**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

VICTOR HUGO DAMASCENO FERNANDES

**Reação em cadeia da polimerase em amostras de linfa coletadas em
papel filtro no diagnóstico de hanseníase**

Ribeirão Preto

2018

VICTOR HUGO DAMASCENO FERNANDES

**Reação em cadeia da polimerase em amostras de linfa coletadas
em papel filtro no diagnóstico da hanseníase**

Versão original

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Área de Concentração: Clínica Médica

Orientadora:

Profa. Dra. Ana Maria Ferreira Roselino

Coorientador:

Prof. Dr. Ciro Martins Gomes

Ribeirão Preto

2018

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

Fernandes, Victor Hugo Damasceno.

Reação em cadeia da polimerase em amostras de linfa coletadas em papel filtro no diagnóstico da hanseníase / Victor Hugo Damasceno Fernandes. Ribeirão Preto, 2018.

105 p. : 5 il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

Área de concentração: Dermatologia.

Orientadora: Roselino, Ana Maria.

Coorientador: Gomes, Ciro Martins.

1. Hanseníase. 2. *Mycobacterium leprae*. 3. Reação em cadeia da polimerase. 4. Diagnóstico. 5. Técnicas moleculares de diagnóstico.

FERNANDES, VICTOR HUGO DAMASCENO.

Reação em cadeia da polimerase em amostras de linfa coletadas em papel filtro no diagnóstico da hanseníase

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Esta tese é dedicada aos pacientes com hanseníase, na esperança de que possa ser uma pequena contribuição para a melhoria do diagnóstico e erradicação da doença.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo amor e suporte incondicional em todos os anos da caminhada.

A Prof. Dra. Ana Maria Ferreira Roselino, pela paciência ao orientar, pela calma nos momentos de desespero e pelos ensinamentos que me ajudaram a concluir esse projeto.

Ao Prof. Dr. Ciro Martins Gomes, pela orientação e ajuda durante a pesquisa.

A Prof. Dra. Norma Tiraboschi Foss, pelo exemplo de conhecimento, ética e competência, por despertar em seus alunos o desejo de ser médicos melhores.

A Natália Aparecida de Paula, pela paciência em me ensinar todos os passos no laboratório, pela disponibilidade ilimitada para discutir, opinar e me ajudar a qualquer momento.

À equipe do Ambulatório de Hanseníase do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – em especial ao Prof. Dr. Marco Andrey Cipriani Frade, Dra. Fernanda Cruz, Dra. Helena Barbosa Lugão e Dr. João Carlos Lopes Simão – cuja contribuição para meus conhecimentos em hanseníase é imensurável.

Aos pacientes que gentilmente cederam material para a realização do estudo.

Aos amigos, que foram apoio essencial ao longo dessa jornada – Bruno Alessandro Tomaz, Bruno Fonzar Tannous, Conrado Ragazini, Gabriela Pagano, Juca Silva, Marcela Ambiel, Maria Natália Hirata, Thiago Apolinário.

Ao Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e à Universidade de São Paulo, sem os quais o trabalho não poderia ter sido realizado.

À Fundação Paulista Contra a Hanseníase e à Fundação de Apoio ao Ensino e Pesquisa – FAEPA, pelo apoio financeiro.

RESUMO

FERNANDES, V. H. D. **Reação em cadeia da polimerase em amostras de linfa coletadas em papel filtro no diagnóstico da hanseníase**. 2018. 105f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

