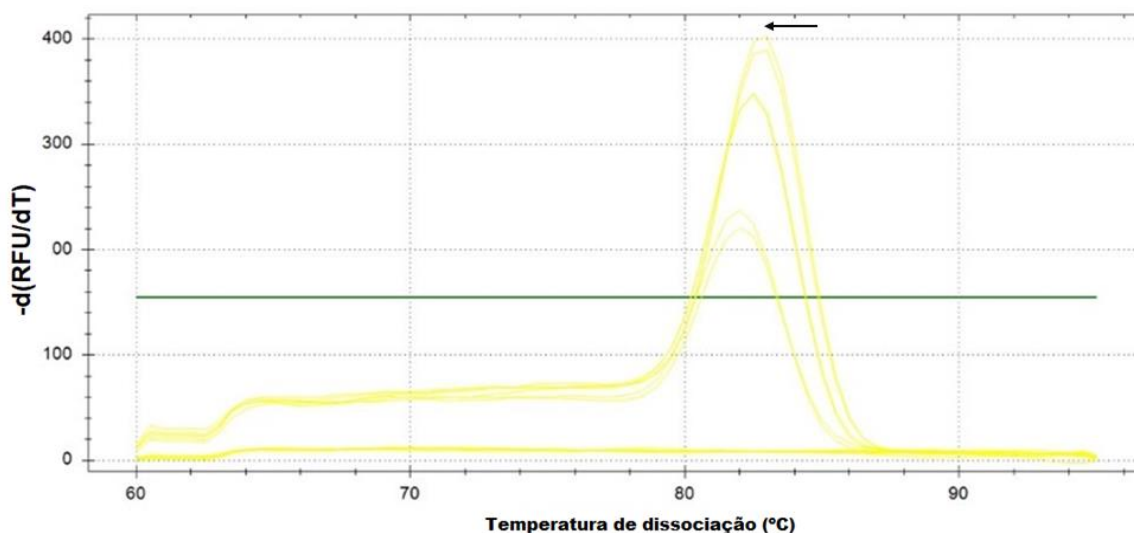
a) Curva de dissociação para RLEPb



b) Curva de dissociação para RLEPa



c) Curva de dissociação para 16S RNA



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

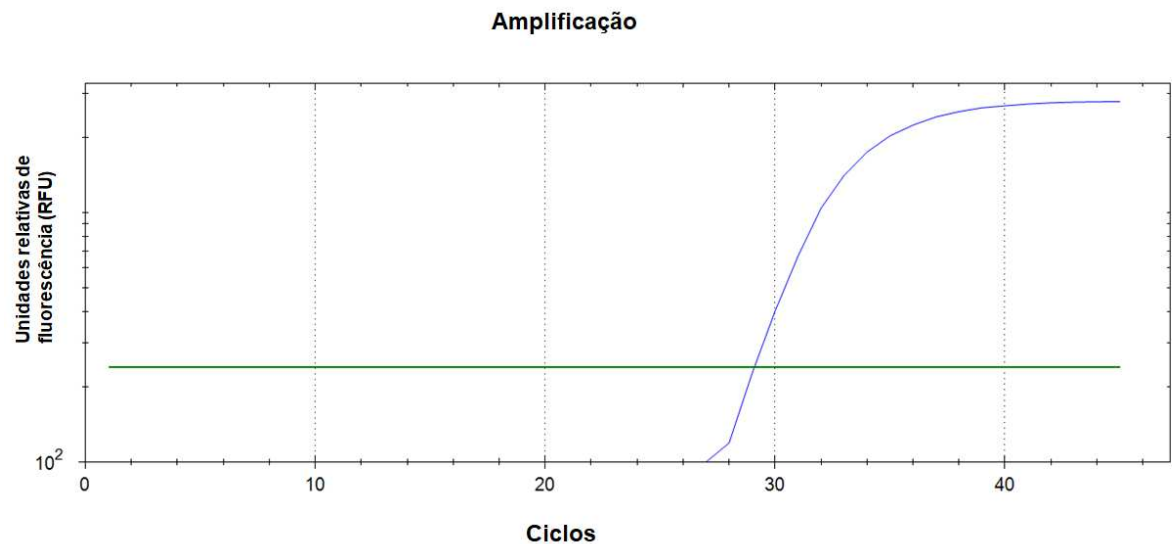
Especificidade analítica

Os *primers* de RLEPa, RLEPb e 16S RNA foram testados para avaliar possível amplificação com DNA de outras bactérias. Para tanto, foram analisados *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium fortuitum* e *Mycobacterium gordonae*. DNAs das cepas foram extraídos em duplicatas e cada uma destas amostras foram quantificadas por NanoDrop Lite UV (Thermo, USA) e diluídas para a concentração de 5ng/μL. A seguir, cada amostra contendo 10ng de DNA de cada um dos microrganismos foi testada em duplicata. Para efeitos de comparação, foi também testado DNA de *M. leprae*.

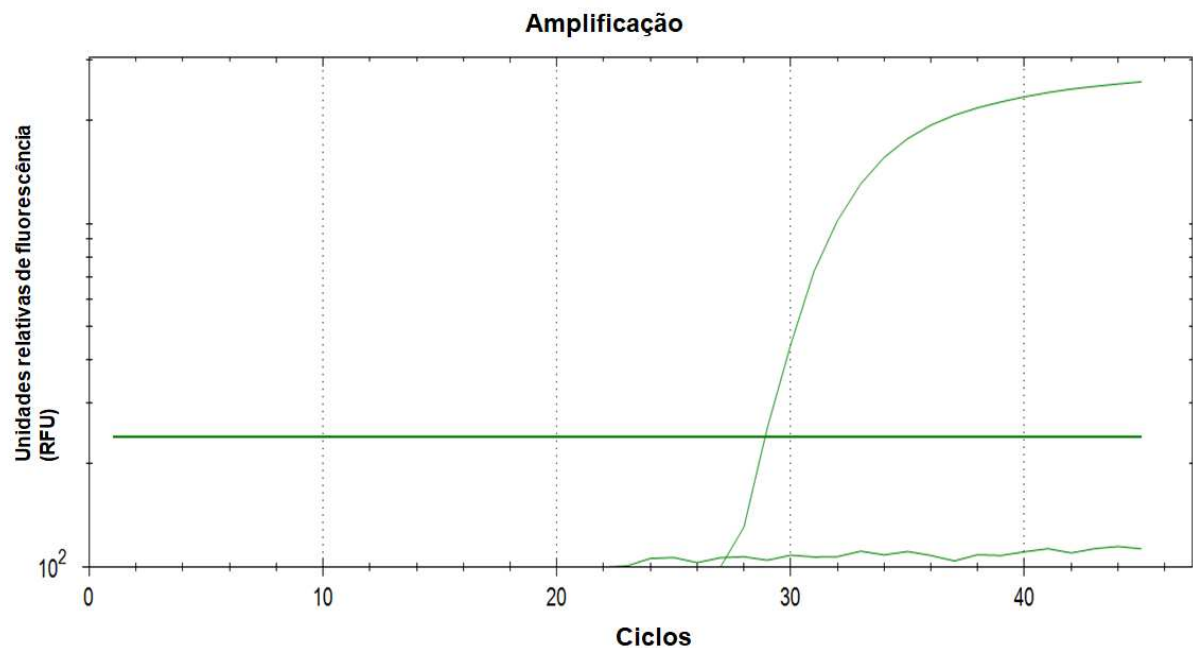
Em relação aos dois alvos do gene RLEP, foi observada amplificação apenas para DNA de *M. leprae*, tanto pelo método de *Sybr Green* (Figuras 6a e 6b) quanto pelo método Taqman® (Figuras 7a e 7b), sendo possível confirmar a especificidade dos *primers* empregados.

Figura 6 - PCR pelo método *Sybr Green*, empregando-se como *primer* RLEPa (Figura 6a) e RLEPb (Figura 6b) e DNA de *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium gordonae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Houve positividade apenas para DNA de *M. leprae*.

a) Protocolo qPCR- *Sybr Green* com RLEPa



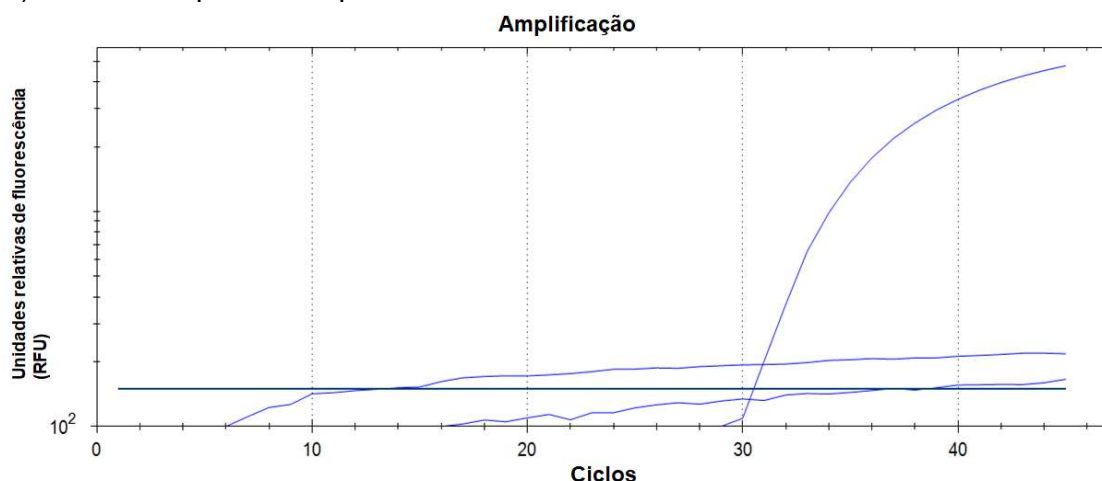
b) Protocolo qPCR- *Sybr Green* com RLEPb



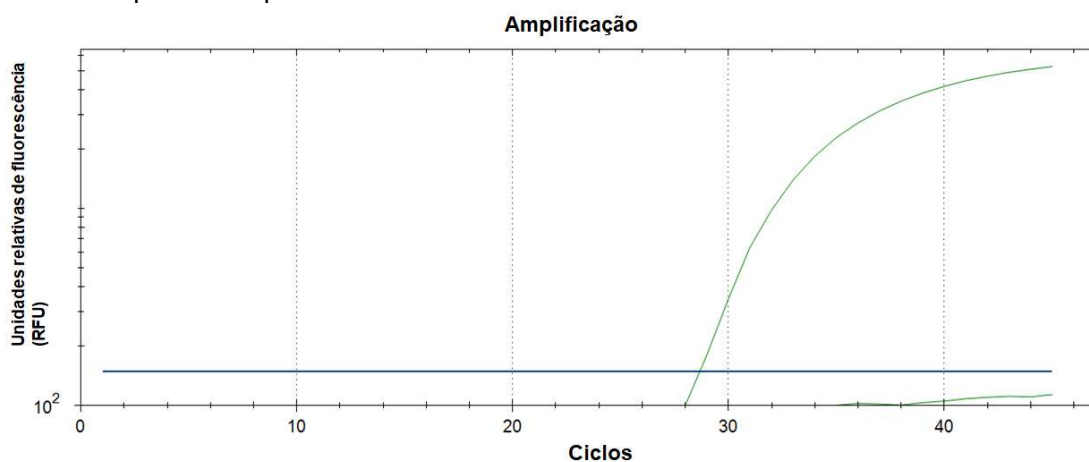
Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Figura 7 - PCR pelo método Taqman®, empregando-se como *primer* RLEPa (Figura 7a) e RLEPb (Figura 7b) e DNA alvos de *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium gordonae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Houve positividade apenas para DNA de *M. leprae*.

a) Protocolo qPCR- Taqman® com RLEPa



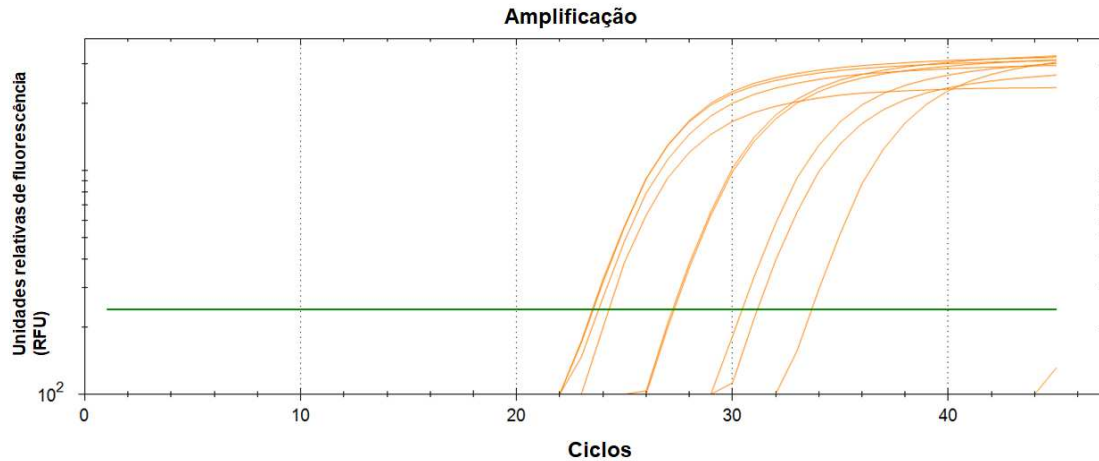
b) Protocolo qPCR- Taqman® com RLEPb



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Em relação ao alvo 16S rRNA, houve amplificação para DNA de *M. leprae* e para DNA das demais espécies do gênero *Mycobacterium* pelo protocolo de *Sybr Green* (Figura 8). Não houve amplificação para os demais gêneros.

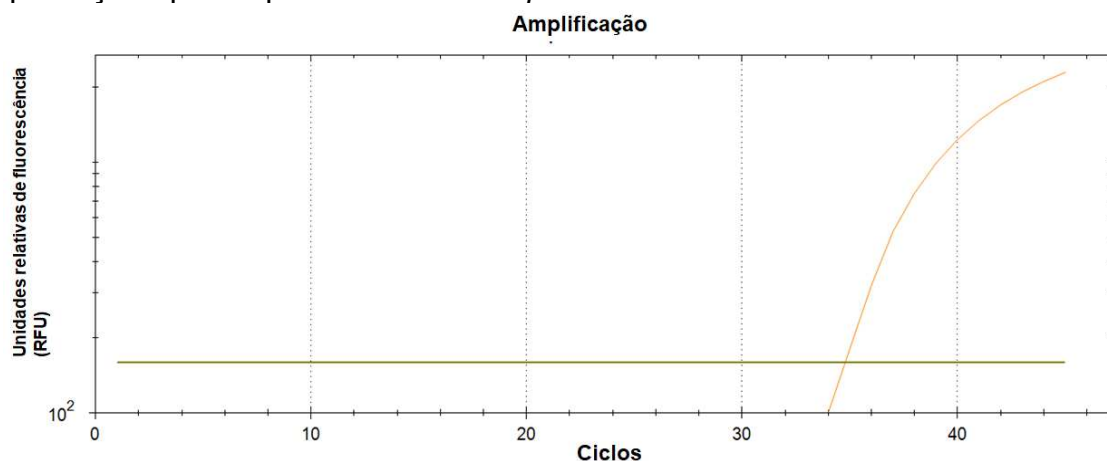
Figura 8 - PCR pelo método *Sybr Green*, empregando-se como *primer* 16S rRNA e DNA alvos de *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium gordonae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Houve amplificação para DNA de *M. leprae* e para as demais espécies de *Mycobacterium*. Não houve amplificação para os demais gêneros.



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Empregando-se o método Taqman®, houve amplificação apenas para o DNA de *M. leprae* (Figura 9).

Figura 9 - PCR pelo método Taqman®, empregando-se como *primer* 16S rRNA e DNA alvos de *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium gordonae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Houve amplificação apenas para DNA de *M. leprae*.



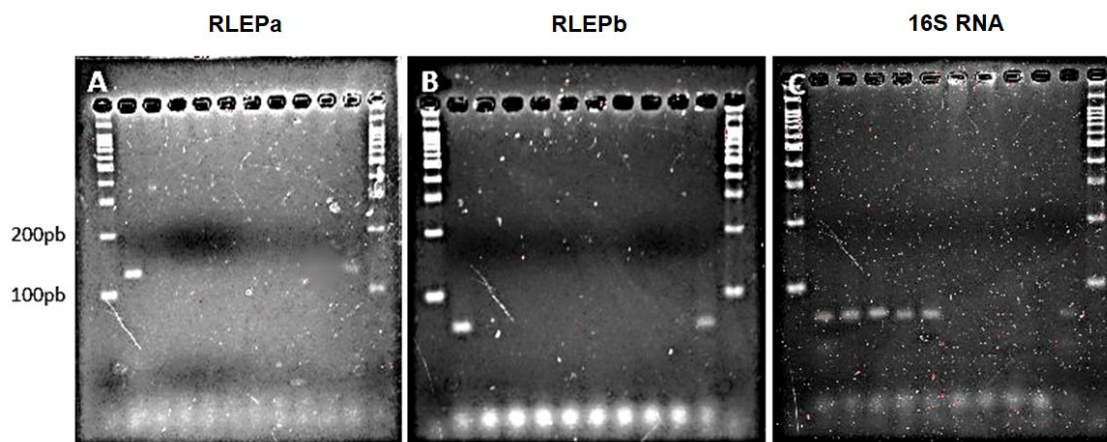
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Os amplicons obtidos pelo método de *Sybr Green* foram analisados após separação eletroforética em gel de agarose 5%. Depois de corados com corante

fluorescente Sybr Safe stain, os géis foram submetidos à análise de fotodocumentador. Conforme mostra a Figura 10, na canaleta 1 encontra-se um marcador de 100 pares de base. Nas canaletas seguintes, estão representados os amplicons de *Mycobacterium leprae* (2), *Mycobacterium tuberculosis* (3), *Mycobacterium bovis* (4), *Mycobacterium fortuitum* (5), *Mycobacterium gordonae* (6), *Staphylococcus aureus* (7), *Enterococcus faecalis* (8), *Escherichia coli* (9), *Pseudomonas aeruginosa* (10), *Mycobacterium leprae* (11) e marcador de 100 pares de bases (12). Com relação aos *primers* RLEPa e RLEPb, comparando-se as posições dos amplicons para *M. leprae* com as do marcador, verifica-se que os números de pares de bases foram de aproximadamente 127 e 71 respectivamente, correspondentes às análises *in silico*. Não houve presença de amplicons das demais espécies de micobactérias, tampouco dos demais gêneros.

Observa-se que para o *primer* 16S rRNA, há presença de material genético nas canaletas relacionadas a todas as espécies de micobactérias testadas, além de *M. leprae*. Houve ausência de material genético para os demais gêneros.

Figura 10 - Análise eletroforética dos amplicons obtidos a partir dos *primers* RLEPa, RLEPb e 16S rRNA em gel de agarose 5%. A ordem dos poços em todos os géis foram: 1- Marcador de 100 pares de bases, 2- *Mycobacterium leprae*, 3- *Mycobacterium tuberculosis*, 4- *Mycobacterium bovis*, 5- *Mycobacterium fortuitum*, 6- *Mycobacterium gordonae*, 7- *Staphylococcus aureus*, 8- *Enterococcus faecalis*, 9- *Escherichia coli*, 10- *Pseudomonas aeruginosa*, 11- *Mycobacterium leprae* e 12- Marcador de 100 pares de bases. Os amplicons foram corados com corante Syber Safe DNA stain e identificados pelo fotodocumentador ChemiDoc MP Imaging system (Bio-Rad, USA)



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Curvas padrão

As curvas de RLEPa pelo método de *Sybr Green* obtiveram eficiências de 100,0% ($r^2 = 0,997$; $slope = -3,323$), de 102,5% ($r^2 = 0,996$; $slope = -3,264$) e de 105,2% ($r^2 = 0,996$; $slope = -3,204$) (Tabela 5). Foi observada detecção até 1,53fg/ μ L de DNA.

As curvas de RLEPb obtiveram eficiências de 99,8% ($r^2 = 0,997$; $slope = -3,326$), de 100,6% ($r^2 = 1,000$; $slope = -3,307$) e de 108,2% ($r^2 = 0,992$; $slope = -3,140$) (Tabela 5). Foi observada detecção com boa reprodutibilidade entre as duplicatas até 1,53fg/ μ L de DNA.

As curvas da 16S rRNA registraram eficiências de 101,6% ($r^2 = 0,996$; $slope = -3,285$), de 94,2% ($r^2 = 0,999$; $slope = -3,469$) e de 108,5% ($r^2 = 0,993$; $slope = -3,134$). Dois pontos da curva foram excluídos da análise devido à divergência entre as duplicatas ou total ausência de amplificação (Tabela 5). Foi observada uma detecção até 97,66fg/ μ L de DNA, tendo sido considerado o iniciador menos sensível do nosso estudo.