O diagnóstico etiológico da hanseníase, causada pelo bacilo *Mycobacterium leprae*, pode ser difícil na forma paucibacilar (PB), na qual os exames têm baixa sensibilidade na detecção do bacilo. A reação em cadeia da polimerase (PCR) tem se mostrado sensível para o diagnóstico da hanseníase. Amostras de linfa são rapidamente obtidas em campo e pouco invasivas. O objetivo principal deste trabalho foi comparar os resultados da PCR com 4 pares de *primers* (Ag85B, *MntH*, Pra-36kDa e RLEP), descritos na literatura para o diagnóstico da hanseníase, utilizando-se DNA extraído de amostras de linfa de orelhas, cotovelos e joelhos, coletadas em papel filtro. Além da comparação dos resultados da PCR com os 4 pares de *primers*, também foram comparados à baciloscopia de linfa no grupo MB e ao ELISA anti-PGL-1 nos grupos PB e MB, utilizando-se o teste de qui-quadrado de McNemar para amostras pareadas. Trinta e nove pacientes com hanseníase [12 (30,76%) na forma PB e 27 (69,23%), multibacilar (MB)], virgens de tratamento, atendidos consecutivamente no período de 2006 a 2010, foram incluídos. A detecção de bacilos à baciloscopia e na biópsia de pele foi confirmada em 55,55% e em 100% dos pacientes MB, respectivamente; e 67,56% dos pacientes (33,33% dos PB e 84% dos MB) apresentaram títulos de anti-PGL1 acima do cut-off no ELISA. A PCR foi positiva em 70,37% das 27 amostras de pacientes MB, considerando-se o resultado conjunto dos 4 *primers* (7,69% com Ag85B; 11,11% com *MntH*; 12,5% com Pra-36kDa; e 66,66% com RLEP). Uma amostra se mostrou positiva com os *primers* Ag85B, *MntH* e Pra-36kDa e negativa com RLEP. Não houve amplificação no grupo PB, portanto, os resultados do ELISA anti-PGL-1, embora não confirmatórios da etiologia, foram superiores para o diagnóstico da hanseníase PB. No grupo MB, os resultados da PCR com RLEP foram superiores àqueles com *MntH*, Ag85B e Pra-36kDa ($P<0,001$); comparando-se *MntH* com Ag85B e Pra-36kDa ($P=0,317$; $P=1,0$, respectivamente), e Ag85B com Pra-36kDa ($P=0,564$), os resultados foram

semelhantes. A frequência de positividade da baciloscopia foi maior que a da PCR com *MntH* ($P=0,001$), Ag85B ($P<0,001$) e Pra-36kDa ($P=0,004$); semelhante ao RLEP ($P=0,083$); e menor, quando comparada ao resultado combinado dos 4 *primers* ($P=0,046$). Ainda no grupo MB, a frequência de positividade anti-PGL-1 foi superior à da PCR com *MntH*, Ag85B e Pra-36kDa ($P<0,001$) e à baciloscopia ($P=0,011$); porém, foi semelhante à PCR com RLEP ($P=0,059$) ou com os 4 *primers* combinados ($P=0,102$). A maior frequência de positividade da PCR com *primers* RLEP é explicada pela presença de múltiplas cópias RLEP no genoma do bacilo, aumentando a chance do anelamento e amplificação. Existe complementariedade entre os resultados com diferente *primers*, podendo uma mesma amostra apresentar diferentes resultados a depender da escolha destes. A frequência da positividade da PCR com par de *primers* RLEP, em amostras de linfa coletadas em papel filtro, mostrou-se semelhante à da baciloscopia e do ELISA anti-PGL-1 nos pacientes MB. Assim, encoraja-se seu emprego em trabalhos de campo devido à facilidade da coleta e possibilidade de remessa dos papéis filtro para centros de referência.

Palavras-chave: 1. Hanseníase. 2. *Mycobacterium leprae*. 3. Reação em cadeia da polimerase. 4. Diagnóstico. 5. Técnicas de diagnóstico molecular.

ABSTRACT

FERNANDES, V. H. D. **Polymerase chain reaction using lymph smear stored in filter paper in leprosy diagnosis.** 2018. 105f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Leprosy's etiologic diagnosis may be difficult in paucibacillary (PB) patients, in which laboratory tests have low sensitivity for the detection of the causative agent, *Mycobacterium leprae*. Polymerase chain reaction (PCR) has shown good sensitivity in leprosy diagnosis. Lymph samples are readily acquired in the field and minimally invasive. The main objective of this paper is to compare the results of PCR with four sets of primers previously described in the literature (Ag85B, *MntH*, Pra-36kDa and RLEP), using DNA extracted from lymph samples from ear lobes, elbows and knees, stored in filter paper. We also aim to compare the PCR results to lymph bacilloscopy in the multibacillary (MB) group and to anti-PGL-1 serology in PB and MB group, using McNemar's chi-square test for paired samples. 39 treatment-naïve leprosy patients [12 (30.76%) PB and 27 (69.23%) MB] seen in the outpatient clinic of a referral center were included. Bacilli were detected in 55.55% of bacilloscopy samples and 100% of biopsies from MB patients; 67.56% of all patients (33.33% of PB and 84% of MB) had anti-PGL1 titers above the method's cut-off. PCR was positive in 70.37% of the 27 MB patients, taking in consideration the 4 primers combined (7,69% with Ag85B; 11,11% with *MntH*; 12,5% with Pra-36kDa; e 66,66% with RLEP). One sample was positive for primers Ag85B, *MntH* e Pra-36kDa and negative for RLEP. There was no DNA amplification in the PB group, in which anti-PGL-1 ELISA, although not confirmatory of the disease, was superior in the diagnosis. In the MB group, PCR with RLEP primer was superior to Ag85B, *MntH* and Pra-36kDa ($P<0,001$); between *MntH* and Ag85B ($P=0,317$); *MntH* and Pra-36kDa ($P=1,0$); and Ag85B and Pra-36kDa ($P=0,564$), results were similar. Bacilloscopy's frequency of positivity was greater than PCR with Ag85B ($P<0,001$), *MntH* ($P=0,001$) and Pra-36kDa ($P=0,004$); similar to RLEP ($P=0,083$); and inferior to the results of the four primers combined ($P=0,046$). Still in the MB group, anti-PGL-1 serology was superior to PCR with Ag85B, *MntH* and Pra-36kDa ($P<0,001$) and to bacilloscopy ($P=0,011$); its results were similar to PCR with RLEP ($P=0,059$) or with the four primers combined ($P=0,102$). RLEP's greater positivity is probably due to the

presence of multiple copies of the target DNA in the bacillus' genome, enhancing the chances of primer annealing. The primers showed complementarity; therefore one sample may display different outcomes depending on primer choice. The frequency of positivity of PCR with RLEP primers, in lymph samples stored in filter paper, was similar to bacilloscopy and serology amongst MB patients. Hence, we encourage its use in fieldwork as a practical and easy method for acquiring samples that can be shipped for further processing in referral centers.

Key-words: 1. Leprosy. 2. *Mycobacterium leprae*. 3. Polymerase Chain Reaction. 4. Diagnosis. 5. Molecular Diagnostic Techniques.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Gel de agarose a 2% mostrando amplificação da banda de 372pb correspondente ao *amplicon* dos *primers* RLEP.

FIGURA 2 – Cromatograma mostrando sequenciamento genético do fragmento amplificado na amostra 6.

FIGURA 3 – Cromatograma mostrando sequenciamento genético do fragmento amplificado na amostra 6 (continuação).

FIGURA 4 – Sequência confirmada da amostra 6 na ferramenta BLAST, mostrando alinhamento exclusivo com sequências do genoma de *Mycobacterium leprae*.

FIGURA 5 – Distribuição dos índices de anticorpos séricos Anti-PGL-1, determinados por ELISA, nos grupos PB e MB.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Caracterização da amostra de pacientes segundo a classificação operacional da WHO e Ridley-Jopling.

TABELA 2 – Quantificação e razão de absorbância a 260nm e 280nm do DNA extraído das amostras de linfa segundo os métodos de extração por eluição com água e por kit comercial.

TABELA 3 – Pares de *primers* utilizados nas reações de PCR, tamanho do amplicon e referências consultadas.

TABELA 4 – Reagentes utilizados nas reações de PCR.

TABELA 5 – Temperaturas e tempo de ciclagem para cada reação de PCR.

TABELA 6 – Positividade da baciloscopia em pacientes com hanseníase, de acordo com a classificação operacional (OMS) e de Ridley e Jopling (R&J).

TABELA 7 – Positividade da sorologia anti-PGL-1 em pacientes com hanseníase, de acordo com a classificação operacional (OMS) e de Ridley e Jopling (R&J).

TABELA 8 – Positividade da PCR em pacientes com hanseníase multibacilar, de acordo com a classificação operacional (OMS) e de Ridley e Jopling (R&J).

TABELA 9 – Comparação dos resultados da PCR com *primers* Ag85B, *MntH* e Pra-36kDa com a PCR com *primers* RLEP, em pacientes com hanseníase MB.