Tabela 5 - Curvas padrão de DNA de *M. leprae* utilizando os *primers* RLEPa, RLEPb, 16S RNA pelo protocolo de *Sybr Green*. Foram calculados os valores de eficiência (E), linearidade (r^2) e $slope$ de três curvas realizadas para cada *primer*. Para a realização das curvas, utilizou-se DNA extraído de *M. leprae* (BEI RESOURCES, USA) em concentrações que variaram de 1,53 a 50.000fg/ μ L.

Protocolo SYBR GREEN												
	curva 1			curva 2			curva 3			Média		
	E	r^2	$slope$	E	r^2	$slope$	E	r^2	$slope$	E	r^2	$slope$
RLEPa	100,0	0,997	-3,323	102,5	0,996	-3,264	105,2	0,996	-3,204	102,6	0,996	-3,264
RLEPb	99,8	0,997	-3,326	100,6	1,000	-3,307	108,2	0,992	-3,14	102,9	0,996	-3,258
16S rRNA	101,6	0,996	-3,285	94,2	0,999	-3,469	108,5	0,993	-3,134	101,4	0,996	-3,296

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Quanto ao protocolo de qPCR-TAQMAN®, as três curvas de RLEPa obtiveram eficiências de 92,8% ($r^2 = 1,000$; $slope = -3,506$), de 93,0% ($r^2 = 0,999$; $slope = -3,502$) e de 92,5% ($r^2 = 0,999$; $slope = -3,515$) (Tabela 6). Foi observada detecção até 1,53fg/ μ L de DNA.

As curvas de RLEPb apresentaram eficiências de 101,1% ($r^2 = 0,997$; $slope = -3,298$), de 100,6% ($r^2 = 0,999$; $slope = -3,308$) e de 92,7% ($r^2 = 0,997$; $slope = -3,511$) (Tabela 6). Foi observada detecção com boa reprodutibilidade entre as duplicatas até 1,53fg/ μ L de DNA.

Quanto às curvas de 16S rRNA, foram observadas eficiências de 97,7% ($r^2 = 0,996$; $slope = -3,379$), de 95,1% ($r^2 = 0,999$; $slope = -3,445$) e de 97,7% ($r^2 = 0,996$; $slope = -3,378$) (Tabela 6). Dois pontos da curva foram excluídos da análise devido a divergências entre as duplicatas ou à total ausência de amplificação. Foi observada uma detecção até 97,66fg/ μ L de DNA, sendo considerado o alvo menos sensível do nosso estudo.

Tabela 6 - Curvas padrão de DNA de *M. leprae* utilizando o *primer* RLEPa, RLEPb, 16S RNA pelo protocolo de Taqman®. Foram calculados os valores de eficiência (E), linearidade (r^2) e $slope$ de três curvas realizadas para cada *primer*. Para a realização das curvas, utilizou-se DNA extraído de *M. leprae* (BEI RESOURCES, USA), em concentrações que variaram de 1,53 a 50.000fg/ μ L

	Protocolo TAQMAN®											
	curva 1			curva 2			curva 3			Média		
	E	r^2	$slope$	E	r^2	$slope$	E	r^2	$slope$	E	r^2	$slope$
RLEPa	92,8	1,000	-3,506	93,0	0,999	-3,502	92,5	0,999	-3,515	92,8	0,999	-3,508
RLEPb	101,1	0,997	-3,298	100,6	0,999	-3,308	92,7	0,997	-3,511	98,1	0,998	-3,372
16S rRNA	97,7	0,996	-3,379	95,1	0,999	-3,445	97,7	0,996	-3,378	96,8	0,997	-3,401

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Limiar de reatividade ou cut-off

O *cut-off*, ou limiar de reatividade, de cada alvo foi decidido baseado no Cq do ponto de menor concentração. Dessa forma, resultados positivos seriam considerados quando o número de ciclos necessários para amplificação fosse menor do que aqueles para atingir o *cut-off* (Tabela 7). Resultados negativos seriam considerados quando não houvesse amplificação. Resultados indeterminados seriam considerados quando o número de ciclos necessários para amplificação fosse maior do que aquele do *cut-off*.

Tabela 7 - Valor de *cut-off*, ou limiar de reatividade, baseado no número de ciclos necessários para atingir a menor concentração de DNA de *M. leprae*

Primer	Sensibilidade analítica - (fg/mL)	Cut-off (Cq)	Threshold (RFU)
RLEPa	1,53	36	216,48
RLEPb	1,53	35,5	
16S rRNA	97,66	35	133,58

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

4.3 Perfil clínico e demográfico de casos e contatos

Os dados demográficos, classificação e avaliação dos contatos e casos estão apresentados na Tabela 8. Foram selecionados para o estudo 317 contatos, destes 62 eram intradomiciliares (ID) e 255 eram peridomiciliares (PD) na faixa etária de 4 a 15 anos de idade. Foram selecionados 56 casos, sendo 14 com a forma clínica paucibacilar (25,0%) e 42 (75,0%) com a forma multibacilar. A média de idade dos contatos era de 9,26 anos de idade com desvio padrão de 3,22 anos e a média dos casos foi de 50,45 anos de idade com desvio padrão de 20,39 anos. O sexo feminino representou 52,7% dos contatos e 37,5% dos casos.

Foi verificada uma porcentagem baixa de contatos intradomiciliares (19,6%). Houve uma maior frequência de contatos de pacientes multibacilares (68,1%), sendo que, em relação a 12 contatos, não foi possível obter a informação de tipo de forma clínica de seus respectivos casos-índice. A presença de lesões suspeitas ou nervos acometidos nos contatos foi de 39 (12,3%). Destes, a grande maioria dos participantes não apresentou alteração de histamina endógena.

Tabela 8 - Análise descritiva dos dados coletados nos casos de hanseníase (n = 56) e nos contatos entre 4 e 15 anos de idade (n = 317). continua

	Casos (n = 56)	Contatos (n = 317)
Idade (anos) (média ± DP)	50,45 ± 20,39	9,26 ± 3,22
Sexo		
Masculino, n (%)	35 (62,5)	150 (47,3)
Feminino, n (%)	21 (37,5)	167 (52,7)
Forma clínica		
Paucibacilar, n (%)	14 (25,0)	89 (28,1)
Multibacilar, n (%)	42 (75,0)	216 (68,1)
Não informado, n (%)	0 (0,0)	12 (3,8)
Contato residencial		
Intradomiciliar, n (%)	-----	62 (19,6)

Tabela 8 - Análise descritiva dos dados coletados nos casos de hanseníase (n = 56) e nos contatos entre 4 e 15 anos de idade (n = 317). conclusão

	Casos (n = 56)	Contatos (n = 317)
Peridomiciliar, n (%)	-----	255 (80,4)
Lesão suspeita		
Presença, n (%)	-----	36 (11,4)
Ausência, n (%)	-----	281 (88,6)
Nervo acometido		
Presença, n (%)	-----	5 (1,6)
Ausência, n (%)	-----	312 (98,4)
Lesão suspeita e/ou nervo acometido		
Presença, n (%)	-----	39 (12,3)
Ausência, n (%)	-----	278 (87,7)

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Nota: DP= desvio-padrão.

4.4 Sorologia e testes moleculares nos casos de hanseníase e contatos

Com relação à **sorologia**, foi considerada **positiva** quando a amostra apresentasse positividade para dois ou mais isotipos de anti-PGL1 e **negativa** quando apresentasse até um isotipo de anticorpo.

A testagem de IgG, IgA e IgM anti-PGL1 foi realizada nos 56 casos-índice de hanseníase e em seus 317 contatos.

Com relação aos **testes moleculares**, consideraram-se **positivos** aqueles que apresentavam positividade para dois ou três alvos (RLEPa, RLEPb, 16S rRNA); **negativos** aqueles que apresentavam ausência de amplificação para todos os alvos; e **inconclusivos** aqueles que apresentavam positividade para um alvo.

Os protocolos moleculares *Sybr Green* e Taqman® foram realizados em todos os 56 casos e seus 317 contatos.

Duas de 373 amostras analisadas pelo teste de Taqman® foram inconclusivas (0,536%). As demais foram negativas (n = 371, 99,46%). Quanto às amostras inconclusivas, elas apresentavam RLEP, mas ausência de 16S RNA.

Quanto ao teste de *Sybr Green*, 342 amostras foram consideradas negativas (91,69%), 22 inconclusivas (5,90%) e 9 positivas (2,41%). Quatorze das 20 amostras inconclusivas ocorreram por ausência de 16S RNA e 8 por ausência de RLEP.

O kit NATHANS foi testado em 9 casos e 134 contatos. Os critérios de positividade e negatividade foram os mesmos que aqueles utilizados para os demais

testes moleculares. Segundo o teste, 142 amostras foram consideradas negativas (99,30%) e uma positiva (1,7%).

A Tabela 9 apresenta os resultados para sorologia e testes moleculares (Taqman® e *Sybr Green*) em 56 casos-índice de hanseníase e em 317 contatos. Quanto aos casos, 7 (12,5%) amostras apresentaram positividade na sorologia e 1 (1,79%) amostra foi positiva no teste molecular de *Sybr Green*. Quanto aos contatos (n = 317), 1 (0,32%) amostra apresentou positividade na sorologia e 8 (2,52%) positivos no teste molecular de *Sybr Green*. O teste molecular de Taqman® não apresentou nenhuma amostra positiva tanto em casos como em contatos.

Tabela 9 - Frequência de positividade e negatividade em casos-índice de hanseníase (n = 56) e em seus contatos (n = 317), com relação à sorologia (anti-PGL1) e testes moleculares para DNA de *M. leprae*.

	Sorologia		Testes moleculares			
	Anti-PGL1		Taqman®		Sybr Green	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo/ Inconclusivo	Positivo	Negativo/ Inconclusivo
Casos (n=56), n (%)	7 (12,5)	49 (87,5)	0 (0)	56 (100)	1 (1,79)	55 (98,21)
Contatos (n=317), n (%)	1 (0,32)	316 (99,68)	0 (0)	317 (100)	8 (2,52)	309 (97,48)

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

A Tabela 10 apresenta os resultados para sorologia e testes moleculares (Taqman®, *Sybr Green* e NATHANS) em 9 casos de hanseníase e em 134 contatos. Quanto aos casos, não foi observado positividade tanto na sorologia como nos testes moleculares. Quanto aos contatos, apenas 1 (0,75) amostra apresentou positividade na sorologia e no teste NATHANS e 4 (2,99%) amostras foram positivas no teste molecular de *Sybr Green*. O teste molecular de Taqman® não apresentou nenhuma amostra positiva.

Tabela 10 - Análise descritiva da frequência de positividade em 9 casos de hanseníase e em 134 contatos com relação à sorologia (anti-PGL1) e testes moleculares para DNA de *M. leprae*, incluindo NATHANS.

	Sorologia		Taqman®		Sybr Green		NATHANS	
	Positiv o	Negativ o	Positiv o	Negativo/ Inconclusiv o	Positiv o	Negativo/ Inconclusiv o	Positiv o	Negativo/ Inconclusiv o
Casos (n = 9) n (%)	0 (0)	9 (100)	0 (0)	9 (100)	0 (0)	9 (100)	0 (0)	9 (100)
Contatos (n=134) , n (%)	1 (0,75)	133 (99,25)	0 (0)	134 (100)	4 (2,99)	130 (97,01)	1 (0,75)	133 (99,25)

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Analizou-se, a seguir, uma possível concordância entre os testes moleculares e sorológicos, calculando-se o índice kappa e realizando-se sua interpretação conforme critérios de Landis & Koch (1977), a saber: coeficiente kappa entre 0,00 e 0,20 (desprezível), entre 0,21 e 0,40 (suave), entre 0,41 e 0,60 (moderada), entre 0,61 e 0,80 (grande), e entre 0,81 e 1,00 (quase perfeita).

Para tornar possível o cálculo do índice kappa, utilizou-se a seguinte interpretação para a **sorologia**: a amostra foi considerada **positiva** quando apresentasse positividade para dois ou mais isotipos de anti-PGL1, **negativa** quando apresentasse 0 isotipos e **inconclusiva** quando apresentasse apenas 1 isotipo de anticorpo.

A testagem de IgG, IgA e IgM anti-PGL1 foi realizada nos 56 casos-índice de hanseníase e em seus 317 contatos.

Entre 317 amostras consideradas negativas pelo teste molecular de Taqman®, 145 delas (39,08%) foram também consideradas negativas (0 isotipos) pela sorologia, entretanto, 181 (48,79%) resultaram em inconclusivas (1 isotipo de anti-PGL1) ou positivas (presença de 2 ou mais isotipos de anti-PGL1; n = 45; 12,13%) pela sorologia (Tabela 11). Não houve nenhuma amostra positiva pelo teste molecular de Taqman®. Uma amostra resultou inconclusiva tanto pelo teste de Taqman® como pela sorologia. A outra amostra inconclusiva pelo teste de Taqman® resultou negativa pela sorologia. Não houve qualquer concordância entre os testes (índice Kappa = 0,001).

Tabela 11 - Análise de concordância entre sorologia anti-PGL1 e testes moleculares de Taqman® para *M. leprae* entre 56 casos-índice de hanseníase e seus 317 contatos. Para efeitos de cálculo do fator kappa, amostras com 0 isotipos de anticorpos foram consideradas negativas, aquelas com 1 isotipo de anticorpo foram consideradas inconclusivas e as que apresentavam 2 ou mais isotipos de anti-PGL1 foram consideradas positivas.

		Sorologia (anti-PGL1)			Total	
		0 isotipos	1 isotipo	2 isotipos		
Taqman®	Negativo	N	145	181	45	371
	Inconclusivo	N	1	1	0	2
	Total	N	146	189	45	373
índice Kappa = 0,001 P = 0,883						

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Entre 342 amostras consideradas negativas pelo teste molecular de *Sybr Green*, 161 delas (47,08%) foram também consideradas negativas pela sorologia, entretanto, 138 (40,35%) resultaram inconclusivas ou positivas ($n = 43$; 12,57%) pela sorologia (Tabela 12). Entre 9 amostras consideradas positivas pelo teste molecular de *Sybr Green*, 5 delas (55,56%) foram consideradas negativas, 3 (33,33%) resultaram em inconclusivas e apenas 1 (11,11%) resultou positiva pela sorologia. Não houve qualquer concordância entre os testes (índice Kappa = -0,0487).

Tabela 12 - Análise de concordância entre sorologia anti-PGL1 e teste molecular de *Sybr Green* para *M. leprae* entre 56 casos-índice de hanseníase e seus 317 contatos. Para efeitos de cálculo do fator kappa, amostras com 0 isotipos de anticorpos foram consideradas negativas, aquelas com 1 isotipo de anticorpo foram consideradas inconclusivas e as que apresentavam 2 ou mais isotipos de anti-PGL1 foram consideradas positivas.

continua

			Sorologia			Total
			0 isotipos	1 isotipo	2 isotipos	
Sybr Green	Negativo	N	161	138	43	342
	Inconclusivo	N	16	5	1	22
	Positivo	N	5	3	1	9
Total		N	182	146	45	373

Tabela 12 - Análise de concordância entre sorologia anti-PGL1 e teste molecular de *Sybr Green* para *M. leprae* entre 56 casos-índice de hanseníase e seus 317 contatos. Para efeitos de cálculo do fator kappa, amostras com 0 isotipos de anticorpos foram consideradas negativas, aquelas com 1 isotipo de anticorpo foram consideradas inconclusivas e as que apresentavam 2 ou mais isotipos de anti-PGL1 foram consideradas positivas.

índice Kappa = -0,0487

P = 0,04

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Houve negatividade para 342 amostras testadas pelas técnicas moleculares de *Sybr Green* e de Taqman® (Tabela 13). Entretanto, entre outras 29 amostras consideradas negativas pelo teste molecular de Taqman®, 21 amostras (72,41%) resultaram inconclusivas e 8 amostras (27,58%) resultaram positivas pelo teste molecular de *Sybr Green*. Entre 2 amostras consideradas inconclusivas pelo teste molecular de Taqman®, 1 também resultou inconclusiva e 1 positiva pelo teste molecular de *Sybr Green*. Não houve qualquer concordância entre os testes (índice Kappa = 0,083; $p < 0,001$).

Tabela 13 - Análise de concordância entre os testes moleculares de *Sybr Green* e de Taqman® para *M. leprae* entre 56 casos-índice de hanseníase e 317 contatos.

			Taqman®		Total
			Negativo	Inconclusivo	
<i>Sybr Green</i>	Negativo	N	342	0	342
	Inconclusivo	N	21	1	22
	Positivo	N	8	1	9
Total		N	371	2	373

índice Kappa = 0,083

$p < 0,001$

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Entre 16 amostras consideradas negativas pela sorologia (0 isotipos de anticorpos), 15 delas (93,75%) foram negativas e 1 positiva (6,25%) pelo teste de NATHANS (Tabela 14). De 100 amostras inconclusivas (presença de 1 isotipo de anticorpos) pela sorologia, todas resultaram negativas pelo teste de NATHANS. As

amostras positivas (com presença de 2 ou mais anticorpos; $n = 27$) pela sorologia foram consideradas negativas pelo teste de NATHANS. Não foi observada qualquer concordância entre os testes (Índice kappa = -0,0085; $p = 0,047$).

Tabela 14 - Análise de concordância entre a sorologia e o teste molecular de NATHANS para *M. leprae* entre 9 casos de hanseníase e 134 contatos. Para efeitos de cálculo do fator kappa, amostras com 0 isotipos de anticorpos foram consideradas negativas, aquelas com 1 isotipo de anticorpo foram consideradas inconclusivas e as que apresentavam 2 ou mais isotipos de anti-PGL1 foram consideradas positivas.

			Sorologia anti-PGL1			Total
			0 isotipos	1 isotipo	2 ou mais isotipos	
NATHANS	Negativo	N	15	100	27	142
	Inconclusivo	N	0	0	0	0
	Positivo	N	1	0	0	1
	Total	N	16	100	27	143
Índice kappa= - 0,0085 p = 0,047						

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Entre 143 amostras testadas pelos testes moleculares NATHANS e Taqman®, 142 delas resultaram negativas por ambos os testes (Tabela 15); uma resultou positiva pelo teste NATHANS, mas inconclusiva no teste de Taqman®. O índice kappa revelou moderada concordância entre os testes ($K = 0,498$; $p < 0,001$).

Tabela 15 - Análise de concordância entre os testes moleculares de NATHANS e Taqman® para *M. leprae* entre 9 casos de hanseníase e 134 contatos. continua

			NATHANS			Total
			Negativo	Inconclusivo	Positivo	
Taqman®	Negativo	N	142	0	0	142
	Inconclusivo	N	0	0	1	1
	Positivo	N	0	0	0	0
	Total	N	142	0	1	143

Tabela 15 - Análise de concordância entre os testes moleculares de NATHANS e Taqman® para *M. leprae* entre 9 casos de hanseníase e 134 contatos. conclusão

índice Kappa = 0,498

P<0,001

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Entre 143 amostras testadas pelos testes moleculares NATHANS e *Sybr Green*, 135 delas resultaram negativas por ambos os testes; uma resultou positiva, também por ambos os testes (Tabela 16). Entre 7 amostras que resultaram negativas pelo teste NATHANS, 3 foram inconclusivas e 4 positivas pelo teste de *Sybr Green*. O índice kappa revelou suave concordância entre os testes ($K = 0,215$; $p < 0,001$).

Uma amostra de contato apresentou positividade nos testes de NATHANS e de *Sybr Green* e resultou inconclusiva pelo Teste de Taqman®. Tratava-se uma jovem de 13 anos de idade, contato intradomiciliar de caso de hanseníase multibacilar. Ela apresentava ausência de alterações clínicas e ausência de anticorpos.

Tabela 16 - Análise de concordância entre os testes moleculares de NATHANS e Taqman® para *M. leprae* entre 9 casos de hanseníase e 134 contatos.

		NATHANS			Total
		Negativo	Inconclusivo	Positivo	
Sybr Green	Negativo	N	135	0	135
	Inconclusivo	N	4	0	0
	Positivo	N	3	0	1
	Total	N	142	0	143

Índice kappa = 0,215

p < 0,001

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

A seguir, alguns parâmetros foram estimados para os testes moleculares, sendo eles especificidade diagnóstica e sensibilidade diagnóstica (SD).

Com o objetivo de se calcular a especificidade diagnóstica, foram analisados os dados obtidos de amostras de contatos sem qualquer alteração clínica (ausência de lesões e ausência de espessamento de nervos) e com ausência de anti-PGL1.