TABELA 10 – Comparação da frequência dos resultados positivos e negativos da PCR com aqueles da sorologia anti-PGL-1 e baciloscopia em pacientes com hanseníase MB.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 AGENTE ETIOLÓGICO DA HANSENIASE – MYCOBACTERIUM LEPRAE	18
2.2 EPIDEMIOLOGIA	20
2.3 TRANSMISSÃO	23
2.4 GENÉTICA E IMUNOLOGIA DO HOSPEDEIRO	24
2.5 CLASSIFICAÇÃO E QUADRO CLÍNICO	24
2.6 ACOMETIMENTO NEUROLÓGICO E HANSENÍASE NEURAL PRIMÁRIA	26
2.7 EXAMES COMPLEMENTARES NO DIAGNÓSTICO	27
2.7.1 Baciloscopia	27
2.7.2 Histologia	27
2.7.3 Intradermorreação de Mitsuda	28
2.7.4 Sorologia	28
2.7.5 Eletrofisiogologia	29
2.7.6 Exames de imagem	29
2.7.7 Avaliação da imunidade celular	30
2.7.8 Reação em cadeia da polimerase	31
2.7.8.1 Detecção do bacilo e diagnóstico	31
2.7.8.2 Monitorização do tratamento	32
2.7.8.3 Estudo da transmissão e avaliação de comunicantes	33
3 JUSTIFICATIVA	34
4 OBJETIVOS	36
4.1 OBJETIVO GERAL	37
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
5 CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS	38
5.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	39
5.2 CASUÍSTICA	39
5.2.1 Critérios de inclusão e exclusão	39
5.2.2 Classificação dos pacientes	40
5.2.3 Caracterização da amostra	40
5.3 MATERIAIS E MÉTODOS	41
5.3.1 Coleta de amostras de linfa	41

5.3.2 Eluição do DNA das amostras.....	42
5.3.3 Extração do DNA das amostras.....	42
5.3.4 Reação em cadeia da polimerase.....	43
5.3.5 ELISA anti-PGL-1.....	50
6 RESULTADOS.....	51
6.1 BACILOSCOPIA.....	52
6.2 ELISA ANTI-PGL-1.....	52
6.3 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE.....	54
6.4 COMPARAÇÃO ENTRE OS TESTES DIAGNÓSTICOS UTILIZADOS.....	55
6.4.1 Pacientes multibacilares.....	55
7 DISCUSSÃO.....	58
8 CONCLUSÕES.....	66
REFERÊNCIAS.....	68
APÊNDICES.....	78
ANEXOS.....	81
ARTIGO.....	89

1 INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma enfermidade milenar, cujas primeiras descrições remontam a mais de dois mil anos. É causada pela bactéria *Mycobacterium leprae*, bacilo álcool-ácido resistente, que infecta pele e nervos, levando à clássica sintomatologia de lesões cutâneas com alteração sensorial. Tem evolução lenta, com longo período de incubação, e pode acarretar deformidades, amputações e incapacidades.

As manifestações clínicas da doença são variáveis e dependem principalmente da imunidade do hospedeiro frente ao patógeno, constituindo o espectro: em um polo, a forma clínica paucibacilar (PB), com lesões bem delimitadas, em menor número, na qual a demonstração da presença do bacilo é de difícil execução; no polo oposto, a forma multibacilar (MB), cujas lesões são disseminadas e ricas em *M. leprae*.

Apesar de acompanhar a humanidade desde seus primórdios, os maiores avanços no tratamento da hanseníase datam de menos de 40 anos. De fato, a instituição da poliquimioterapia pela Organização Mundial da Saúde (OMS), na década de 1980, foi o grande marco na redução da prevalência global da doença. Desde então, o número de casos vem se reduzindo constantemente, e muitos países atingiram a meta de eliminação, com menos de um caso novo por 10.000 habitantes.

Existem, entretanto, países em que a prevalência tem decrescido de forma lenta, em especial na última década. Nesses países – com destaque para Índia e Brasil – há grande concentração de casos em áreas de menor desenvolvimento socioeconômico. A dificuldade de acesso da população aos serviços de saúde, a subnutrição e a aglomeração em pequenos espaços são responsáveis pela manutenção da cadeia de transmissão.

Os pacientes com a forma PB, em especial, representam desafio para os profissionais da saúde pouco treinados. A baixa sensibilidade dos testes laboratoriais disponíveis para o diagnóstico da forma PB torna-o eminentemente clínico e, nas formas iniciais da doença, os achados são por vezes muito discretos. De forma semelhante, os comunicantes dos casos-índice podem apresentar sinais incipientes de hanseníase, que passam despercebidos ao examinador menos atento. Estudos demonstraram a presença de *M. leprae* nas cavidades nasais dos

comunicantes, sem, entretanto, estabelecer relação direta entre este fato e o desenvolvimento futuro da doença ou a possibilidade de transmissão para outras pessoas na comunidade. O início insidioso dos sintomas e o mau treinamento das equipes de saúde levam ao desenvolvimento de incapacidades e atrasam o diagnóstico, preservando uma população infectada e infectante, que mantém a endemia.