Segundo a tabela 17, 147 amostras de contatos com ausência de alterações clínicas e ausência de anticorpos foram testadas pelos testes de Taqman® e *Sybr Green*, resultando em especificidades diagnósticas de 99,32% para o Teste de Taqman® e de 88,44% para o teste de *Sybr Green*. O teste de NATHANS foi testado em 15 amostras de contatos de hanseníase com ausência de alterações clínicas e ausência de anti-PGL1. Nessas circunstâncias, o teste de NATHANS obteve uma especificidade diagnóstica de 93,33%.

Tabela 17 - Parâmetro de especificidade diagnóstica (ED) para os testes moleculares de Taqman®, *Sybr Green* e NATHANS. Para tanto, foram testadas amostras de contatos de hanseníase sem qualquer alteração clínica (ausência de lesões e ausência de espessamento de nervos) e com ausência de anti-PGL1.

Taqman® (N = 147)			<i>Sybr Green</i> (N = 147)			NATHANS (N = 15)		
Neg	Inc	Pos	Neg	Inc	Pos	Neg	Inc	Pos
(N)	(N)	(N)	(N)	(N)	(N)	(N)	(N)	(N)
146	1	0	130	13	4	14	0	1
ED = 99,32%			ED = 88,44%			ED = 93,33%		

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Com o objetivo de se calcular a sensibilidade diagnóstica, foram analisados os dados obtidos de amostras de casos de hanseníase multibacilar.

Segundo a tabela 18, 42 amostras de casos de hanseníase multibacilar foram testadas pelos testes de Taqman® e *Sybr Green*, resultando em sensibilidades diagnósticas de 0,00% para o Teste de Taqman® e de 2,39% para o teste de *Sybr Green*. O teste de NATHANS foi testado em 9 amostras de casos de hanseníase multibacilar. Devido à amostragem ter sido pequena, o parâmetro de sensibilidade diagnóstica não foi calculado.

Tabela 18 - Parâmetro de sensibilidade diagnóstica (SD) para os testes moleculares de Taqman®, *Sybr Green*. Para tanto, foram testadas amostras de casos de hanseníase multibacilar. Estão mostrados os resultados de 9 amostras testadas pelo teste de NATHANS.

Taqman® (N = 42)			<i>Sybr Green</i> (N = 42)			NATHANS (N = 9)		
Neg	Inc	Pos	Neg	Inc	Pos	Neg	Inc	Pos
(N)	(N)	(N)	(N)	(N)	(N)	(N)	(N)	(N)
42	0	0	40	1	1	9	0	0
SD = 0,00 %			SD= 2,39%			SD= n.c.		

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Obs: n.c. = não calculado.

A seguir, realizou-se um cálculo estimado do valor preditivo positivo do teste de *Sybr Green*, visto ter sido o único teste que obteve o parâmetro de sensibilidade diagnóstica. Assim sendo, tomou-se por base, como exemplo, o número de casos de hanseníase diagnosticados em Santana do Ipanema em 2023, que foi de 28 casos em uma população estimada de 46220 habitantes¹. Considerando-se que a sensibilidade diagnóstica do teste molecular de *Sybr Green* é de 2,39% e que sua especificidade diagnóstica é de 88,4%, estimou-se que nessas circunstâncias o valor preditivo positivo do teste seria de 0,53%.

Não foi possível a realização de cálculos de regressões logísticas para verificar se a forma clínica e o tipo de contato eram preditores do diagnóstico de hanseníase pelos métodos de biologia molecular entre os contatos, uma vez que os testes resultaram negativos para a grande maioria das amostras.

¹ Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/al/santana-do-ipanema/panorama>. Acesso em: 19 dez. 2024.

5 DISCUSSÃO

A hanseníase é uma doença infecciosa ancestral que, ao longo do tempo, perpetua o estigma associado aos pacientes (Maciel, 2018). Esse estigma acarreta sérias repercussões na qualidade de vida, impactando a saúde mental dos indivíduos que enfrentam rejeição social, discriminação, sequelas da doença, preconceito, desafios no ambiente profissional e nas relações sociais e familiares. Além disso, a hanseníase é frequentemente vinculada a deformidades visíveis, ampliando ainda mais o impacto negativo na vida dos afetados (Costa *et al.*, 2022).

O Brasil persiste como um país endêmico, apresentando elevadas taxas de detecção da doença. Mesmo considerando o longo período de incubação do bacilo, ainda é observado o grau 2 de incapacidade física no momento do diagnóstico, o que indica um diagnóstico tardio da doença (Brasil, 2017). Outro ponto preocupante é a presença de crianças e jovens de até 15 anos sendo diagnosticados com hanseníase, um indicativo de que a transmissão está ativa na região. Essas constatações apontam para a necessidade de aprimoramento dos processos de diagnóstico precoce da hanseníase (Brasil, 2024).

O diagnóstico precoce desempenha um papel crucial, principalmente na prevenção de sequelas irreversíveis associadas à hanseníase, as quais podem ocorrer se a intervenção não for rápida. Além disso, a antecipação do diagnóstico contribui significativamente para reduzir a disseminação da doença. Dado que os indivíduos não tratados com carga bacilar elevada são a principal fonte de infecção, liberando o *M. leprae* pelas vias aéreas superiores, o diagnóstico precoce, aliado ao tratamento eficaz, resultaria na diminuição da transmissão e, por conseguinte, poderia eventualmente levar ao controle da doença (Brasil, 2017).

Apesar de existir outros testes auxiliares, o diagnóstico da hanseníase é realizado por meio da avaliação dermatoneurológica (Brasil, 2017). Este método apresenta vários fatores que podem resultar em diagnósticos tardios, sendo o mais significativo o fato de as lesões cutâneas associadas à doença serem frequentemente confundidas com outras condições dermatológicas. Assim, uma identificação eficiente requer conhecimento e experiência por parte dos profissionais de saúde (Neves *et al.*, 2021). Há uma dificuldade adicional no que tange à avaliação em crianças, uma vez que há momentos em que se faz necessária sua participação colaborativa, circunstância que não ocorre principalmente naquelas mais jovens (Barreto *et al.*,

2017).

Há alguns testes subsidiários que auxiliam no diagnóstico, tendo sido eles já mencionados anteriormente, tais como a baciloscopia de raspado intradérmico. Seu problema reside no fato de que, se houver ausência do bacilo, a doença não é descartada, o que torna mais dificultoso o processo de identificação. O mesmo ocorre com a biópsia de lesão. Quanto aos anticorpos anti-PGL1, específicos da hanseníase, podem estar presentes em doentes e em contatos não doentes. Assim como pode haver doentes com ausência de anticorpos, principalmente aqueles com a forma localizada da doença (Brasil, 2022a).

Considerando a via de transmissão, a hanseníase apresenta maior risco em situações de contato prolongado, tornando os indivíduos que compartilham moradia com pacientes um grupo de alto risco (Brasil, 2017). Nesse contexto, uma abordagem eficaz para o diagnóstico precoce é a implementação da busca ativa, que consiste no rastreamento sistemático desses conviventes de casos-índice de hanseníase, independentemente da forma clínica, assim como na educação tanto da comunidade como dos profissionais de saúde (Brasil, 2024).

A busca ativa também inclui a verificação do histórico de vacinação contra a BCG, administrando-se uma dose adicional em casos com registro de apenas uma ou nenhuma vacina, com base no cartão de vacinação ou cicatriz vacinal. Além disso, a avaliação dermatoneurológica dos contatos é realizada com minúcia, visando identificar precocemente os primeiros sintomas da doença (Brasil, 2017).

Um desafio evidente é que, na prática, a avaliação dos contatos se concentra majoritariamente nos contatos intradomiciliares, excluindo uma considerável parcela da população que, embora conviva com o caso-índice, não é submetida à avaliação por não compartilhar a mesma residência. Moura *et al.* (2013) destacaram, em seu estudo, a existência de uma relação significativa entre o surgimento de novos casos em regiões onde casos antigos multibacilares residiam, ressaltando a relevância da avaliação dos contatos peridomiciliares.

Há alguns anos, nosso grupo de pesquisa acompanhou, durante 3 anos seguidos, contatos de pacientes com hanseníase na faixa etária de 4 a 15 anos de idade em Santana do Ipanema (AL) (Nagao-Dias *et al.*, 2019). Aqueles que apresentavam lesões suspeitas e foram diagnosticados com hanseníase durante o período apresentaram uma frequência maior do isotipo IgG, levando-nos a sugerir que se tratava de um marcador precoce da doença. No mesmo trabalho, verificou-se que,

no primeiro ano de acompanhamento, uma criança apresentou positividade de IgA sérica anti-PGL-1, passando a positivar também o isotipo IgG no segundo ano e, por fim, o isotipo IgM. No terceiro ano, apresentou uma discreta lesão hipocrômica com alopecia e foi diagnosticada com hanseníase indeterminada.

Foi realizado um estudo com abordagem transversal com crianças entre 4 e 15 anos de idade em Canindé (CE). Em tal estudo, que veio a se constituir como o primeiro subprojeto do presente trabalho (Albuquerque *et al.*, 2022), verificamos que a associação dos três isotipos conjuntamente, ou seja, IgA, IgG e IgM anti-PGL1, apresentava um alto valor preditivo positivo para a doença.

Conforme as diretrizes do novo Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas (Brasil, 2022a), em situações em que contatos apresentam alterações suspeitas, porém inconclusivas, é realizado o teste rápido para avaliar a presença de anticorpos. O teste rápido adotado pelo Sistema Único de Saúde (SUS) é o ML Flow, um ensaio qualitativo imunocromatográfico que detecta anticorpos IgM anti-PGL1 em amostras de soro ou sangue total (Brasil, 2022a).

Embora, o teste sorológico não possa ser utilizado isoladamente para o diagnóstico da hanseníase, o Ministério da Saúde começa a empregá-lo como teste subsidiário na identificação de contatos de casos confirmados de hanseníase (Brasil, 2022).

Quando os contatos exibem alterações suspeitas, porém inconclusivas, e obtêm um resultado não reagente no teste sorológico, é recomendado encaminhá-los para um centro de atenção especializada. Nesse local, são conduzidos testes adicionais, como a qPCR, a fim de aprofundar a avaliação diagnóstica. O Kit NATHANS representa o teste de biologia molecular utilizado no Sistema Único de Saúde (SUS) e, por ser realizado mediante biópsias de lesões ou nervos (Conitec, 2021), concentra-se predominantemente em indivíduos com lesões ou alterações nos nervos e em contatos de casos confirmados de hanseníase com lesões suspeitas.

Apesar do teste de NATHANS possuir alta especificidade e sensibilidade, ainda permanece a urgência em desenvolver métodos capazes de efetuar diagnósticos precoces, mesmo em indivíduos sem lesão de pele ou nervo espessado. Além disso, há interesse de se utilizar amostras menos invasivas para que o público em geral possa vir a se beneficiar do teste.

Ainda que a presença de DNA de *M. leprae* possa ocorrer em amostras de *swab* nasal em pacientes com hanseníase, sabe-se que o mesmo pode acontecer

entre contatos, ou seja, naqueles que não venham a desenvolver a doença (Araújo *et al.*, 2016). Neste quesito, poderia se reflexionar sobre a viabilidade de seu uso em seguimento de contatos.

Outra possibilidade avaliada foi a utilização de amostras de sangue. A literatura sustenta que a detecção de DNA de *M. leprae* no sangue de contatos possivelmente revela que as bactérias ultrapassaram as barreiras mucosas e estão circunstancialmente na circulação do organismo, uma vez que têm preferência por locais de temperatura mais baixa, como as células da pele (Drutz, Chen, Lu, 1972). A detecção da bactéria no sangue pode indicar um aumento significativo, de até 14,78 vezes, no risco de desenvolver a doença (Reis *et al.*, 2014). Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo validar um método de biologia molecular utilizando DNA extraído de sangue total, buscando desenvolver um teste que possa ser aplicado em contatos intra e peridomiciliares de pacientes com hanseníase.

Qualquer teste laboratorial necessita de uma validação para que haja uma maior eficiência e credibilidade em sua utilização na rotina laboratorial. No caso da PCR, o primeiro passo após a escolha do gene alvo é o desenho do iniciador. Os iniciadores, ou *primers*, são responsáveis pela especificidade do teste molecular, pois eles limitam a sequência do DNA que deve ser replicada (Valones *et al.*, 2009). Cada *primer* deve indicar apenas um sítio de amplificação para a enzima DNA polimerase e, portanto, deve ser complementar apenas in loco da região de interesse. Caso isso não ocorra, produtos de PCR ou amplicons não desejados serão produzidos (Lexa; Horak; Brzobohaty, 2001).

Após realizar uma pesquisa com relação a possíveis alvos de *M. leprae* em artigos acadêmicos buscados em sites como Google Acadêmico, *Pubmed*, *Lilacs* e *Scielo*, foi decidido usar *primers* de 2 regiões, são elas: 16S rRNA (Martinez *et al.*, 2009) e RLEP (Truman *et al.*, 2008). O alvo 16S rRNA foi escolhido por se tratar de uma região conservada entre as espécies do gênero *Mycobacterium*. A região RLEP é uma região específica do *M. leprae* e, por ser uma região de repetição, uma única fita de DNA do bacilo possuiria mais de um local para anelamento dos *primers*.

Como mencionado anteriormente, com relação ao alvo RLEP, decidimos, no presente trabalho, adicionar um par de sequências (ao qual denominou-se RLEPa), além daquele proposto por Truman *et al.* (2008): RLEPb. Para tanto, foi utilizado o programa *Primer Express*® 3.0. A ideia inicial era propor uma sequência adicional que se mostrasse também específica para *M. leprae*, de modo a aumentar a confiabilidade

no teste molecular estabelecido, seja por *Sybr Green* ou Taqman®.

Ao desenhar um *primer*, alguns critérios devem ser obedecidos. O tamanho deve ser por volta de 15 a 30 nucleotídeos, pois *primers* pequenos apresentam baixa especificidade analítica no teste, mas aqueles com sequências grandes podem diminuir a eficiência da PCR. O percentual de guanina-citosina (%GC) deve estar entre 30% e 80% (Rodríguez *et al.*, 2015). Apesar de percentuais maiores oferecerem maior estabilidade ao *primer*, ao mesmo tempo podem causar dificuldades na etapa de desnaturação dos amplicons. Tal fato ocorre porque as bases nitrogenadas guanina e citosina realizam três ligações de hidrogênio, enquanto entre adenina e timina há apenas duas ligações. Dessa forma, quanto maior for a quantidade de guanina ou citosina em um *primer*, maior seria o número de ligações de hidrogênio e, conseqüentemente, mais energia seria necessária para a quebra dessas ligações e dissociação das fitas duplas (Rodríguez *et al.*, 2015).

Foi realizada uma análise dos *primers* e das sondas no BLAST para verificação da especificidade in silico com o *M. leprae*. O BLAST apresenta as 100 sequências com as maiores coberturas de alinhamento, sendo que estas sequências estão presentes no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI). Quanto aos *primers* e sonda do RLEPa e RLEPb, quando alinhados ao BLAST, apresentaram 100% de alinhamento para DNA de *M. leprae*. As curvas de amplificação demonstraram especificidade para DNA de *M. leprae* tanto pelo método de *Sybr Green* (Figura 8), como pelo método de Taqman® (Figura 9). Não houve amplificação para os DNAs das demais micobactérias e outros gêneros de bactérias.

Quanto à sequência 16S rRNA, o BLAST não realizou as análises de escore máximo, cobertura de identidade, valor E com relação à *M. leprae*. Uma possível explicação seria que o sistema escolhe os 100 melhores perfis de alinhamento para realizar análise. Como vimos na Tabela 2, 16S rRNA apresentou 100% de perfil de identidade com *M. tuberculosis* e *Mycobacterium sp.* Isso decorre do fato de que se trata de uma região altamente conservada dentre as micobactérias. Podemos verificar, nas Figuras 8 e 10, que houve amplificação para DNA de *M. leprae* pelo método de *Sybr Green*, utilizando-se como *primer* 16S rRNA, assim como para DNA de outras micobactérias testadas, mas não com outros gêneros de bactérias. No entanto, quando se utilizou a sonda 16S rRNA pelo método de Taqman®, houve amplificação apenas para *M. leprae*, e não para as demais micobactérias.

O corante *Sybr Green* é um fluoróforo que se intercala apenas em fitas

duplas. Desta forma, a cada duplicação de DNA, o corante se intercala, liberando fótons, que são identificados pelo detector de fluorescência do aparelho. Apesar de ter menor custo, o *Sybr Green* tem a grande desvantagem de ser um fluoróforo inespecífico por se ligar em qualquer fita dupla (Arya *et al.*, 2005).

Apesar de ser mais caro quando comparado ao *Sybr Green*, o método Taqman® é mais específico. A sonda de hidrólise é uma sequência de DNA assim como os iniciadores, entretanto, contém um fluoróforo na extremidade 5' e um *quencher* (silenciador) na extremidade 3'. Quando a sonda está intacta, o *quencher* faz com que a emissão de fluorescência seja mínima. No entanto, na presença da sequência complementar, há anelamento com os *primers*. Nessa etapa, a sonda se hibridiza à fita molde de DNA e, em seguida, a um dos *primers*. Desse modo, a Taq polimerase inicia a amplificação da nova fita de DNA no sentido 5'-3' e, durante esse processo, a enzima encontra a sonda que está no sentido 3'-5'. Assim, ela inicia sua função exonucleásica, quebrando a sonda para continuar a formação da nova fita de DNA. Quando os componentes são separados, há liberação do fluoróforo e emissão da fluorescência (Arya *et al.*, 2005).

A proposta de se empregar a sequência 16S rRNA baseou-se no fato de que está presente apenas em micobactérias viáveis e, uma vez que se trata de uma unidade bastante conservada no gênero das micobactérias, poderia assegurar uma sensibilidade maior ao teste.

Uma outra característica importante que deve ser definida durante a validação de um método de PCR é a temperatura de anelamento, uma vez que se a temperatura for muito baixa pode ocorrer a formação de amplificações não específicas (Bornet; Branchard, 2001). As temperaturas de anelamento podem variar muito entre as metodologias, uma vez que, idealmente, devem ser três a cinco graus abaixo da temperatura de dissociação dos *primers* (Gomes; Mendes; Lima, 2012).

A definição de temperatura de dissociação é a temperatura em que uma dada amostra possui metade das suas fitas duplas de DNA na forma dissociada e a outra metade na forma de fita dupla (Morgante; Blawid, 2016). Essa temperatura de dissociação é específica para cada *primer*, pois depende principalmente de dois fatores: seu tamanho e sua sequência de nucleotídeos (Loeffelholz; Dong, 2012; Rodríguez *et al.*, 2015). No presente estudo, as temperaturas de dissociação dos *primers* RLEPa, RLEPb e 16SrRNA foram de 85,0°C, 81,5°C e 82,5°C, respectivamente.

A temperatura de dissociação é fundamental para distinguir os amplicons formados. Ao utilizar um corante intercalante de fita dupla, como o *Sybr Green*, a fluorescência é emitida na presença de qualquer fita dupla, quando o corante está intercalado na estrutura. Dada a falta de especificidade em relação a um amplicon particular, torna-se necessário um método para diferenciar a origem dessa emissão de fluorescência. Esse procedimento de diferenciação é conhecido como Curva de dissociação, uma vez que irá distinguir as temperaturas de dissociação dos amplicons dos *primers* específicos daqueles dos dímeros de *primers* ou de amplicons inespecíficos (Ririe; Rasmussen; Wittwer, 1997; Arya *et al.*, 2005).

A curva de dissociação gera um gráfico de fluorescência em função da temperatura, mas há outra maneira de visualizar esse gráfico, denominada curva do pico de dissociação. A curva do pico de dissociação é formada pela fórmula $(-\Delta R_n)/\Delta \text{Temp}$ em relação à temperatura e, em comparação com a curva de dissociação, oferece a vantagem de eliminar a interferência da temperatura e de qualquer fluorescência não relacionada à amplificação do DNA (Ririe; Rasmussen; Wittwer, 1997). Este gráfico apresenta elevações, chamadas de picos, e cada uma delas representa um amplicon distinto. O ponto no eixo X, correspondente ao pico dessa elevação, é a temperatura de dissociação do amplicon. Se o gráfico de uma reação, com apenas um par de *primers*, exibir apenas um pico ao longo de todo o gráfico, isso indica a produção de apenas um amplicon. No entanto, se houver dois ou mais picos, significa que cada um desses picos representa a temperatura de dissociação de um amplicon diferente, indicando que os *primers* não são específicos (Morgante; Blawid, 2016). Esta observação não ocorreu em nossos testes. Todos apresentaram um único pico de dissociação, específico para cada *primer* empregado.