Esforços têm sido feitos na tentativa de desenvolver testes laboratoriais capazes de detectar a infecção pelo *M. leprae* de forma precoce e auxiliar na tomada de decisão por parte dos profissionais de campo. Diferentes abordagens incluem a detecção de anticorpos séricos contra antígenos da bactéria; a pesquisa de material genético do bacilo em amostras clínicas; e a detecção da resposta imune celular contra antígenos de *M. leprae* (intradermoreação de Mitsuda).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método de amplificação de ácidos nucleicos que permite detectar pequenas quantidades de material genético em diferentes espécimes clínicos – biópsias, *swabs*, linfa, sangue – com alta especificidade. Seu uso na hanseníase engloba: o diagnóstico etiológico da doença; estudos de epidemiologia, transmissão e infecção em comunicantes; avaliação de resistência medicamentosa; estudos da genética e evolução da bactéria.

Particularmente em relação ao uso da PCR no diagnóstico, encontram-se na literatura diferentes formas de execução da técnica. Os estudos variam quanto à região amplificada do DNA e à amostra utilizada como substrato. Neste segundo quesito, é frequente o uso da biópsia cutânea – que apesar de prover grande quantidade de material para extração do DNA, e resultar sensibilidade satisfatória, é um método invasivo e de difícil execução no campo.

Neste trabalho, abordaremos o uso da PCR na detecção de material genético do bacilo em amostras de linfa, coletadas em papel filtro, provenientes dos lóbulos auriculares, cotovelos e joelhos de pacientes com hanseníase. Este material pode ser coletado de forma simples e pouco invasiva, não requerendo infraestrutura no local de coleta ou treinamento extensivo do profissional coletor. A possibilidade de conservação à temperatura ambiente permite seu envio a centros de referências, nos quais pode ser construído o aparato para realização do exame. Isto posto, a PCR em amostras de linfa pode se mostrar promissora como técnica de avaliação de pacientes e comunicantes, particularmente em zonas de vulnerabilidade social.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 AGENTE ETIOLÓGICO DA HANSENÍASE – *MYCOBACTERIUM LEPRAE*

A hanseníase é uma doença infecciosa causada pelo *Mycobacterium leprae*, agente identificado em 1875 por Armauer Hansen e o primeiro microrganismo especificamente ligado a uma doença (HANSEN, 1875; SCHREUDER; NOTO; RICHARDUS, 2016).

Existem evidências de que o bacilo de Hansen convive com o homem há muito tempo. Achados paleontológicos mostram o DNA de *M. leprae* em fósseis datando do primeiro século a.C. em Jerusalém (MATHESON et al., 2009) e crânios com alterações específicas de hanseníase na Índia datados do século 2 a.C. (ROBBINS et al, 2009). Descrições médicas compatíveis com hanseníase são encontradas em textos indianos e chineses pertencentes aos séculos 600 e 300 a.C., respectivamente.

O sequenciamento do genoma do *M. leprae* mostrou que o patógeno passou por um processo de evolução reducional, no qual perdeu material genético e transformou grande parte de genes ativos em pseudogenes. Comparado ao *M. tuberculosis*, *M. leprae* apresenta um genoma reduzido em mais de 1Mb e do qual apenas 49,5% codifica alguma proteína – o restante é constituído por pseudogenes e áreas não-codificantes (COLE et al, 2001). Esse modelo de sobrevivência, carregando apenas o “mínimo necessário”, provavelmente é responsável pela lenta reprodução da bactéria (tempo de duplicação ~ 14 dias) e pela obrigatoriedade de parasitismo intracelular, dependendo do metabolismo do hospedeiro para sobrevivência.

Gomez-Valero et al. (2007) estimam que a redução genômica do *M. leprae* ocorreu como um evento único, há 20 milhões de anos, relacionado a mudança de um estilo de vida livre da bactéria para o parasitismo intracelular (HAN et al., 2009). É provável que cepas ancestrais de *M. leprae* infectassem primatas e homínídeos há milhões de anos, tendo evoluído em conjunto com essas espécies e se adaptando a esse nicho parasitário (HAN; SILVA, 2014). Cerca de 2 milhões de anos atrás, com o surgimento dos primeiros *Homo*, alguma linhagem de homínídeos infectada pelo bacilo evoluiu até *Homo sapiens*, carregando consigo um ancestral que, hoje

reconhecemos como *M. leprae* e *M. lepromatosis* (uma bactéria causadora de formas difusas de hanseníase, em especial no México, descrita em 2009 por Han e colaboradores).