A visualização de picos em controles negativos, como água, pode indicar contaminação do ambiente da própria água, como também possíveis inespecificidades causadas pelos próprios *primers* (Morgante; Blawid, 2016). Essas inespecificidades acontecem quando os *primers* formam dímero de *primer* ou *hairpin*, podendo diminuir a eficiência ou mesmo inutilizar toda a reação da PCR, pois impede a ligação dos *primers* com a fita molde e, assim, não é possível que a Taq polimerase dê início à amplificação da nova fita de DNA (Rodríguez *et al.*, 2015; Kubista *et al.*, 2006).

Os dímeros de *primers* são formados quando há o anelamento intermolecular entre *primers*. Os *primers* podem se anelar com o mesmo *primer* ou

com um *primer* diferente, sendo chamados de homodímeros e heterodímeros, respectivamente. *Hairpins* acontecem quando há o anelamento intramolecular de um *primer* e ele adquire um formato conhecido como grampo de cabelo. Essas sequências só se tornam um problema quando elas se anelam em temperatura próxima à temperatura de anelamento dos *primers*, impedindo o anelamento dos *primers* à fita molde (Wang; Seed, 2003; Queiroz *et al.*, 2017). Tal ocorrência não foi observada em nossos testes.

No presente estudo, a média de eficiência das curvas padrões no protocolo de *Sybr Green* para RLEPa foi de 102,6%, para RLEPb, de 102,9% e para 16S rRNA, de 101,4%, um pouco acima da faixa considerada ideal, ou seja, entre 90% e 100% (Rodríguez *et al.*, 2015). Quanto ao *slope*, a média foi de -3,264 para RLEPa, -3,258 para RLEPb e -3,296 para 16S rRNA, estando dentro da faixa ideal de -3,100 e -3,600 (Rodríguez *et al.*, 2015). Quanto à linearidade, ou r^2 , a média foi de 0,996 para todos os *primers*, de acordo com o desejável, ou seja, acima de 0,990 (Rodríguez *et al.*, 2015).

Para a validação do método, é necessário também realizar a etapa da curva padrão. Para analisar a curva padrão, é importante observar 3 variáveis: a eficiência da curva (E), a linearidade (r^2) e o *slope* (coeficiente angular da reta). A eficiência de 100% significa que duas cópias são amplificadas por ciclo, o qual está diretamente relacionado com o *slope*. Este representa a inclinação da reta formada pela curva padrão. Idealmente, a curva padrão deve ser realizada em triplicata com uma amostra positiva em diluição seriada, sendo necessário pelo menos 5 concentrações diferentes (Green; Sambrook, 2018).

A média de eficiência das curvas padrões no protocolo de Taqman® para RLEPa foi de 92,8%, para RLEPb, de 98,1% e para 16S rRNA, de 96,8%, dentro da faixa esperada de 90% a 100%. Quanto ao *slope*, a média foi de -3,508 para RLEPa, -3,372 para RLEPb e -3,401 para 16S rRNA, estando dentro da faixa ideal de -3,100 e -3,600. Quanto à linearidade, ou r^2 , a média foi de 0,999 para RLEPa, 0,998 para RLEPb, 0,997 para 16S rRNA, de acordo com o desejável, ou seja, acima de 0,990 (Rodríguez *et al.*, 2015).

Quanto à sensibilidade analítica dos protocolos de *Sybr Green* e Taqman®, os testes para 16S rRNA mostraram-se bem menos sensíveis do que para RLEPa e RLEPb. Foram encontradas as sensibilidades analíticas de 97,66 fg/ μ L para 16S rRNA e de 1,53 fg/ μ L para RLEPa e RLEPb. Nossos testes apresentaram limites de

detecção semelhantes aos encontrados por Martinez *et al.* (2009) e Truman *et al.* (2008), os quais empregaram os alvos 16S rRNA e RLEP. Segundo os autores, os testes apresentaram sensibilidades analíticas de até 100fg para o 16S rRNA e 10fg para o alvo RLEP, respectivamente.

O gráfico da curva de amplificação possui dois valores chamados de *baseline* e *threshold*. O *baseline* é o menor valor de fluorescência que o equipamento consegue detectar. O *threshold* é um valor definido automaticamente pelo programa, como dez vezes o valor do desvio padrão do *baseline*, e fluorescência abaixo desse valor não são consideradas amplificações verdadeiras, sendo chamadas de ruídos. Apesar de ser inicialmente predefinido pelo programa, o *threshold* normalmente é alterado manualmente, sendo definido pela validação do método, e deve estar localizado na fase exponencial. O momento em que a curva passa pelo *threshold* e passa a ser considerada uma amplificação verdadeira é chamado de Ciclo de Quantificação (Cq) (Arya *et al.*, 2005).

Como a leitura da fluorescência é realizada a cada ciclo, a curva pode atravessar o exato valor do *threshold* no eixo Y entre leituras de dois ciclos e, portanto, é possível que o valor de Cq seja um número decimal. O Cq é inversamente proporcional à quantidade inicial de DNA presente na amostra, portanto quanto maior a concentração inicial, menor será o Cq e vice-versa (Arya *et al.*, 2005). O *cut-off* em nosso estudo foi considerado segundo o Cq obtido para cada alvo. Assim sendo, os *cut-off* foram de 36 ciclos para RLEPa, 35,5 ciclos para RLEPb, 35 ciclos para 16S rRNA. Dessa forma, para que a amostra seja considerada positiva, ela deveria apresentar um Cq menor que o *cut-off* do teste. Cq acima do *cut-off* seria considerado indeterminado.

Após a validação dos testes, seguiu-se ao seu emprego para avaliação dos casos-índice de hanseníase e contatos.

Quanto aos casos, foram incluídos tanto aqueles que ainda não haviam iniciado o tratamento, como aqueles que se encontravam em tratamento, assim como aqueles já tratados. Não foi possível selecionar apenas aqueles que não haviam iniciado tratamento devido à pequena amostragem. Também é importante ressaltar que nem todo indivíduo que apresenta hanseníase obrigatoriamente possui espessamento de nervos e, como a equipe não contava com um dermatologista, as crianças não puderam ter o diagnóstico de hanseníase confirmado. Estes foram fatores limitante do estudo.

Quanto ao perfil clínico-demográfico dos contatos, pode-se verificar que 36 entre os 317 contatos (11,4%) avaliados no aspecto dermatoneurológico apresentaram lesões de pele suspeitas. Desses, 5 (1,6%) apresentam nervo espessado.

Inicialmente, comparando-se apenas a sorologia e os testes moleculares de Taqman® e *Sybr Green*, não foi observado similaridade entre as frequências de positividade. Podemos especular que a sorologia e o teste de Taqman® apresentaram frequências similares de positividade, principalmente entre os contatos (0,75% em ambos).

De fato, quando submetemos à análise de concordância entre os testes, verificamos índices Kappa negativos ou próximos a zero, demonstrando uma ausência de correlação entre eles. Os únicos testes que apresentaram alguma concordância entre si foram entre o teste NATHANS com os testes *Sybr Green* e Taqman®, sendo concordâncias moderada e suave, respectivamente.

Santos *et al.* (2018) observaram que a positividade entre contatos que não possuíam lesão ou anticorpos foi de 8,6% (3/35). Se levarmos em conta de que esse dado pudesse ser tratado como valor falso positivo, 0% (0/147) foi encontrado no teste de Taqman®, 2,72% (4/147) foram encontrados no teste de *Sybr Green*, 6,67% (1/15) no teste de NATHANS.

Os mesmos autores encontraram teste molecular positivo em 40,6% (71/175) dos indivíduos entre contatos sem lesão e com sorologia positiva. Para efeitos de comparação, consideramos aqueles que apresentaram sorologia positiva para apenas 1 isotipo de anticorpo. Houve 0% (0/110) de positividade no teste de Taqman®, 2,73% (3/110) no teste de *Sybr Green*, 0% (0/84) no teste de NATHANS.

Em termos de especificidade diagnóstica, foi observado que todos os três testes de biologia molecular apresentaram alta especificidade, sendo o Taqman® o método com maior especificidade (99,32%), seguido do kit NATHANS (93,33%) e, por último, *Sybr Green* (88,44%). Quanto à sensibilidade diagnóstica, apenas foi possível ser calculada para o método de *Sybr Green*, o qual apresentou uma baixa sensibilidade (2,39%).

Embora não tenha uma relevância no presente trabalho de discutir sobre os valores preditivos positivos e negativos dos testes, visto que não foi realizado um estudo de seguimento dos contatos, iremos realizar algumas especulações com base nos valores encontrados.

A partir dos dados obtidos, apenas foi possível obter o valor preditivo positivo para o teste de *Sybr Green*. Entretanto, ele apresentou um valor sofrível de 0,53%.

Os dados revelam a complexidade de quando se trata de comparar os testes moleculares, seja entre os estabelecidos no laboratório, seja com aqueles já disponíveis para diagnóstico. É importante, neste aspecto, ressaltar que o kit NATHANS está aprovado para uso em biópsias de lesão.

O estudo de Gonçalves *et al.* (2023) apresenta uma comparação de diferentes kits comerciais de qPCR para detecção de bactérias causadoras de meningite bacteriana. Esses kits foram comparados com o ensaio molecular *in house* mqPCR/IAL realizado de rotina pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL), o qual é um laboratório de referência para diagnóstico de meningite bacteriana. Foi observado que os três kits comerciais, ALLPLEX™, VIASURE™ e XGE, apresentaram coeficiente Kappa com grande concordância quando utilizada uma amostra de líquido cefalorraquidiano (LCR), sem esses valores de Kappa de 0,796, 0,679 e 0,774, respectivamente. Entretanto, apenas um dos três kits (VIASURE™) testados para soro apresentou concordância quase perfeita ($k = 1,000$) quando comparado com o teste molecular de rotina.

No estudo de Martinez *et al.* (2011), é apresentada a validação do RLEP e do 16S rRNA. A validação foi realizada com amostras de biópsia de pele de casos e indivíduos sem contato com hanseníase. Foi possível observar que a sensibilidade diagnóstica e a especificidade diagnóstica foram de 91,5% e 73,3%, respectivamente. É importante ressaltar que os autores realizaram o estudo com biópsias de pele. Da mesma forma, o kit NATHANS foi estabelecido para biópsias de pele. Para casos paucibacilares, a sua sensibilidade diagnóstica é de 57% (41,1% - 70%), enquanto a especificidade é de 90% (85% - 95%). Já para os multibacilares, a sua sensibilidade diagnóstica é de 80% (70% - 90%), enquanto a especificidade é de 95% (90% - 100%) (Conitec, 2021).

Manta *et al.* (2020) realizaram o ensaio de qPCR em casos e avaliação de positividade utilizando vários kits de extração e diferentes tipos de amostras, dentre eles o sangue total. A qPCR foi realizada utilizando os mesmos *primers* para 16S rRNA que o presente estudo. Foi observado que, para o melhor kit de extração constatado pelo estudo, a positividade em amostras de sangue total dos casos MB e PB foi de 17% e 0%, respectivamente. No estudo de Silva *et al.* (2017), foi realizada uma

validação de dois métodos de PCR para o mesmo alvo, o RLEP. As amostras biológicas escolhidas foram de *swab* nasal e verificou-se que a reação com os primers Ip1 e Ip2 obteve uma sensibilidade de 82,35%, enquanto a especificidade diagnóstica foi de 22,22%. Por outro lado, o método utilizando os *primers* R5 e R6 apresentaram sensibilidade diagnóstica de 46,15% e especificidade diagnóstica de 51,85%.

Por fim, procuramos avaliar se teria algum fator preditor de doença pelos testes moleculares, como tipo de contato e forma clínica do caso-índice. No entanto, não foi possível realizar os testes a partir dos resultados obtidos.

Houve diversos fatores limitantes durante a pesquisa, dentre os quais a ausência de um médico na equipe, a limitação financeira, a gestão dos municípios e a pandemia do COVID-19, que impossibilitou o intuito inicial de realizar um acompanhamento com essas crianças e jovens ao longo de 3 anos.

No presente trabalho, foi possível estabelecer dois métodos moleculares para DNA de *Mycobacterium leprae* que se mostraram sensíveis, específicos e reprodutíveis utilizando três *primers*: RLEPa, RLEPb e 16S rRNA. No entanto, não podemos considerar ainda que, no caso de amostras de sangue total, possam ser utilizados para seguimento de contatos, pois o estudo atual mostrou total discrepância entre os métodos.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como reflexão importante sobre o presente trabalho, observa-se que ocorreram uma série de fatores limitantes relacionados à seleção da casuística, seja entre os contatos, seja entre os casos. Para cálculos dos parâmetros intrínsecos e extrínsecos de validação dos testes seria necessário incluir uma população residente em áreas não endêmicas sabidamente não doentes e casos-índice multibacilares e paucibacilares não tratados em maior número. No entanto, é primordial ressaltar que os métodos para detecção de DNA de *M. leprae* encontram-se estabelecidos, podendo ser futuramente empregados em estudos de pesquisa para validação de seu uso de *swab* nasal, de biópsias e em amostra de sangue, sendo que nesta última pode ser interessante a coleta de mais de uma amostra em momentos diferentes, na tentativa de melhorar a sensibilidade.

7 CONCLUSÕES

Inicialmente, o presente estudo estabeleceu dois métodos de biologia molecular Taqman® e *Sybr Green* para DNA de *Mycobacterium leprae*, apresentando adequadas sensibilidade e especificidade analíticas, além de boa reprodutibilidade, utilizando duas sequências de RLEP e uma de 16S rRNA como iniciadores.

Embora tenha sido possível detectar a presença de *M. leprae* tanto em casos como em contatos, os testes moleculares não apresentaram correlação entre si, tampouco com a sorologia. Houve uma leve concordância entre teste de NATHANS com os testes de Taqman® e *Sybr Green*.

Não foi possível realizar testes para verificar qualquer associação com relação entre os testes moleculares e os contatos menores de 15 anos no que diz respeito a lesões suspeitas, tipo de convívio e forma clínica dos casos-índice.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, S. P. K. *et al.* Measurements and Accuracy of IgM and IgG Anti Phenolic Glycolipid-1 Levels in Blood Serum for Early Detection Mycobacterium leprae by using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA): A Reality of a Laboratory. **Indonesian Journal of Tropical and Infectious Disease**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 133-143, ago. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.20473/ijtid.v11i2.43481>. Acesso em: 08 jan. 2025.
- ADRIATY, D. *et al.* Leprosy Transmission in Endemic and Non-Endemic Areas Based on the Profile of Antibody Response of PGL-1 and PCR Detection of Mycobacterium leprae DNA from Nasal Swab among Healthy Children of East Java, Indonesia. **Infectious Disease Reports**, [s. l.], v. 12, n. 11, p. 8748, jul. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.4081/idr.2020.8748>. Acesso em: 08 jan. 2025.
- ALBERTS, B. **Biologia Molecular da Célula**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. v. 6.
- ALBUQUERQUE, A. A. *et al.* Can anti-PGL-I antibody isotypes differentiate leprosy contacts and leprosy patients? **Pathogens and Global Health**, [s. l.], v. 116, n. 8, p. 477–484, jan. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/20477724.2021.2021045>. Acesso em: 08 jan. 2025.
- ARAUJO, S. *et al.* Molecular Evidence for the Aerial Route of Infection of *Mycobacterium leprae* and the Role of Asymptomatic Carriers in the Persistence of Leprosy. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 63, n. 11, p. 1412–1420, dez. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/cid/ciw570>. Acesso em: 08 jan. 2025.
- ARYA, M. *et al.* Basic principles of real-time quantitative PCR. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 209-219, mar. 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1586/14737159.5.2.209>. Acesso em: 08 jan. 2025.
- BANERJEE, S. *et al.* Multiplex PCR technique could be an alternative approach for early detection of leprosy among close contacts - a pilot study from India. **BMC Infectious Diseases**, [s. l.], v. 10, p. 252, dez. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2334-10-252>. Acesso em: 08 jan. 2025.
- BARRETO, J. G. *et al.* Leprosy in Children. **Current Infectious Disease Reports**, [s. l.], v. 19, n. 6, p. 1-8, jun. 2017. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11908-017-0577-6>. Acesso em: 08 jan. 2025.
- BEISSNER, M. *et al.* Development of a combined RLEP/16S rRNA (RT) qPCR assay for the detection of viable M. leprae from nasal swab samples. **BMC Infectious Diseases**, [s. l.], v. 19, p. 753, dez. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4349-9>. Acesso em: 08 jan. 2025.
- BIOCLIN Fast MK Flow: Kit. Belo Horizonte: Quibasa, 2022. Bula de remédio. Disponível em: https://quibasa.bioclin.com.br/anexos/IUS_BIOCLIN_FAST_ML_FLOW.pdf. Acesso

em: 02 nov. 2023.

BORAH, K. *et al.* GSMN-ML-a genome scale metabolic network reconstruction of the obligate human pathogen mycobacterium leprae. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 14, n. 7, p. 1–20, jul. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007871>. Acesso em: 08 jan. 2025.

BORNET, B.; BRANCHARD, M. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Reproducible and Specific Tools for Genome Fingerprinting. **Plant Molecular Biology**, [s. l.], v. 19, p. 209-215, set. 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF02772892>. Acesso em: 08 jan. 2025.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Indicadores e Dados Básicos de Hanseníase nos Municípios Brasileiros**. Brasília: Ministério da Saúde, 2023. Disponível em: <https://indicadoreshanseniaze.aids.gov.br/front.php>. Acesso em: 30 out. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos estratégicos em Saúde. **Portaria SCTIE/MS nº 84, de 31 de dezembro de 2021**. Torna pública a decisão de incorporar, no âmbito do Sistema Único de Saúde - SUS, o teste rápido imunocromatográfico para determinação qualitativa de anticorpos IgM anti-Mycobacterium leprae para diagnóstico complementar de hanseníase. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 31 dez. 2021. Disponível em: https://www.gov.br/conitec/pt-br/midias/relatorios/portaria/2021/20220103_portaria_84.pdf. Acesso em: 08 jan. 2025.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde, Departamento de Atenção Básica. **Guia para o Controle da hanseníase**. Brasília: Ministério da Saúde, 2002. Disponível em: https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_de_hanseniaze.pdf. Acesso em: 19 out. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde, Departamento de Atenção Básica. **Controle da hanseníase na atenção básica**: guia prático para profissionais da equipe de saúde da família. Brasília: Ministério da Saúde, 2001. Disponível em: https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/hanseniaze_atencao.pdf. Acesso em: 08 jan. 2025.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. Departamento de Doenças Transmissíveis. **Estratégia Nacional para Enfrentamento à Hanseníase 2024-2030**. Brasília: Ministério da Saúde, 2024. Disponível em: http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/estrategia_nacional_enfrentamento_hanseniaze_2024-2030.pdf ISBN 978-65-5993-565-9. Acesso em: 26 set 24.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Hanseníase**. Brasília: Ministério da Saúde, 2022a. Disponível em: https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/protocolo_clinico_diretrizes_terapeutica

s_hanseníase.pdf. Acesso em: 05 out. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico**: Hanseníase. n. Especial. Brasília: Ministério da Saúde, 2021. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/especiais/2021/boletim-hanseníase-_25-01.pdf. Acesso em: 08 jan. 2025.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico** n. Especial. Brasília: Ministério da Saúde, 2022b. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/especiais/2022/boletim-epidemiologico-de-hanseníase-_25-01-2022.pdf. Acesso em: 7 nov. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Guia prático sobre a hanseníase**. Brasília: Ministério da Saúde, 2017. Disponível em: https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_pratico_hanseníase.pdf. Acesso em: 25 nov. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de prevenção de incapacidade**. Brasília: Ministério da Saúde, 2008. Disponível em: https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_prevencao_incapacidades.pdf. Acesso em: 25 nov. 2021.

BRASIL. Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sistema Único De Saúde (CONITEC). **Teste de detecção molecular qualitativa do Mycobacterium leprae para o diagnóstico de hanseníase**. Brasília: Ministério da Saúde, 2021. Disponível em: http://antigo-conitec.saude.gov.br/images/Protocolos/20220726_Relatorio-de-Recomendao-PCDT-da-Hanseníase_-15.07.2022.pdf. Acesso em: 15 jan. 2024.

BRETT, S. J. *et al.* Use of synthetic glycoconjugates containing the Mycobacterium leprae specific and immunodominant epitope of phenolic glycolipid I in the serology of leprosy. **Clinical and experimental immunology**, [s. l.], v. 64, n. 3, p. 476–83, jun. 1986. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2431812/>. Acesso em: 08 jan. 2025.

BRITTON, W. J.; LOCKWOOD, D. N. Leprosy. **The Lancet**, London, v. 363, n. 9416, p. 1209–1219, abr. 2004. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(04\)15952-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(04)15952-7). Acesso em: 08 jan. 2025.

BÜHRER-SÉKULA, S. Sorologia PGL-I na hanseníase. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.], v. 41, suppl 2, p. 3–5, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0037-86822008000700002>. Acesso em: 08 jan. 2025.

CABRAL, P. B. E. *et al.* Anti-PGL1 salivary IgA/IgM, serum IgG/IgM, and nasal Mycobacterium leprae DNA in individuals with household contact with leprosy. **International Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 17, n. 11, p. e1005–e1010,

nov. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2013.05.011>. Acesso em: 08 jan. 2025.

CARDONA-CASTRO, N.; BELTRÁN-ALZATE, J. C.; ROMERO-MONTOYA, M. Clinical, bacteriological and immunological follow-up of household contacts of leprosy patients from a post-elimination area - Antioquia, Colombia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 104, n. 6, p. 935–936, set. 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762009000600021>. Acesso em: 08 jan. 2025.

CEARÁ. Secretaria da Saúde. **Boletim Epidemiológico**: Hanseníase. Fortaleza: Secretaria da Saúde, 2021 janeiro. Disponível em: https://www.saude.ce.gov.br/wp-content/uploads/sites/9/2018/06/BOLETIM_REVISADO_PARA_PUBLICACAO-19-01-2021.pdf. Acesso em: 23 nov. 2021.

CHAVARRO-PORTILLO, B.; SOTO, C. Y.; GUERRERO, M. I. Mycobacterium leprae's evolution and environmental adaptation. **Acta Tropica**, [s. l.], v. 197, p. 105041, set. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105041>. Acesso em: 08 jan. 2025.

COLE, S. T. *et al.* Massive gene decay in the leprosy bacillus. **Nature**, [s. l.], v. 409, n. 6823, p. 1007–1011, fev. 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/35059006>. Acesso em: 08 jan. 2025.

COLE, S. T.; SUPPLY, P.; HONORÉ, N. Repetitive sequences in Mycobacterium leprae and their impact on genome plasticity. **Leprosy review**, [s. l.], v. 72, n. 4, p. 449–461, dez. 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11826481/>. Acesso em: 08 jan. 2025.

COSTA, R. M. P. G. *et al.* Social stigma and mental health impairment in people with leprosy: An integrative review. **Leprosy Review**, Colchester, v. 93, n. 3, p. 254–264, set. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.47276/lr.93.3.254>. Acesso em: 08 jan. 2025.

CUNHA, M. H. C. M. D. **Perfil de anticorpos anti-pgl-1 em indivíduos sadios de áreas endêmicas em hanseníase do estado do Pará, método de Elisa**. 102 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará, Belém, 2012. Disponível em: <https://repositorio.ufpa.br/jspui/handle/2011/6795>. Acesso em: 08 jan. 2025.

DRUTZ, D. J.; CHEN, T. S. N.; LU, W-H. The Continuous Bacteremia of Lepromatous Leprosy. **The New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 287, n. 4, p. 159–164, jul. 1972. Disponível em: <https://doi.org/10.1056/nejm197207272870402>. Acesso em: 08 jan. 2025.

FROES JÚNIOR, L. A. R.; TRINDADE, M. A. B.; SOTTO, M. N. Immunology of leprosy. **International Reviews of Immunology**, [s. l.], v. 41, n. 2, p. 72–83, mar. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/08830185.2020.1851370>. Acesso em: 08 jan. 2025.

GIRARDI, K. do C. de V. *et al.* Phenolic glycolipid-1 of *Mycobacterium leprae* is involved in human Schwann cell line ST8814 neurotoxic phenotype. **Journal of Neurochemistry**, [s. l.], v. 164, n. 2, p. 158–171, jan. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jnc.15722>. Acesso em: 08 jan. 2025.

GOBBO, A. R. *et al.* NDO-BSA, LID-1, and NDO-LID Antibody Responses for Infection and RLEP by Quantitative PCR as a Confirmatory Test for Early Leprosy Diagnosis. **Frontiers in Tropical Diseases**, [s. l.], v. 3, mar. 2022. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/tropical-diseases/articles/10.3389/fitd.2022.850886/full>. Acesso em: 08 jan. 2025.

GOMES, S. O.; MENDES, R. F. de M.; LIMA, P. S. da C. Determinação da temperatura de anelamento com marcadores ISSR em acessos de pinhão-manso. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS, 2., 2012, Belém do Pará. **Anais [...]**. [s. l.]: Sbrg, 2012. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/79027/1/911.pdf>. Acesso em: 19 dez. 2023.

GONÇALVES, M. G. *et al.* Avaliação de kits comerciais baseados em PCR multiplex em tempo real para diagnóstico de meningite bacteriana. **BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista**, São Paulo, v. 20, p. e39209, 2023. Disponível em: <https://periodicos.saude.sp.gov.br/BEPA182/article/view/39209>. Acesso em: 08 jan. 2025.

GOULART, I. M. B.; GOULART, L. R. Leprosy: diagnostic and control challenges for a worldwide disease. **Archives of Dermatological Research**, [s. l.], v. 300, n. 6, p. 269–290, jul. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00403-008-0857-y>. Acesso em: 08 jan. 2025.

GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. Constructing a Standard Curve for Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) Experiments. **Cold Spring Harbor Protocols**, [s. l.] v. 2018, n. 10, out. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095026>. Acesso em: 08 jan. 2025.

JIN, S.-H.; AHN, K. J.; AN, S. Importance of the immune response to *Mycobacterium leprae* in the skin. **Biomedical Dermatology**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 1, dez. 2018. Disponível em: <https://biomeddermatol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s41702-017-0012-5#citeas>. Acesso em: 08 jan. 2025.

JOB, C. K. *et al.* Transmission of Leprosy: A Study of Skin and Nasal Secretions of Household Contacts of Leprosy Patients Using PCR. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 78, n. 3, p. 518–521, mar. 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18337353/>. Acesso em: 08 jan. 2025.

KUBISTA, M. *et al.* The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, [s. l.], v. 27, n. 2-3, p. 95-125, abr. 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16460794/>. Acesso em: 08 jan. 2025.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. An Application of Hierarchical Kappa-type Statistics in

the Assessment of Majority Agreement among Multiple Observer. **Biometrics**, [s. l.], v. 33, n. 2, p. 363-374, jun. 1977. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/2529786?origin=JSTOR-pdf>. Acesso em: 08 jan. 2025.

LASTÓRIA, J. C.; ABREU, M. A. M. M. de. Hanseníase: diagnóstico e tratamento. **Diagnóstico e Tratamento**, [s. l.], v. 17, n. 4, p. 173-179, out. 2012. Disponível em: <https://docs.bvsalud.org/upload/S/1413-9979/2012/v17n4/a3329.pdf>. Acesso em: 08 jan. 2025.

LAVANIA, M. *et al.* Cohort study of the seasonal effect on nasal carriage and the presence of *Mycobacterium leprae* in an endemic area in the general population. **Clinical Microbiology and Infection**, [s. l.], v. 19, n. 10, p. 970–974, out. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23331372/>. Acesso em: 08 jan. 2025.

LEHMAN, L. F. *et al.* **Avaliação neurológica simplificada**. Belo Horizonte: ALM Internacional, 1997.

LEXA, M.; HORAK, J.; BRZOBOHATY, B. Virtual PCR. **Bioinformatics**, Oxford, v. 17, n. 2, p. 192–193, fev. 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.2.192>. Acesso em: 08 jan. 2025.

LOEFFELHOLZ, M.; DONG, J. PCR and its variations. **Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology**, Springer, v. 9781461439707, p. 273–291, jan. 2013. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4614-3970-7_15#citeas. Acesso em: 08 jan. 2025.

LU, X. *et al.* US CDC Real-Time Reverse Transcription PCR Panel for Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 26, n. 8, p. 1654-1665, 2020. Disponível em: https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/26/8/20-1246_article#. Acesso em: 08 jan. 2025.

LYON, S.; GROSSI, M. A. F. **Hanseníase**. Rio de Janeiro: Medbook, 2013.

MACEDO, A. C. de. *et al.* Serum anti-phenolic glycolipid—1 IgA correlates to IgM isotype in leprosy patients: a possible candidate for seroepidemiological surveys?. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, [s. l.], v. 32, n. 3, p. e22276, mar. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28594117/>. Acesso em: 08 jan. 2025.

MACEDO, A. C. de. **Marcadores Sorológicos como Parâmetros de Risco para o Desenvolvimento da Hanseníase**. 2019. 76 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Curso de Biotecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/53472>. Acesso em: 08 jan. 2025.

MACIEIRA, Suzana. **Aspectos microbiológicos do *Mycobacterium leprae***. Noções de Hansenologia. Bauru: Centro de Estudos “Dr. Reynaldo Quagliato”, 2000.

MACIEL, R. M. T. A Lepre no Oriente e Ocidente: da Antiguidade à Idade Média. **Revista Mosaico – Revista de História**, Goiânia, v. 11, n. 2, p. 131-143, ago. 2018.

Disponível em: <https://seer.pucgoias.edu.br/index.php/mosaico/article/view/6388>. Acesso em: 08 jan. 2025.

MANTA, F. S. DE N. *et al.* Ultra-sensitive detection of *Mycobacterium leprae*: DNA extraction and PCR assays. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 14, n. 5, p. e0008325, maio 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008325>. Acesso em: 08 jan. 2025.

MARTINEZ, A. N. *et al.* Evaluation of qPCR-based assays for leprosy diagnosis directly in clinical specimens. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 5, n. 10, p. e1354, out. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001354>. Acesso em: 08 jan. 2025.

MARTINEZ, A. N. *et al.* Molecular determination of *Mycobacterium leprae* viability by use of real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 47, n. 7, p. 2124–2130, maio 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JCM.00512-09>. Acesso em: 08 jan. 2025.

MAYANGSARI, M. A. *et al.* Anti phenolic glycolipid I (PGLI) of salivary IgA/IgM from *Mycobacterium leprosy* for early detection of subclinical leprosy. **Biochemical and Cellular Archives**, [s. l.], v. 20, p. 2963–2969, abr. 2020. Disponível em: https://repository.unair.ac.id/99736/1/15_ANTI%20PHENOLIC%20GLYCOLIPID%20%20%28PGLI%29.pdf. Acesso em: 08 jan. 2025.

MESQUITA JÚNIOR, D. *et al.* Sistema imunitário - parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Revista Brasileira de Reumatologia**, [s. l.], v. 50, n. 5, p. 552–580, out. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0482-50042010000500008>. Acesso em: 08 jan. 2025.

MI, Z.; LIU, H.; ZHANG, F. Advances in the pathogenic, genetic and immunological studies of leprosy. **hLife**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 6-17, out. 2023. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2949928323000159>. Acesso em: 08 jan. 2025.

MILLER, R. A.; GORDER, D.; HARNISCH, J. P. Antibodies to phenolic glycolipid-I during long-term therapy: serial measurements in individual patients. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**: official organ of the International Leprosy Association, v. 55, n. 4, p. 633–636, dez. 1987. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3323367/>. Acesso em: 08 jan. 2025.

MONOT, M. *et al.* Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. **Nature Genetics**, [s. l.], v. 41, p. 1282–1289, dez. 2009. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ng.477#citeas>. Acesso em: 08 jan. 2025.

MONTANHA, J. O. M. *et al.* ML Flow serological test: complementary tool in leprosy. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [s. l.], v. 98, n. 3, p. 331–338, maio 2023. Disponível em: <https://www.anaisdedermatologia.org.br/en-ml-flow-serological-test-complementary-articulo-S0365059623000193>. Acesso em: 08 jan. 2025.

MORGANTE, C. V.; BLAWID, R. Análise da Expressão Gênica pela Técnica de PCR Quantitativa em Tempo Real: Princípios e Fundamentos. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2016. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1066218>. Acesso em: 08. jan. 2025.

MOURA, R. S. de. *et al.* Sorologia da hanseníase utilizando PGL-I: revisão sistemática. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, suppl 2, p. 11–18, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0037-86822008000700004>. Acesso em: 08 jan. 2025.

NAGAO-DIAS, A. T. *et al.* Serum Anti-PGL-1 IgG, IgM, and IgA in a 3-Year Follow-up Study of 4–15-Year-old Leprosy Contacts. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, [s. l.], v. 38, n. 9, p. e193–e198, set. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31220042/>. Acesso em: 08 jan. 2025.

NAHAS, A. A. *et al.* Anti-lipoarabinomannan-specific salivary IgA as prognostic marker for leprosy reactions in patients and cellular immunity in contacts. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 9, n. 1205, maio 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29904387/>. Acesso em: 08 jan. 2025.

NARANG, T.; KUMAR, B. Leprosy in Children. **Indian Journal of Paediatric Dermatology**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 12-24, jan./mar. 2019. Disponível em: https://journals.lww.com/ijpd/fulltext/2019/20010/leprosy_in_children.3.aspx. Acesso em: 08 jan. 2025.

NEVES K. V. R. N. *et al.* Misdiagnosis of leprosy in Brazil in the period 2003 - 2017: spatial pattern and associated factors. **Acta Tropica**, [s. l.], v. 215, p. 105791, mar. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33310076/>. Acesso em: 08 jan. 2025.

NG, V. *et al.* Role of the Cell Wall Phenolic Glycolipid-1 in the Peripheral Nerve Predilection of Mycobacterium leprae. **Cell**, [s. l.], v. 103, n. 3, p. 511–524, out. 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11081637/>. Acesso em: 08 jan. 2025.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. Uma Inovação tecnológica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, [s. l.], v. 33, p. 10–13, jul./dez. 2004. Disponível em: <https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4355693/course/section/2085886/real%20time%20pcr%20basico.pdf>. Acesso em: 08 jan. 2025.

OMS. **Leprosy (Hansen's disease)**. Genebra: Organização Mundial da Saúde, 2023. Disponível em: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/topics/leprosy-hansens-disease>. Acesso em: 15 nov. 2023.

OMS. Organização Mundial da Saúde. **Diretrizes para o diagnóstico, tratamento e prevenção da hanseníase**. Nova Deli: Organização Mundial da Saúde, 2017. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/274127/9789290227076-por.pdf>.

Acesso em: 08 jan. 2025.

OMS. Organização Mundial da Saúde. **Estratégia Global de Hanseníase 2021–2030 “Rumo à zero hanseníase”**. Nova Delhi: Organização Mundial da Saúde, 2021a. Disponível em: <https://www.who.int/pt/publications/i/item/9789290228509>. Acesso em: 23 nov. 2021.

OMS. Organização Mundial da Saúde. **Estratégia Global para Hanseníase 2016–2020: Aceleração rumo a um mundo sem hanseníase**. Genebra: Organização Mundial da Saúde, 2016. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/208824/9789290225201-pt.pdf?sequence=17>. Acesso em: 23 nov. 2021.

OMS. Organização Mundial da Saúde. Global leprosy (Hansen disease) update, 2020: impact of COVID-19 on global leprosy control. **Weekly epidemiological record**, n. 36, p. 421–444, set. 2021b. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/who-wer9636-421-444>. Acesso em 23 nov. 2021.

OMS. Organização Mundial da Saúde. **Leprosy - Number of new leprosy cases with G2D among children (less than 15 years of age)**. Genebra: Organização Mundial da Saúde, 2021c. Disponível em: [https://www.who.int/data/gho/data/indicators/indicator-details/GHO/leprosy---number-of-new-child-\(less-than-15-years-of-age\)-cases-detected-with-g2d](https://www.who.int/data/gho/data/indicators/indicator-details/GHO/leprosy---number-of-new-child-(less-than-15-years-of-age)-cases-detected-with-g2d). Acesso em: 28 nov. 2021.

OMS. Organização Mundial da Saúde. **Leprosy/Hansen’ Disease: Management of reactions and prevention of disabilities. Technical guidance**. Nova Delhi: Organização Mundial da Saúde, 2020a. Disponível em: <https://www.who.int/pt/publications/i/item/9789290227595>. Acesso em: 23 nov. 2021.

PATHAK, V. K. *et al.* Utility of multiplex PCR for early diagnosis and household contact surveillance for leprosy. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, [s. l.], v. 95, n. 3, p. 114855, nov. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31285121/>. Acesso em: 08 jan. 2025.

PENNA, M. L. F. *et al.* Anti-PGL-1 Positivity as a Risk Marker for the Development of Leprosy among Contacts of Leprosy Cases: Systematic Review and Meta-analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 10, n. 5, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27192199/>. Acesso em: 08 jan. 2025.

PIMENTEL, L. dos S. *et al.* Aspectos imunopatogênicos, clínicos e farmacológicos da hanseníase: uma revisão de literatura. **Revista Ciências da Saúde**, São Luís, v. 20, n. 2, p. 33–40, 2018. Disponível em: <https://periodicoseletronicos.ufma.br/index.php/rcisaude/article/download/10101/9397/52217>. Acesso em: 08 jan. 2025.

QUEIROZ, J. A. da S. *et al.* Desenho e Validação de Primers In Silico para Detecção do Vírus Sincicial Respiratório Humano. **REVISTA FIMCA**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 17–30, jan. 2017. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/32950>. Acesso em:

08 jan. 2025.

REIS, E. M. *et al.* Mycobacterium leprae DNA in peripheral blood may indicate a bacilli migration route and high-risk for leprosy onset. **Clinical Microbiology and Infection**: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, [s. l.], v. 20, n. 5, p. 447–452, maio 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24033793/>. Acesso em: 08 jan. 2025.

RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases**: official organ of the International Leprosy Association, [s. l.], v. 34, n. 3, p. 255–73, 1966. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5950347/>. Acesso em: 08 jan. 2025.

RIRIE, K. M.; RASMUSSEN, R. P.; WITTEWER, C. T. Product Differentiation by Analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 245, n. 2, p. 154–160, fev. 1997. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9056205/>. Acesso em: 08 jan. 2025.

RODRIGUES, L. C.; LOCKWOOD, D. N. Leprosy now: epidemiology, progress, challenges, and research gaps. **The Lancet Infectious Diseases**, [s. l.], v. 11, n. 6, p. 464–470, jun. 2011. Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099\(11\)70006-8/abstract](https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(11)70006-8/abstract). Acesso em: 08 jan. 2025.

RODRÍGUEZ, A. *et al.* Design of primers and probes for quantitative real-time PCR methods. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 1275, p. 31–56, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25697650/>. Acesso em: 08 jan. 2025.

SAGICA, T. dos P. *et al.* Avaliação dermatoneurológica e sorológica em contatos de hanseníase menores de quinze anos de área endêmica. **Hansenologia Internationalis**: hanseníase e outras doenças infecciosas, Bauru, v. 43, p. 1–12, set. 2020. Disponível em: <https://periodicos.saude.sp.gov.br/hansenologia/article/view/34603>. Acesso em: 08 jan. 2025.

SALGADO, C. G. *et al.* What do we actually know about leprosy worldwide?. **The Lancet Infectious Diseases**, [s. l.], v. 16, n. 7, p. 778, jul. 2016. Disponível em: <https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099%2816%2930090-1/fulltext>. Acesso em: 08 jan. 2025.

SANTOS, D. F. dos. *et al.* Molecular, immunological and neurophysiological evaluations for early diagnosis of neural impairment in seropositive leprosy household contacts. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 12, n. 5, p. e0006494, maio 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29782495/>. Acesso em: 08 jan. 2025.

SCOLLARD, D. M. *et al.* The Continuing Challenges of Leprosy. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 338–381, abr. 2006. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16614253/>. Acesso em: 08 jan. 2025.

SILVA, A. R. *et al.* Evaluation of agreement between tests for the diagnosis of leprosy. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 53, n. 2, p. 100-107, mar./abr. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.5935/1676-2444.20170014>. Acesso em: 08 jan. 2025.

SILVA, C. A. M. *et al.* Interaction of *Mycobacterium leprae* with Human Airway Epithelial Cells: Adherence, Entry, Survival, and Identification of Potential Adhesins by Surface Proteome Analysis. **Infection and immunity**, [s. l.], v. 81, n. 7, p. 2645-2659, jul. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23670556/>. Acesso em: 08 jan. 2025.

SILVA, R. C. da. *et al.* Correlation between ELISA and ML Flow assays applied to 60 Brazilian patients affected by leprosy. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 104, n. 8, p. 546–550, ago. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2010.05.001>. Acesso em: 08 jan. 2025.

SILVA, R. C. Tratamento da Hanseníase. *In*: LYON, S.; GROSSI M. A. F. **Hanseníase**. Rio de Janeiro: MedBook, 2013. p. 199-206.

SINGH, A. K.; BISHAI, W. R. Partners in Crime: Phenolic Glycolipids and Macrophages. **Trends in Molecular Medicine**, [s. l.], v. 23, n. 11, p. 981–983, nov. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28969977/>. Acesso em: 08 jan. 2025.

SINGH, P.; COLE, S. T. *Mycobacterium leprae*: Genes, pseudogenes and genetic diversity. **Future Microbiology**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 57-71, jan. 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21162636/>. Acesso em: 08 jan. 2025.

SINHA, S. *et al.* Utility of serodiagnostic tests for leprosy: a study in an endemic population in South India. **Leprosy review**, [s. l.], v. 75, n. 3, p. 266–273, set. 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15508903/>. Acesso em: 08 jan. 2025.

SPENCER, J. S.; BRENNAN, P. J. The role of *Mycobacterium leprae* phenolic glycolipid I (PGL-I) in serodiagnosis and in the pathogenesis of leprosy. **Leprosy Review**, [s. l.], v. 82, n. 4, p. 344–357, dez. 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22439275/>. Acesso em: 08 jan. 2025.

SPIERINGS, E. *et al.* *Mycobacterium leprae*-Specific, HLA Class II-Restricted Killing of Human Schwann Cells by CD4⁺ Th1 Cells: A Novel Immunopathogenic Mechanism of Nerve Damage in Leprosy. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 166, n. 10, p. 5883–5888, maio 2001. Disponível em: <https://journals.aai.org/jimmunol/article/166/10/5883/33297/Mycobacterium-leprae-Specific-HLA-Class-II>. Acesso em: 08 jan. 2025.

TAMAY DE DIOS, L.; IBARRA, C.; VELASQUILLO, C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. **Investigación en**

Discapacidad, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 70–78, 2013. Disponível em: <https://www.medigraphic.com/pdfs/invdiss/ir-2013/ir132d.pdf>. Acesso em: 08 jan. 2025.

TIÓ-COMA, M. *et al.* Genomic Characterization of *Mycobacterium leprae* to Explore Transmission Patterns Identifies New Subtype in Bangladesh. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 11, p. 1-14, jun. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01220>. Acesso em: 08 jan. 2025.

TRUMAN, R. W. *et al.* Enumeration of *Mycobacterium leprae* Using Real-Time PCR. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 2, n. 11, p. e328, nov. 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18982056/>. Acesso em: 08 jan. 2025.

TURANKAR, R. P. *et al.* Comparative evaluation of PCR amplification of RLEP, 16S rRNA, rpoT and Sod A gene targets for detection of *M. leprae* DNA from clinical and environmental samples. **International Journal of Mycobacteriology**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 54–59, mar. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26655199/>. Acesso em: 08 jan. 2025.

VALONES, M. A. A. *et al.* Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 40, n. 1, p. 1–11, mar. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822009000100001>. Acesso em: 08 jan. 2025.

VIEIRA D. P. **Técnicas de PCR**: Aplicações e Padronização de Reações. [s. l.], 2002. Disponível em: <http://www.etall.hpg.com.br/>. Acesso em: 08 jan. 2025.

WANG, X.; SEED, B. A PCR primer bank for quantitative gene expression analysis. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 31, n. 24, p. e154, dez. 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14654707/>. Acesso em: 08 jan. 2025.

APÊNDICE A – QUESTIONÁRIO DO CONTATO

Questionário do Contato

* Required

Latitude

Your answer

Longitude

Your answer

Numero de contatos na mesma casa

Your answer

Nome do contato 1 *

Your answer

Data de nascimento contato 1 *

Date

▼

Cidade 1 *

Your answer

Nome do Contato 2

Your answer

Data de nascimento 2

Date

▼

Cidade 2

Your answer

Nome do Contato 3

Your answer

Data de nascimento 3

Date

Cidade 3

Your answer

Código do Contato

Your answer

Logradouro

Your answer

Número

Your answer

Bairro

Your answer

Telefone

Your answer

Nome do Agente de Saúde *

Your answer

Next

Questionário do Contato

Contato com o caso índice

Você conhece alguém que teve ou tem hanseníase?

- ☐ Sim
- ☐ Não

Nome do caso índice (fornecido pelo SINAN)

Your answer _____

Forma clínica do caso índice

- ☐ Paucibacilar
- ☐ Multibacilar
- ☐ Não mencionado na ficha do SINAN

Tipo de contato com o caso índice

- ☐ Pai/mãe
- ☐ filho/filha
- ☐ irmão/irmã
- ☐ sobrinho (a) /tio (a)
- ☐ vizinho
- ☐ amigo
- ☐ Neto (a)
- ☐ Primo (a)
- ☐ Other: _____

Tipo de contato

-  ☐ intradomiciliar

Tipo de contato

☐ intradomiciliar

☐ peridomiciliar

Frequência de contato

☐ diária

☐ semanal

☐ esporádica

Distância, em número de casas (ou em metros) do caso índice

Your answer

Observações

Your answer

Back

Submit

APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM

DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Eu, _____, aceito que _____, menor sob minha responsabilidade, está sendo convidado para participar da pesquisa **Detecção precoce de casos de hanseníase entre jovens abaixo de 15 anos de idade através do auxílio de marcadores imunológicos e moleculares**, sobre análise de anticorpos no sangue e na saliva contra a bactéria causadora da hanseníase e verificar se ela está presente na saliva e no sangue. Esta análise será realizada uma vez por ano durante 3 anos. Este estudo é importante para quem mora com uma pessoa que tem hanseníase e vai ser importante para ver se ele (a) tem risco de desenvolver a doença. Aceito também responder a um questionário relacionado a ele (a), nossos familiares e ao paciente com quem moramos. Estou de acordo que no momento da coleta, ele (a) seja examinado (a) para se verificar se não tem nenhuma mancha suspeita. Serão coletados saliva (1 mL), sangue (2 tubos com 3 mL cada). Na coleta de sangue, ele (a) poderá sentir uma leve dor por causa da picada da agulha. Todos os procedimentos serão realizados por pessoas capacitadas.

Caso algum resultado esteja alterado, ele (a) será encaminhado (a) para o posto de saúde.

I. Quais os benefícios e riscos que terei se eu aceitar que ele (a) participe do estudo?

Como benefício, ele (a) terá oportunidade de ser acompanhado (a) durante 3 anos clínica e laboratorialmente para avaliar se ele (a) adquiriu ou não a doença. Com isto, ele (a) porá ajudar outras pessoas que se encontram nas mesmas condições do que ele (a). Durante o estudo, iremos provar se os testes laboratoriais ajudam ou não a detectar precocemente a doença. Se conseguirmos provar que há uma estreita associação entre a positividade dos parâmetros imunológicos e/ou moleculares e associação com o risco de desenvolvimento da hanseníase, será um grande benefício para o menor e para outros jovens e crianças.

Riscos da realização dos testes: Todos os procedimentos serão realizados por profissionais habilitados, com registros em seus respectivos conselhos e obedecerão as normas técnicas vigentes de coleta de amostras biológicas. Contudo alguns desconfortos poderão ser sentidos durante a coleta de sangue, dor leve no momento do procedimento de (garrote) e punção venosa poderá ser sentida. Garantimos que em nenhum momento haverá risco para do participante contaminar-se com qualquer doença.

II. Quando ele (a) não pode participar do estudo?

Não há contra-indicações para ele (a) participar do estudo

Nós, pesquisadores, garantimos que:

- ❖ Os resultados obtidos durante este estudo serão divulgados sob a forma de relatórios, resumos, publicações científicas e o grupo de pesquisa não divulgará a identidade dos participantes.
- ❖ Os dados dos participantes serão mantidos sob sigilo. No final da pesquisa ou mesmo durante a pesquisa, caso seja necessário, os participantes poderão ter acesso aos resultados individuais.
- ❖ É garantida a liberdade da retirada do consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento à Instituição.

- ❖ É garantido o direito de se manter atualizado sobre resultados parciais da pesquisa, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam de conhecimento dos pesquisadores.
- ❖ Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames laboratoriais. Não há compensação financeira relacionada à sua participação.
- ❖ A qualquer momento você poderá recusar a participação do menor sob sua responsabilidade.
- ❖ Você receberá uma via do TCLE, caso seja desejado.
- ❖ A entrevista será de aproximadamente 15 minutos e conterá 10 perguntas simples.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim sobre o estudo acima. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente que o menor sob minha responsabilidade participe deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

COM QUEM DEVO FALAR SE EU TIVER DÚVIDAS?

Caso tenha perguntas ou dúvidas gerais sobre esta pesquisa ou quaisquer queixas relacionadas à pesquisa, você poderá falar com a coordenadora do projeto (Profª Aparecida Tiemi Nagao-Dias, telefone 85-3366.8270 ou 85-999618435, Universidade Federal do Ceará – Rua Capitão Francisco Pedro, 1210).

Cidade		Data da assinatura do termo	
Nome do responsável			

		Impressão digital do responsável

Assinatura da pessoa que aplicou o termo	Assinatura de aceitação do responsável

ATENÇÃO: Se você tiver alguma consideração ou dúvida, sobre a sua participação na pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFC/PROPESQ, Rua Coronel Nunes de Melo, 1000 – Rodolfo Teófilo, fone: 3366-8344/46. (Horário: 08:00-12:00 horas de segunda a sexta-feira). O CEP/UFC/PROPESQ é a instância da Universidade Federal do Ceará responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos. Att., CEP/UFC/PROPESQ (85) 33668344/8346

APÊNDICE C – TERMO DE ASSENTIMENTO



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM

DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS

Termo de Assentimento para Sujeitos de 08 a 15 anos de idade completos

Título do estudo: Detecção precoce de casos de hanseníase entre jovens abaixo de 15 anos de idade através do auxílio de marcadores imunológicos e moleculares.

Eu, _____, aceito participar da pesquisa sobre análise de anticorpos no sangue e na saliva contra a bactéria causadora da hanseníase e verificar se ela está presente na saliva e no sangue. Esta análise será realizada anualmente por 3 anos. Este estudo é importante para quem mora com uma pessoa que tem hanseníase e vai ser importante para ver se tenho risco de desenvolver a doença. Meus responsáveis já estão informados sobre o conteúdo da pesquisa. Aceito também responder a um questionário relacionado a mim, meus familiares e ao paciente com quem moro. Estou de acordo que no momento da coleta, eu seja examinado para se verificar se não tenho nenhuma mancha suspeita e dormência. Serão coletados saliva (1 mL) e sangue (2 tubos com 3 mL cada). Na coleta de sangue, poderei sentir uma leve dor por causa da picada da agulha. Todos os procedimentos serão realizados por pessoas capacitadas.

Caso algum resultado esteja alterado, você será encaminhado para o posto de saúde.

I. Quais os benefícios e riscos que terei se eu aceitar participar do estudo?

Como benefício, você terá a oportunidade de ser acompanhado durante 3 anos clínica e laboratorialmente para avaliar se você adquiriu ou não a doença. Com isto, você poderá ajudar outras pessoas que se encontram nas mesmas condições do que você. Durante o estudo, iremos provar se os testes laboratoriais ajudam ou não a detectar precocemente a doença. Se conseguirmos provar que há uma estreita associação entre a positividade dos parâmetros imunológicos e/ou moleculares e associação com o risco de desenvolvimento da hanseníase, será um grande benefício para o menor e para outros jovens e crianças.

Riscos da realização dos testes: Todos os procedimentos serão realizados por profissionais habilitados, com registro em seus respectivos conselhos e obedecerão as normas técnicas vigentes de coleta de amostras biológicas. Contudo alguns desconfortos poderão ser sentidos durante a coleta de sangue, dor leve no momento do procedimento de (garrote) e punção venosa poderá ser sentida. Garantimos que em nenhum momento haverá risco para do participante contaminar-se com qualquer doença.

II. Quando não posso participar do estudo?

Não há contra-indicações para você participar do estudo

Nós, pesquisadores, garantimos que:

- ❖ Os resultados obtidos durante este estudo serão divulgados sob a forma de relatórios, resumos, publicações científicas e o grupo de pesquisa não divulgará a identidade dos participantes.
- ❖ Os dados dos participantes serão mantidos sob sigilo. No final da pesquisa ou mesmo durante a pesquisa, caso seja necessário, os participantes poderão ter acesso aos resultados individuais.
- ❖ É garantida a liberdade da retirada do consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento à Instituição.
- ❖ É garantido o direito de se manter atualizado sobre resultados parciais da pesquisa, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam de conhecimento dos pesquisadores.
- ❖ Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames laboratoriais. Não há compensação financeira relacionada à sua participação.
- ❖ Você é livre para decidir se participará ou não. Se você não quiser participar não vai ter nenhum problema e você continuará seu acompanhamento na sua Unidade de Saúde do mesmo modo. Se você

aceitar participar, você poderá voltar atrás e desistir de realizar as coletas das amostras sequenciais a qualquer momento.

- ❖ A qualquer momento você poderá recusar sua participação.
- ❖ Você receberá uma via do termo de assentimento, caso seja desejado.
- ❖ A entrevista será de aproximadamente 15 minutos e conterá 10 perguntas simples.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim sobre o estudo acima. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

COM QUEM DEVO FALAR SE EU TIVER DÚVIDAS?

Caso tenha perguntas ou dúvidas gerais sobre esta pesquisa ou quaisquer queixas relacionadas à pesquisa, você poderá falar com a coordenadora do projeto (Profª Aparecida Tiemi Nagao-Dias, telefone 85-3366.8270 ou 85-999618435, Universidade Federal do Ceará – Rua Capitão Francisco Pedro, 1210).

Cidade		Data do preenchimento	
Nome do participante			
Assinatura de aceitação do participante			Impressão digital do participante
Assinatura da pessoa que aplicou o termo			Impressão digital do responsável

ATENÇÃO: Se você tiver alguma consideração ou dúvida, sobre a sua participação na pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFC/PROPESQ, Rua Coronel Nunes de Melo, 1000 – Rodolfo Teófilo, fone: 3366-8344/46. (Horário: 08:00-12:00 horas de segunda a sexta-feira). O CEP/UFC/PROPESQ é a instância da Universidade Federal do Ceará responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos. Att., CEP/UFC/PROPESQ (85) 33668344/8346

APÊNDICE D – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
CEARÁ/ PROPESQ



Continuação do Parecer: 532.850

positividade para M. lepromatosis nas amostras positivas de PCR; Realizar seguimento clinico-laboratorial anual dos contatos durante dois anos; Associar os parâmetros laboratoriais com o desenvolvimento da doença.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Risco: desconforto das coletas de sangue da mucosa nasal.

Benefício: Os testes realizados poderão avaliar o risco de aquisição da doença entre os contatos de portadores de hanseníase.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um estudo prospectivo de coorte em um período de seguimento de dois anos após o ingresso no estudo com contatos de portadores de hanseníase com as formas clínicas paucibacilar ou multibacilar abaixo de 15 anos de idade notificados nos últimos três anos, cujos responsáveis consentam em que participem do estudo. Foram selecionados os municípios onde as equipes estarão devidamente capacitadas para realizar exames dermatoneurológico (com objetivo de se realizar busca ativa de hanseníase entre os contatos intradomiciliares abaixo de 15 anos de idade). Dentro desses critérios, foram eleitas quatro cidades em Alagoas, ou seja, Rio Largo, Santana de Ipanema, Arapiraca, onde o grau de endemidade é considerado alto ou hiperendêmico e uma cidade no Ceará, Itaitinga (hiperendêmico).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados adequadamente: carta de encaminhamento, folha de rosto, currículo do pesquisador, anuência dos pesquisadores, cronograma, orçamento, anuência dos municípios, ref. O TCLE e termo de assentimento.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não se aplica.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1127

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-270

UF: CE **Município:** FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

Fax: (85)3223-2903

E-mail: comepe@ufc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
CEARÁ/ PROPESQ



Continuação do Parecer: 532.850

FORTALEZA, 18 de Fevereiro de 2014

Assinador por:
FERNANDO ANTONIO FROTA BEZERRA
(Coordenador)

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1127

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-270

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

Fax: (85)3223-2903

E-mail: comepe@ufc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
CEARÁ/ PROPESQ



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Detecção precoce de casos de hanseníase entre jovens abaixo de 15 anos de idade residentes em municípios de Alagoas e Itaitinga, CE.

Pesquisador: Aparecida Tiemi Nagao Dias

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 11709213.9.0000.5054

Instituição Proponente: Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 532.850

Data da Relatoria: 18/02/2014

Apresentação do Projeto:

o presente projeto visa realizar um estudo prospectivo a partir de contatos abaixo de 15 anos de idade, durante dois anos a partir do ingresso no projeto, com objetivo de se associar os parâmetros imunológicos e/ou moleculares com o risco de desenvolvimento da doença. A escolha dos municípios foi feita com base em apoio técnico e logístico oferecido pelos serviços de saúde locais.

Objetivo da Pesquisa:

Geral: Avaliar o risco de aquisição da doença entre contatos de portadores de hanseníase abaixo de 15 anos de idade através de parâmetros clínicos, imunológicos e moleculares diagnosticados nos últimos três anos em municípios de Alagoas e em Itaitinga, CE.

Específicos: Avaliar o perfil clínico e demográfico dos casos de hanseníase nos municípios diagnosticados nos últimos três anos nos municípios; Realizar exame dermatoneurológico nos contatos intradomiciliares abaixo de 15 anos de idade dos casos identificados; Avaliar a frequência de positividade de anticorpos séricos IgA, IgG e IgM anti-PGL1 entre os contatos e casos índices; Avaliar a frequência de positividade de anticorpos salivares IgA e IgM anti-PGL1 entre os contatos e casos índices; Avaliar a frequência de positividade de DNA de Mycobacterium leprae em amostras de swab nasal e de sangue dos contatos e casos índices; Avaliar a presença de

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1127

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-270

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

Fax: (85)3223-2903

E-mail: comepe@ufc.br

APÊNDICE E – EMENTA DO PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA

UFC - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ /



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Detecção precoce de casos de hanseníase entre jovens abaixo de 15 anos de idade através do auxílio de marcadores imunológicos e moleculares

Pesquisador: Aparecida Tiemi Nagao Dias

Área Temática:

Versão: 8

CAAE: 11709213.9.0000.5054

Instituição Proponente: Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.729.159

Apresentação do Projeto:

A referida emenda tem por finalidade a inclusão do município de Canindé, Ceará, no estudo. O projeto foi alterado com a inclusão do município.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo da emenda:

Inclusão do município de Canindé, como mais um local de realização da pesquisa.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Todos os procedimentos serão realizados por profissionais habilitados, com registro em seus respectivos conselhos e obedecerão as normas técnicas vigentes de coleta de amostras biológicas. Contudo alguns desconfortos poderão ser sentidos durante a coleta da amostra da mucosa nasal a ser realizada com um cotonete esterilizado (swab). Durante a coleta de sangue, dor leve no momento do procedimento de “garrote” e punção venosa poderá ser sentida. Garantimos que em nenhum momento haverá risco para do participante contaminar-se com qualquer doença.

Benefícios:

Se conseguirmos provar que há uma estreita associação entre a positividade dos parâmetros imunológicos e/ou moleculares e associação com o risco de desenvolvimento da hanseníase, acreditamos que será uma importante contribuição para as políticas públicas de saúde, pois o

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

CEP: 60.430-275

E-mail: comepe@ufc.br

Continuação do Parecer: 3.729.159

custo de um paciente diagnosticado tardiamente para o Estado é enorme, além do prejuízo de qualidade de vida que o indivíduo terá de forma permanente. Os parâmetros propostos no presente estudo caso se demonstrem aplicáveis e de significância, o seu conhecimento tecnológico poderá ser repassado para os laboratórios do Estado, como os LACENs.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A referida emenda tem por finalidade a inclusão do município de Canindé, Ceará, no estudo. O projeto foi alterado com a inclusão do município.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foi devidamente anexado:

cartacomiteeticanovembro04112019.pdf

projetomodificado01112019.pdf

Cronogramaatualizado01112019.pdf

declaracaocaninde.pdf

cartacomiteeticanovembro20112019.pdf

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não se aplica.

Considerações Finais a critério do CEP:

A pesquisadora deve enviar o relatório final ao concluir a pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1463694_E3.pdf	20/11/2019 16:53:36		Aceito
Outros	cartacomiteeticanovembro20112019.pdf	20/11/2019 16:52:42	Aparecida Tiemi Nagao Dias	Aceito
Outros	cartacomiteeticanovembro04112019.pdf	04/11/2019 11:37:51	Aparecida Tiemi Nagao Dias	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetomodificado01112019.pdf	01/11/2019 12:40:44	Aparecida Tiemi Nagao Dias	Aceito
Cronograma	Cronogramaatualizado01112019.pdf	01/11/2019 12:40:12	Aparecida Tiemi Nagao Dias	Aceito
Declaração de Instituição e	declaracaocaninde.pdf	01/11/2019 10:50:05	Aparecida Tiemi Nagao Dias	Aceito

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-275

UF: CE **Município:** FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

E-mail: comepe@ufc.br

UFC - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ /



Continuação do Parecer: 3.729.159

Infraestrutura	declaracaocaninde.pdf	01/11/2019 10:50:05	Aparecida Tiemi Nagao Dias	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	concordanciasaogoncalo.jpg	18/10/2018 11:19:53	Aparecida Tiemi Nagao Dias	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracaoanuenciaufc.pdf	14/09/2018 10:59:17	Aparecida Tiemi Nagao Dias	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracaoenfermagem.docx	14/09/2018 10:58:24	Aparecida Tiemi Nagao Dias	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	termoassentimentoversao04.doc	11/09/2018 15:25:51	Aparecida Tiemi Nagao Dias	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	termoconsentimentoversao04.docx	11/09/2018 15:15:53	Aparecida Tiemi Nagao Dias	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PB_XML_INTERFACE_REBEC.xml	15/02/2014 16:00:19	Aparecida Tiemi Nagao Dias	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	DECLARAÇÃO INSTITUIÇÃO CO- PARTICIPANTE [RIO LARGO].pdf	08/11/2013 17:00:00		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	DECLARAÇÃO INSTITUIÇÃO CO- PARTICIPANTE [SANTANA DO IPANEMA].pdf	08/11/2013 16:53:49		Aceito
Outros	ORÇAMENTO (1).pdf	28/10/2013 18:59:09		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	DECLARAÇÃO INSTITUIÇÃO CO- PARTICIPANTE [UFAL].pdf	11/10/2013 15:55:14		Aceito
Outros	DECLARAÇÃO PARTICIPANTES.PDF	02/09/2013 15:57:30		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaração de concordancia.pdf	01/09/2013 20:36:16		Aceito
Folha de Rosto	folha de rosto.pdf	01/09/2013 20:34:48		Aceito
Outros	Curriculo do Sistema de Currículos Lattes (Aparecida Tiemi Nagao-Dias).pdf	08/07/2013 15:25:15		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-275

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

E-mail: comepe@ufc.br

UFC - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ /



Continuação do Parecer: 3.729.159

Não

FORTALEZA, 27 de Novembro de 2019

Assinado por:
FERNANDO ANTONIO FROTA BEZERRA
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-275

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

E-mail: comepe@ufc.br

ANEXO A – OS ISOTIPOS DE ANTICORPOS ANTI-PGL-I PODEM DIFERENCIAR CONTATOS COM HANSENÍASE E PACIENTES COM HANSENÍASE?

PATHOGENS AND GLOBAL HEALTH
https://doi.org/10.1080/20477734.2021.2021846



ORIGINAL ARTICLE



Can anti-PGL-I antibody isotypes differentiate leprosy contacts and leprosy patients?

Andressa Almeida Albuquerque^a, Camilla dos Santos Mateus^a, Raphael de Oliveira Rodrigues^a, Evelyn Sampaio Lima^a, Lucas Oliveira Lima^a, Rayane Lima da Silva^a, Maria Amanda Mesquita Fernandes^b, Alexandre Casimiro de Macedo^c, Clódis Maria Tavares^c, Paula Sacha Frota Nogueira^a and Aparecida Tiemi Nagao-Dias^a

^aDepartment of Clinical and Toxicology Analysis, Faculty of Pharmacy, Nursing and Odontology, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brazil; ^bDepartment of Nursing, Faculty of Pharmacy, Nursing and Odontology, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brazil; ^cFaculty of Nursing and Pharmacy (FENFAM), Universidade Federal de Alagoas, Maceió, Brazil

ABSTRACT

Background: Serological tests for antibody measurement in leprosy have a series of limitations indiscriminating contacts and patients. The present paper intends to evaluate if association of more than one antibody isotype in serum samples may be a useful tool in leprosy diagnosis.

Methods: This study evaluated 395 leprosy contacts and 77 leprosy index cases living in endemic municipalities in Northeastern Brazil. The participants were evaluated according to their anti-phenolic glycolipid antigen-I isotype (PGL-I) profile. Serum anti-PGL-I IgM, IgG, and IgA were measured by indirect ELISA.

Results: A strong association was found for antibody positivity in MB leprosy index cases. The odds ratios were 6.11 (95% CI 3.08 – 12.14) for IgM, 3.31 (1.86 – 6.61) for IgG, and 14.97 (8.39 – 34.2) for IgA. For IgM associated with one or more isotypes, the OR was 21.0 (95% CI 10.11 – 43.64), and for IgG + IgA, the OR was 17.58 (8.23 – 49.54). The highest diagnostic sensitivity of 76.0% (95% CI 61.8 – 88.8) was observed for IgM, and the lowest value was 34.1% (13.0 – 58.2), which was observed for IgG + IgA isotypes. Regarding presumptive positive predictive values, the lowest value was obtained for IgM at 24.7% (95% CI 18.1 – 32.3), and the highest values were observed for IgM + one or more isotypes and for IgG + IgA isotype at 60.0% (44.3 – 74.5) and 66.7% (41.0 – 86.7), respectively.

Conclusions: The present work demonstrated that by associating two or more positive antibody isotypes, the risk of facing a real case of leprosy may increase.

KEYWORDS

Leprosy contacts; anti-PGL-I; serum IgA; serum IgG; serum IgM

Introduction

Worldwide, 202,185 new cases of leprosy were reported by the World Health Organization (WHO) in 2019 [1]. Of these, 29,936 occurred in the Americas, and 27,864 were reported in Brazil (approximately 93.07% of the total in the Americas) [1]. The three countries with the highest number of new reported cases in that year were India, Brazil, and Indonesia, which accounted for 79.01% of new leprosy cases [1]. Although there has been a progressive decrease in the incidence of leprosy, the data do not seem to be in line with reality. For instance, there are many undiagnosed cases that need to be investigated by active searches in hyperendemic areas [2].

In 2019, Brazil had an average detection rate of 13.23 new cases for every 100,000 inhabitants, and 78.4% were diagnosed with the multibacillary form [3]. In the same year, 1545 new cases were reported in children below 15 years of age [4]. Of these cases, 50 presented with grade 2 disability (3.23%), which is

representative of late diagnosis [4]. For this reason, one of the pillars of the global strategy against leprosy has been to reduce the rate of new cases in children with this level of disability [1].

Diagnosis of leprosy in children reflects active transmission of the bacteria in the community and failures in health strategies [5]. According to the epidemiological bulletin on leprosy of the health secretariat of the state of Ceará, Brazil, the state's detection rates were 17.2 cases per 100,000 inhabitants in 2019, and there were 2.8 cases in children below 15 years of age per 100,000 inhabitants [6]. A new proposal of the WHO includes early detection of new cases, accurate diagnosis, and treatment [7].

However, there is great difficulty in diagnosing leprosy in its earliest stages due to the failure of following up leprosy contacts. People who have close contact with an index case are at risk of acquiring the disease, but there are still individuals who develop the disease without knowing an index case [8]. The

CONTACT Raphael de Oliveira Rodrigues raphaelrodrigues@gmail.com ^aDepartment of Clinical and Toxicology Analysis, Faculty of Pharmacy, Nursing and Odontology, Universidade Federal do Ceará, Rua Capitão Francisco Pedro, 1210, Fortaleza, Ceará 60403-372, Brazil

© 2022 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

monitoring of people who have contact with index cases of leprosy is considered an effective measure for the early diagnosis of new cases [9].

A question that is frequently raised is whether serological tools could be used for detecting those who are prone to developing the disease [10]. It is well documented that seropositive contacts – those who present positive anti-phenolic glycolipid 1 IgM [anti-PGL-I] titres – have 2.7 times higher risk of developing leprosy than those who are seronegative. However, it is also known that less than 45% of anti-PGL-I IgM contacts develop leprosy [11]. Thus, in the present work, we intend to evaluate if association of more than one antibody isotype in serum samples may be a useful tool in leprosy diagnosis. This approach was examined through a cross-sectional study in four municipalities of the northeastern region of Brazil.

Material and methods

Study design – The present work is a cross-sectional study and included children and young people aged 4 to 15 years who were in contact with leprosy index cases. The contacts and index cases were living in municipalities with high, very high, or hyperendemic rates of leprosy. The municipalities were Rio Largo (RL, Alagoas, high endemicity), Santana do Ipanema (SI, Alagoas, very high endemicity), São Gonçalo do Amarante (SGA, Ceará, high endemicity), and Canindé (CAN, Ceará, hyperendemic leprosy rates). Home visits were scheduled for children and young people to be examined by skilled nursing professionals and trained students. In the municipalities of SGA and CAN, the project relied on the Academic League of Stigmatized Diseases, which was coordinated by the PhD nurse Paula Sacha Nogueira. In the municipalities of RL and SI, the participants were evaluated by local skilled nursing professionals at the Specialized Unit in Tuberculosis and Leprosy, Santana do Ipanema; and by nursing students and professionals under supervision of the PhD nurse Clodis Maria Tavares in Rio Largo.

Leprosy contacts – Contacts aged 4–15 years old ($N = 395$) were evaluated in terms of the presence of lesions (aspect, number) and nerve thickness. Endogen histamine and thermal, pain, and tactile sensitivity were evaluated when necessary. A clinical sociodemographic questionnaire was administered to the participants (see supplementary material appendices 1 and 2).

Children and young people who lived inside the index case's home were classified as household contacts (HH). Those living up to five houses to the right or left of the index case's home were considered peridomestic contacts (PD). Friends and relatives who spent some time in the index case's house were also included in the former group. The participants were also classified according to the WHO operational classification of

leprosy index cases as paucibacillary (PB) and multibacillary (MB) contacts [12]. At the health center, blood was collected (4 mL) in tubes containing anticoagulant, and after centrifugation, serum samples were aliquoted, transported to the Laboratory of Immunology, UFC, Ceará, and maintained at -20°C until analysis.

Index cases – Leprosy patients ($N = 71$, aged 10 to 97 years old) were selected according to the registration of the National Notifiable Diseases System (SINAN) of each municipal health secretariat and defined as index cases. They were invited to go to a health center, where a clinical sociodemographic questionnaire (see supplementary material appendix 3) was administered, and venous blood without anticoagulant was collected (4 mL). After obtaining serum, the samples were transported to the Laboratory of Immunology, UFC, Ceará, and maintained at -20°C until analysis.

The index cases were classified in paucibacillary or multibacillary according to the WHO classification [12]. A paucibacillary clinical form was considered when a compromised anatomical region and/or nervous trunk was identified. A multibacillary clinical form was considered when two or more anatomical regions or more than one nervous trunk were affected. Information about treatment was also obtained from the medical records.

Ethical aspects – The project was approved by the National Committee for Research Ethics (process CAAE 117092/13.9.0000.5054). After explanation of the project, the guardians of the participants were asked to sign a consent form. Participants aged 8 to 15 years old were also asked to sign a consent form themselves, as were the index cases.

Serological tests – Serum anti-PGL-I antibodies were measured as described by Macedo et al. [13] with slight modifications. Microplates precoated with 5 mg/L of native PGL-I (donated by BEI Resources/ATCC, Manassas, USA) were incubated with 1% fetal bovine serum (FBS; Gibco™, Brazil) in phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) for 2 h at 37°C in a humid chamber. After washing, serum samples were diluted in PBS with 0.5% FBS (1:200 for IgG and IgM; 1:50 for IgA), added to plates (50 μL per well in duplicate), and incubated for 2 h at 37°C . After washing, the conjugates (peroxidase-labeled anti-IgG (code A0170, Sigma, USA), anti-IgM (code SAS-10293, Thermo, USA), and anti-IgA (code A0295, Sigma, USA) diluted to 1:20000, 1:2500, and 1:12000, respectively) were added to the plates and incubated for 1.5 h at 37°C . After washing, the plates were incubated for 30 min at room temperature with chromogen/substrate solution for ELISA (100 μL per well), which contained tetramethylbenzidine (TMB) (Invitrogen™, USA). The reaction was interrupted by adding 25 μL of 2.5 N sulfuric acid. The analysis was performed at 450 nm and 620 nm (reference wavelength) using an ELISA plate reader (ASYS Expert Plus, Biochrom, UK).

Four wells contained all reagents except for serum and were used as blank samples. An aliquot of pooled normal human serum (NHS) was used as a cutoff sample and tested in all assays in quadruplicate. The NHS pool comprised serum samples from 50 local blood donors, who were seronegative for HIV, Chagas, hepatitis B and C, HTLV, syphilis and did not present leprosy at the time of sample collection [13]. Titration of the conjugates were done in order that the optical density (OD) of the cutoff serum sample did not exceed 0.250. The negative control OD should be below the mentioned value, and the positive control OD should be at least five times above the mentioned value (see supplementary material appendix 4).

Statistical analysis – The data were analyzed using nonparametric tests as the values did not follow a Gaussian distribution (Kolmogorov-Smirnov test). The Kruskal-Wallis test was used to compare antibody levels from three or more groups. The Fisher test was used to analyze the possible association between the frequency of positive or negative serum antibody levels in leprosy index cases and contacts. The odds ratio (OR) and 95% confidence interval were calculated to evaluate the odds of presenting leprosy and 1 or ≥ 2 positive serum antibody isotypes. Diagnostic sensitivity and specificity and positive and negative predictive values were also calculated. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 6.0, and the level of statistical significance was 5% ($p < 0.05$).

Results

The study included 395 leprosy contacts in the age group of 4 to 15 years, who were divided in those without lesions ($N = 340$, named healthy contacts) and those with suspected lesions ($N = 55$). Among those without lesions (Table 1A), 175 were female children (median age 10 years old), and 165 were male children (median age 9 years old). The participants were classified as HH contacts ($N = 67$), PD contacts ($N = 273$), PB contacts ($N = 89$), and MB contacts ($N = 251$).

Among those with lesions (Table 1B), there were 29 female children (median age 11 years old) and 26 male children (median age 10 years old). The participants were classified as HH ($N = 20$), PD ($N = 35$), PB ($N = 33$), and MB ($N = 32$) contacts. Three of them showed nerve thickness. They presented grade 0 disability. The participants with suspected lesions or nerve thickness were referred to the health center to be examined by a physician. After the project was finished, 7 contacts with suspicion got diagnosis of leprosy (6 with the indeterminate clinical form and 1 with the borderline clinical form of leprosy).

Thirty female index cases (median age 46 years old) and 41 male index cases (median age 50 years old) were included in the study (Table 1C). The index cases were classified as having the PB clinical form ($N = 21$) and MB clinical form ($N = 50$). Eighteen index cases (25.4%) were under treatment, 12 index cases (16.9%) were recruited one year after treatment, 6 index cases (8.5%) were recruited two years after treatment, and 25 index cases (35.2%) were recruited 3 or more years after treatment. Information regarding treatment from ten index cases was missing in the medical records (14.1%). No statistical differences were found with respect to antibody levels considering the year after treatment (Kruskal-Wallis test, $p = 0.61$ for IgM, $p = 0.075$ for IgG and $p = 0.61$ for IgA, data not shown).

Serum anti-PGL-I titers

Figure 1 presents the interquartile ranges and medians of anti-PGL-I IgM, IgG, and IgA levels in serum samples from MB contacts without lesions (MB healthy contacts; $N = 251$), MB contacts with suspected lesions ($N = 32$), and MB leprosy index cases ($N = 50$). Anti-PGL-I IgM levels were higher in MB leprosy index cases than in MB healthy contacts (Kruskal-Wallis test, $p < 0.0001$) and MB contacts with lesions (K-W test, $p < 0.01$). Anti-PGL-I IgG levels were higher in MB leprosy index cases than in healthy contacts (K-W test, $p < 0.001$). Anti-PGL-I IgA levels were higher in MB leprosy index cases than contacts with or without lesions (K-W test, $p < 0.0001$).

Figure 2 presents the interquartile ranges and medians of anti-PGL-I IgM, IgG, and IgA levels in serum samples from PB healthy contacts ($N = 89$), PB contacts with suspected lesions ($N = 33$), and PB leprosy index cases ($N = 21$). The only isotype that presented any statistical difference was IgA. Anti-PGL-I IgA levels were higher in PB leprosy index cases than contacts without lesions (K-W test, $p < 0.01$).

Figure 3 presents the interquartile ranges and medians of anti-PGL-I IgM, IgG, and IgA levels in serum samples from MB contacts who were household contacts (HH contacts; $N = 6$), MB peridomestic contacts (PD contacts; $N = 26$), and MB leprosy index cases ($N = 50$). Anti-PGL-I IgM levels were higher in MB leprosy index cases than in HH and PD multibacillary contacts (K-W test, $p < 0.01$ and $p < 0.0001$, respectively). Anti-PGL-I IgG levels were higher in MB leprosy index cases than in HH and PD multibacillary contacts (K-W test, $p < 0.0001$ and $p < 0.01$, respectively). Anti-PGL-I IgA levels were higher in MB leprosy index cases than HH and PD multibacillary contacts (K-W test, $p < 0.0001$).

Table 1. Age range, gender, and clinical forms of leprosy index cases, household (HH) contacts and peridomiliary (PD) contacts without lesions (healthy contacts), and those with lesions.

(A) Contacts without lesions (healthy contacts) (N = 340)					
Gender	Age median (range)	Type of contact			
		HH (N = 67)		PD (N = 273)	
		PB (N = 14)	MB (N = 53)	PB (N = 75)	MB (N = 198)
Female (N = 170)	10 (4–15 years old)	7	27	42	69
Male (N = 170)	9 (4–15 years old)	7	26	33	66
(B) Contacts with lesions (N = 55)					
Gender	Age median (range)	Type of contact			
		HH (N = 20)		PD (N = 35)	
		PB (N = 14)	MB (N = 6)	PB (N = 9)	MB (N = 26)
Female (N = 26)	13 (4–14 years old)	5	2	5	17
Male (N = 29)	10 (5–15 years old)	9	4	4	8
(C) Index cases (N = 71)					
Gender	Age median (range)	Clinical form (N = 71)			
		PB (N = 21)	MB (N = 50)		
Female (N = 35)	40 (18–61 years old)	12	18		
Male (N = 41)	50 (15–67 years old)	9	12		

Obs. HH (household contacts); PD (peridomiliary contacts); PB (paucibacillary); MB (multibacillary).

Figure 4 presents the interquartile ranges and medians of anti-PGL-1 IgM, IgG, and IgA levels in serum samples from PB household contacts (N = 14), PB peridomiliary contacts (N = 14), and PB leprosy

index cases (N = 21). The only isotype that presented any statistical difference was IgA. Anti-PGL-1 IgA levels were higher in PB leprosy index cases than PB peridomiliary contacts (K-W test, $p < 0.05$).

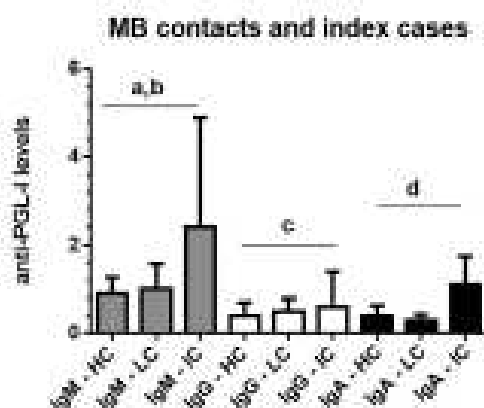


Figure 1. Interquartile ranges and medians of anti-PGL-1 IgM, IgG, and IgA levels in serum samples from MB (multibacillary) contacts without lesions/MB healthy contacts (HC; N = 25), MB contacts with suspected lesions (LC; N = 52), and MB leprosy index cases (IC; N = 53). The cutoff values were 1.1 for IgA and 1.2 for IgG and IgM isotypes. * $p < 0.0001$, Kruskal-Wallis test, anti-PGL-1 IgM levels in MB index cases were higher than in MB healthy contacts; * $p < 0.01$, Kruskal-Wallis test, anti-PGL-1 IgM levels in MB index cases were higher than in MB contacts with lesions; * $p < 0.0001$, Kruskal-Wallis test, anti-PGL-1 IgG levels in MB index cases were higher than in MB healthy contacts; * $p < 0.0001$, Kruskal-Wallis test, anti-PGL-1 IgA levels in MB index cases were higher than in MB healthy contacts and contacts with lesions.

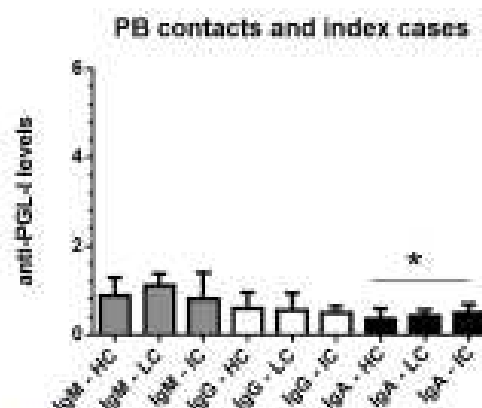


Figure 2. Interquartile ranges and medians of anti-PGL-1 IgM, IgG, and IgA levels in serum samples from PB (paucibacillary) contacts without lesions/PB healthy contacts (HC; N = 80), PB contacts with suspected lesions (LC; N = 23), and PB leprosy index cases (IC; N = 21). The cutoff values were 1.1 for IgA and 1.2 for IgG and IgM isotypes. * $p < 0.05$, Kruskal-Wallis test, anti-PGL-1 IgA levels in PB index cases were higher than in PB healthy contacts.

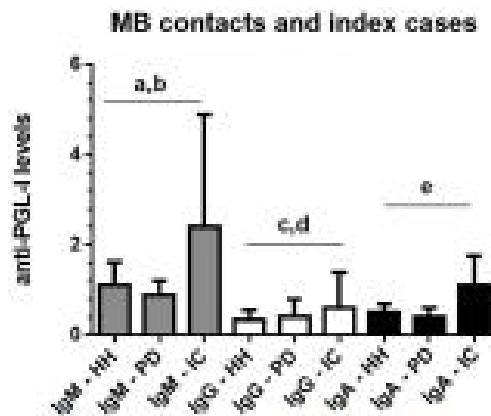


Figure 3. Interquartile ranges and medians of anti-PGL-1 IgM, IgG, and IgA levels in serum samples from MB (multibacillary) contacts who were household (HH, $N = 6$), or MB peridomestic contacts (PD, $N = 36$), and MB leprosy index cases ($N = 50$). The cutoff values were 1.1 for IgA and 1.2 for IgG and IgM isotypes. * $p < 0.0001$, Kruskal-Wallis test, anti-PGL-1 IgM levels in MB index cases were higher than in PD contacts; * $p < 0.01$, Kruskal-Wallis test, anti-PGL-1 IgM levels in MB index cases were higher than in HH contacts; * $p < 0.0001$, Kruskal-Wallis test, anti-PGL-1 IgG levels in MB index cases were higher than in HH contacts; * $p < 0.01$, Kruskal-Wallis test, anti-PGL-1 IgG levels in MB index cases were higher than in PD contacts; * $p < 0.0001$, Kruskal-Wallis test, anti-PGL-1 IgA levels in MB index cases were higher than in HH and PD contacts.

Frequency of positive anti-PGL-1 antibodies

The frequency of positive antibody isotypes was evaluated in leprosy index cases with the PB clinical form (Table 2) and the MB clinical form (Table 3) in association with healthy contacts. No association was found between the positivity of anti-PGL-1 and index cases with the PB clinical form, irrespective of the isotype ($p = 1.0$ for IgM and IgG and $p = 0.055$ for IgA, Fisher test). Nonetheless, a strong association was found for all antibody isotypes in MB leprosy index cases ($p < 0.0001$ for IgM and IgA and $p = 0.0014$ for IgG, Fisher test).

Regarding the IgM isotype, the OR was 6.11 (95% CI 3.08–12.16). For the IgG isotype, the OR was 3.31 (95% CI 1.66–6.61). For the IgA isotype, the OR was 16.97 (95% CI 8.39–34.2). When positive IgM was

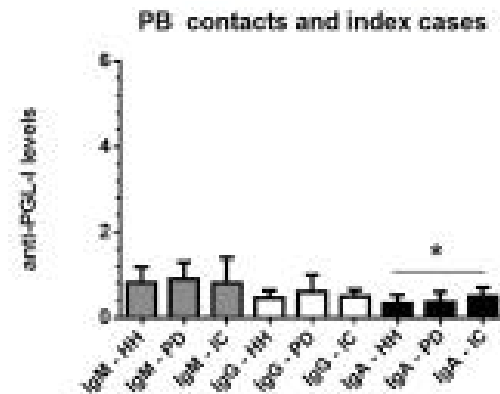


Figure 4. Interquartile ranges and medians of anti-PGL-1 IgM, IgG, and IgA levels in serum samples from PB (paucibacillary) household contacts (HH, $N = 14$), PB peridomestic contacts (PD, $N = 14$), and PB leprosy index cases ($N = 21$). The cutoff values were 1.1 for IgA and 1.2 for IgG and IgM isotypes. * $p < 0.05$, Kruskal-Wallis test, anti-PGL-1 IgA levels in PB index cases were higher than in PD contacts.

considered together with one or more isotypes ($p < 0.0001$, Fisher test), the OR was 21.0 (95% CI 10.11–43.64), and when positive IgG and IgA status was analyzed ($p < 0.0001$, Fisher test), the OR was 17.58 (95% CI 6.23–49.54).

The highest diagnostic sensitivity was observed for the IgM isotype at 76.0% (95% CI 61.8–86.9), and the lowest value was observed for IgG + IgA isotypes at 24.1% (95% CI 13.0–38.2). With respect to diagnostic specificity, the highest value was obtained for IgG + IgA isotypes at 98.2% (95% CI 96.2–99.4), and the lowest value was for the isolated IgM isotype at 65.9% (95% CI 60.6–70.9). Regarding presumptive positive predictive values, the lowest value was obtained for IgM at 24.7% (95% CI 18.1–32.3), and the highest values were observed for IgM + one or more isotypes and for IgG + IgA isotype at 60.0% (95% CI 44.3–74.3) and 66.7% (95% CI 41.0–86.7), respectively. Negative predictive values were high for all the isolated or associated isotypes. For instance, for the IgM isotype, the negative predictive value was 94.9 (95% CI 91.3–97.4), and that for IgM associated with one or more isotypes was 93.3% (95% CI 90.2–95.7).

Table 2. Frequency of positive/negative anti-PGL-1 levels in paucibacillary leprosy index cases and healthy contacts.

	Serum anti-PGL1									
	IgM		IgG		IgA		IgM + one or more isotypes		IgG + IgA	
	Index cases (n = 21)	Healthy contacts (n = 340)	Index cases (n = 21)	Healthy contacts (n = 340)	Index cases (n = 21)	Healthy contacts (n = 340)	Index cases (n = 21)	Healthy contacts (n = 340)	Index cases (n = 21)	Healthy contacts (n = 340)
Positive	7	116	3	39	4	23	3	18	1	6
Negative	14	224	18	301	17	318	18	322	20	334
Fisher test	$p = 1.0$		$p = 1.0$		$p = 0.055$		$p = 0.11$		$p = 0.25$	

Table 3. Frequency of positive/negative anti-PGL-1 levels in multibacillary leprosy patients and healthy contacts. Parameters of OR, diagnostic sensitivity and specificity, and negative and positive predictive values (and 95% interval confidence) for isolated anti-PGL-1 IgA, IgM, IgG, IgM + one or more isotypes, and IgG + IgA antibody levels.

	Serum anti-PGL-1									
	IgM		IgG		IgA		IgM + one or more isotypes		IgG + IgA	
	Index cases (n = 50)	Healthy contacts (n = 340)	Index cases (n = 50)	Healthy contacts (n = 340)	Index cases (n = 50)	Healthy contacts (n = 340)	Index cases (n = 50)	Healthy contacts (n = 340)	Index cases (n = 50)	Healthy contacts (n = 340)
Positive	38	114	31	39	27	23	27	18	12	6
Negative	12	224	19	301	23	316	23	322	38	334
Fisher test	p < 0.0001		p = 0.0014		p < 0.0001		p < 0.0001		p < 0.0001	
Odds ratio	6.11		3.27		16.97		21.0		17.58	
(95% CI)	(3.68–12.16)		(1.66–6.61)		(8.39–34.2)		(10.11–41.64)		(8.25–40.54)	
Diagnostic sensitivity	76.0		62.0		54.0		54.0		24.0	
(95% CI)	(61.8–86.8)		(47.8–74.0)		(38.3–68.2)		(39.3–68.2)		(13.0–38.2)	
Diagnostic specificity	62.0		88.5		93.5		94.7		98.2	
(95% CI)	(49.6–79.8)		(84.3–91.7)		(90.4–95.0)		(91.8–96.8)		(96.2–99.4)	
Positive predictive value	24.7		27.8		55.1		60.0		66.7	
(95% CI)	(18.1–32.3)		(18.2–40.6)		(46.2–69.3)		(44.3–74.3)		(41.8–86.7)	
Negative predictive value	94.9		99.5		93.3		95.3		99.8	
(95% CI)	(91.2–97.6)		(98.8–99.9)		(90.0–95.7)		(93.3–97.7)		(98.2–99.7)	

CI = confidence interval.

Discussion

Although leprosy has been eliminated as a public health problem in several countries [14], Brazil is one of the countries that still suffers from a high incidence, late diagnosis, and grade 2 physical disability at diagnosis [15]. Diagnosis in primary care is essentially clinical based on the search for injuries with altered sensitivity and/or thickened nerves [12]. Delays in diagnosis are due to a lack of the patient's knowledge, as well as a lack of knowledge and skill of health professionals [16]. In addition, a lack of government attention may directly affect the quality of service provided to the population [7]. Another worrying factor is leprosy in children, which represent recent infections and high transmission rates [17]. Furthermore, children with leprosy indicate that they were possibly contacts of undiagnosed and therefore untreated leprosy patients [18].

Diagnostic tests have been developed and established for a multitude of infectious diseases [19], even for those just recently described [20]. Regarding leprosy diagnosis, as it is a disease that has practically no laboratory tests as support tools, there is a risk of the diagnosis being delayed by up to 10 years in Brazil [16], as well as other countries [21]. The only laboratory test available is intradermal smear microscopy, which can have a negative result in cases of paucibacillary clinical forms of leprosy [12]. Therefore, the search for biomarkers that consider the immune response to mycobacteria is extremely relevant [22].

Regarding detection of antibodies against PGL-1 antigen, which is specific to the mycobacterium [23], Araújo et al. [24] found in a longitudinal study with 10 years of follow-up that those who were seropositive for anti-PGL

-1 had a 5.7-fold increased risk of developing leprosy. The authors reported disease confirmation in 2% of the participants. According to Perna et al. (2016), contacts with positive anti-PGL-1 have a 3-fold higher risk of developing leprosy than those with negative anti-PGL-1. In their systematic review and meta-analysis, the authors found an overall OR of 3.05 with diagnostic sensitivities ranging of 1.96 to 39.29% and diagnostic specificities of 83.52 to 98.03% [11].

Leturiondo et al. (2021) highlight a fundamental point in that although serological tests have a series of limitations, they can be important to assist in clinical routine (for example, in differentiating leprosy from other dermatological conditions). Assessing endemic controls and patients and considering the paucibacillary and multibacillary clinical forms, the authors found diagnostic sensitivities of 32% and 81%, diagnostic specificities of 81.7% and 99%, positive predictive values of 14.9% and 43.3%, and negative predictive values of 92.9% and 94.6%, respectively [25].

In a study carried out by our group, a strong correlation was demonstrated between the anti-PGL-1 IgM and IgA levels ($r = 0.74$; $p < 0.0001$), and there was a moderate association between the tests (Kappa coefficient of 0.48) [13]. In the multibacillary leprosy clinical form, diagnostic sensitivities for IgM, IgG, and IgA were 81.3%, 21.9%, and 53.1%, respectively. In the paucibacillary leprosy clinical form, they were 59.1%, 22.7%, and 40.9%, respectively. Diagnostic specificities were 88.2% for IgM and 100% for IgG and IgA. Therefore, at that time, we suggested the inclusion of the IgA isotype in the follow-up of contacts, in addition to the IgG and IgM isotypes [13].

During the same period, we carried out a prospective follow-up study of 69 children and young people between 4 and 15 years of age for 3 years [26]. One striking observation was that the IgG isotype showed a strong association with leprosy (relative risk of 8.5 times). One child who was a peridomestic contact presented increased levels of the IgA isotype three years before the appearance of a hypochromic lesion on the back of his neck. In the second year, he showed increased levels of IgG and IgA. Only in the third year of follow-up did he show increased levels of IgM, besides IgG and IgA [26]. This clearly demonstrates the importance of investigating the three antibody isotypes.

In the present work, we carried out a cross-sectional study with samples of index cases of MB and PB clinical forms and healthy contacts (children and young people without suggestive lesions or nerve thickening who lived with or next to index cases). Contacts with suspected lesions and/or nerve thickening were not included in the control group. No significant associations were found for PB leprosy. Instead, based on the data for MB leprosy, the ORs for IgM and IgG were 6.11 and 3.31, respectively. The highest OR values were found for IgA (OR 16.97). For IgM, when it was associated with one or more isotypes (OR 21.0), and for IgG + IgA isotypes (OR 17.58). This means that compared to healthy contacts, MB leprosy index cases show 16.97, 21.0, or 17.58 times the odds of presenting positive isolated IgA isotype, IgM associated with one and more isotypes, or IgG + IgA isotypes, respectively. This represents 2.77-, 3.42- or 2.87- times higher possibilities that leprosy patients will present one of the former biomarkers, respectively, than positive isolated IgM compared to healthy contacts.

A question that constantly arises is why IgM is not only used since it is known that PGL-I is a T-independent antigen [13]. The reason for seeking an association with other biomarkers is that although IgM alone has a higher diagnostic sensitivity than the other isotypes (considering the multibacillary forms of the disease), its diagnostic specificity is not as good. Therefore, it can impair the ability to confirm leprosy since its hypothetical positive predictive value is only 24.7%. Meanwhile, when it is associated with another isotype, there is a significant improvement in its positive predictive value, which rises to 55.1%.

Data from another study [27] corroborate our results, demonstrating that IgA is a biomarker that should be used in the follow-up of contacts and to help in the diagnosis of leprosy. That study found that IgA anti-NDO-HSA (natural octyl disaccharide bound to human serum albumin) presented diagnostic sensitivities of 100% and 95% for the multibacillary and paucibacillary forms of leprosy, as well as diagnostic specificities of 95% and 85%, respectively.

Another question that arises is why molecular tests are not used instead of serological tests. In our recent experience, virtually no blood samples from contacts were positive for *M. leproe* DNA, and only one patient's blood sample was positive (unpublished data). Contacts cannot be biopsied for obvious reasons, and nasopharyngeal molecular testing has no association with disease. Therefore, we believe that among the best biomarkers with all their limitations are antibodies, considering not only the IgM isotype but also the main isotypes present in the systemic circulation and associating them with each other and perhaps other molecules of the immune system, such as chemokines. The important idea is that if we associate the isotypes, the probability of disease can increase. In conclusion, when faced with two or more positive antibody isotypes, we may already be closer to a real case of leprosy. This would certainly help in the diagnosis of leprosy.

Acknowledgments

We would like to thank Prof. Paulo César de Almeida, Health Sciences Center, Universidade Estadual do Ceará, Brazil, for reviewing the statistical analysis of the present manuscript.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

Funding

This work was financially supported by FUNCAP/PPGUS/SESA, Grant number 3966335/2017, and by MCT/CNPq/MS-CTE, Grant number 403461/2012-0.

References

- [1] World Health Organization. Global leprosy update, 2019: time to step-up prevention initiatives. *Weekly Epidemiol Rec*. 2020;95(36):417–440.
- [2] Salgado CG, Barreto JG, Da Silva MB, et al. Are leprosy case numbers reliable? *Lancet Infect Dis*. 2018 Feb;18(2):115–157. PMID: 29412953. DOI:10.1016/S1473-3099(18)30012-4.
- [3] BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico: Hanseníase. Brasília (DF). n. Especial; 2020 (cited 2020 Apr 16). Available from: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2020/boletim-epidemiologico-de-hanseníase-2020>.
- [4] World Health Organization. New cases of leprosy in children below 15 years of age. [cited 2021 May 12]. Available from: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/topics/leprosy-hansen-disease>.
- [5] Barreto JG, Brumido D, Frade MAC, et al. Spatial epidemiology and serologic cohorts increase the early detection of leprosy. *BMC Infect Dis*. 2015;15:327.

- [6] CEARÁ, Governo do Estado. Secretaria de Saúde. Boletim Epidemiológico: Hanseníase. Fortaleza (CE); 2021 [cited 2021 Jan 18]. Available from: https://www.saude.ce.gov.br/wp-content/uploads/sites/9/2018/06/boletim_epidemiologico_hanseniasa_20211901_v2.pdf
- [7] World Health Organization. Towards zero leprosy: Global Leprosy (Hansen's Disease) Strategy 2021–2030; 2021 [Accessed 28 May 2021]. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/340774>
- [8] Baetschi MW, Steinmann P, Wickenden A, et al. Current knowledge on *Mycobacterium leprae* transmission: a systematic literature review. *Leprosy Rev.* 2015;86 (2):142–155.
- [9] Salgado CG, Barreto JG, Silva MB, et al. Are leprosy case numbers reliable? *Lancet Infect Dis.* 2018;18(2):135–137.
- [10] Smith WC, Aerts A. Role of contact tracing and prevention strategies in the interruption of leprosy transmission. *Leprosy Rev.* 2014;85(1):2–17.
- [11] Penna MLF, Penna GO, Iglesias PC, et al. Anti-PGL-1 positivity as a risk marker for development of leprosy among contacts of leprosy cases: systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(5):e0004703.
- [12] BRASIL. Ministério da Saúde. Guia prática sobre hanseníase. Brasília-DF; 2017 [Accessed 31 May 2021]. Available from: <https://portal.mec.gov.br/images/pdf/2017/novembro/22/Guia-Pratica-da-Hanseniasa-WEB.pdf>
- [13] Macedo AC, Guimarães JA, Rodrigues RO, et al. Serum anti-phenolic glycolipid—1 IgA correlates to IgM isotype in leprosy patients: a possible candidate for seroepidemiological surveys? *J Clin Lab Anal.* 2017;32(5):e22276.
- [14] World Health Organization. Task Force on definitions, criteria and indicators for interruption of transmission and elimination of leprosy. New Delhi: World Health Organization, Regional Office for South-East Asia; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. [cited 2021 Oct 24]. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/342172>
- [15] Salgado CG, Barreto JG, Da Silva MB, et al. What do we actually know about leprosy worldwide? *Lancet Infect Dis.* 2016;16(7):778.
- [16] Henry M, Galán N, Teasdale K, et al. Factors contributing to the delay in diagnosis and continued transmission of leprosy in Brazil—an explorative, quantitative, questionnaire based study. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(3):e0004342.
- [17] Barreto JG, Frade MAC, Bernardes Filho P, et al. Leprosy in children. *Curr Infect Dis Rep.* 2017;19 (8):23.
- [18] Lana FC, Fabri Ada C, Lopes FN, et al. Deformities due to leprosy in children under fifteen years old as an indicator of quality of the leprosy control programme in Brazilian municipalities. *J Trop Med.* 2013;2013:813793.
- [19] Delforge ML. De l'utilité ou non de la sérologie infectieuse: morceaux choisis [On the usefulness of serology testing in infectious diseases: selected topics]. *Rev Med Brux.* 2011;32(4):285–288.
- [20] West R. Serology and other adaptive immune response testing for COVID-19. The Johns Hopkins University; 2021:1–4. [cited 2021 Oct 26]. Available from: <https://www.centerforhealthsecurity.org/resources/COVID-19/COVID-19-fact-sheets/300228-Serology-testing-COVID.pdf>
- [21] Yaghoobi R, Farly A, Ranjbari N, et al. Lepromatous leprosy: a commonly misdiagnosed disease. *ScientificWorldJournal.* 2010;10:2348–2349.
- [22] van Hooj A, Geluk A. In search of biomarkers for leprosy by unraveling the host immune response to *Mycobacterium leprae*. *Immunol Rev.* 2021;303 (1):175–192.
- [23] Spencer JS, Brennan PJ. The role of *Mycobacterium leprae* phenolic glycolipid 1 (PGL-1) in serodiagnosis and in the pathogenesis of leprosy. *Leprosy Rev.* 2011;82 (4):344–357.
- [24] Araújo S, Rezende MMF, Sousa DCR, et al. Risk-benefit assessment of *Bacillus Calmette-Guérin* vaccination, anti-phenolic glycolipid 1 serology, and Mitsuda test response: 10-year follow-up of household contacts of leprosy patients. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2015;48 (6):739–745.
- [25] Leturiondo AL, Noronha AB, Do Nascimento MDO, et al. Performance of serological tests PGL1 and NDO-L1D in the diagnosis of leprosy in a reference center in Brazil. *BMC Infect Dis.* 2018;18(1):22.
- [26] Nogueira-Dias AT, Macedo AC, Rodrigues RO, et al. Serum anti-PGL-1 IgG, IgM, and IgA in a 3-year follow-up study of 4–15-year-old leprosy contacts. *Pediatr Infect Dis J.* 2019;58(5):e193–198.
- [27] Silva KKP, de Oliveira EE, Elias CMM, et al. Serum IgA antibodies specific to *M. leprae* antigens as biomarkers for leprosy detection and household contact tracking. *Front Med (Lausanne).* 2021;8:696495.