Estudos de polimorfismos genéticos mostram que o genoma do *M. leprae* se mantém bastante conservado, temporal e geograficamente. Variabilidade, quando existente, se concentra nos pseudogenes, mostrando que ainda há alguma pressão seletiva sobre as regiões codificantes (HAN; SILVA, 2014). Monot et al. (2009) observaram que, dentre *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) encontrados em genes codificantes, 42% e 58%, respectivamente, eram mudanças sinônimas e não sinônimas, com uma razão dN/dS de 0.70 – valores próximos a 1 indicam nenhuma ou pouca pressão seletiva, o que vem de encontro a pequena variação genética observada (ROCHA et al., 2006). A análise SNPs e *variable number tandem repeats* (VNTR) possibilitou agrupar diferentes cepas de *M. leprae* em grupos cuja distribuição geográfica é característica e acompanha os movimentos migratórios da humanidade (MONOT et al., 2005; MONOT et al., 2008). Através destes dados, é possível criar hipóteses quanto ao surgimento e disseminação da hanseníase ao longo da história mundial. Monot et al. (2008) sugerem que a doença se originou no leste africano, de onde se espalhou ao leste para Ásia, ao norte para o Oriente Médio e Europa e ao oeste para a África ocidental, chegando às Américas pelos movimentos de colonização.

Mycobacterium leprae é uma bactéria gram positiva pertencente à ordem Actinomycetales, família Mycobacteriaceae. É visualizado como um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) curvado, medindo 1 a 8µm de comprimento e 0,3µm de diâmetro. No hospedeiro, forma grupamentos de células característicos, chamados de globias. Até o momento, não foi possível cultivá-lo *in vitro*, sendo a inoculação nas patas do tatu-galinha (*Dasypus novemcinctus* – *nine-banded armadillo*) ou camundongos suscetíveis a única forma de cultivo do patógeno. A replicação, por divisão binária, é lenta e pode demorar até 14 dias. O microrganismo tem predileção por áreas frias do hospedeiro, crescendo em temperaturas ao redor de 30°C e infecta prioritariamente macrófagos e células de Schwann na bainha dos nervos (EICHELMANN, 2013).

2.2 EPIDEMIOLOGIA

Em estudo de 2016, Schreuder, Noto e Richardus afirmam: “Leprosy has been prevalent in almost every part of the world in some stage in history”. A distribuição ubíqua da bactéria, mesmo que em períodos históricos distintos, em países com climas variados, permanece um mistério. A incidência da doença, entretanto, vem diminuindo globalmente, mesmo antes da disponibilização de tratamento específico. Série histórica de casos novos detectados na Noruega mostra que, entre 1850 e 1920, essa taxa caiu de 39,9 para 0,3 casos/100.000 habitantes-ano, o que provavelmente se relaciona a melhorias na qualidade de vida da população, em especial melhores condições de nutrição (MEIMA et al., 2002; IRGENS, 1980).

Até 1946, ano de introdução da terapia com dapsona (FAGET, 1947), não havia tratamento específico para hanseníase. Injeções de óleos vegetais (*chaulmoogra e hydnocarpus oil*), com fracas propriedades antilepróticas, eram as únicas possibilidades (KAR; GUPTA, 2015). O uso da dapsona foi de grande importância no controle da doença até o desenvolvimento de cepas resistentes, por volta de 1960 (SCOLLARD et al., 2006). Frente a este cenário, a Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization* - WHO) instituiu, a partir de 1982, a poliquimioterapia (PQT) no tratamento da hanseníase, constituída por rifampicina e dapsona, associadas ou não a clofazimina (WHO, 1982).

O advento da PQT reduziu dramaticamente o número de doentes no mundo. Entre 1960 e 1980, estima-se um total de 10-12 milhões de infectados, número que caiu pela metade em 1991, chegando a 5,5 milhões (NOORDEEN; LOPEZ BRAVO; SUNDARESAN, 1992). Os resultados expressivos conseguidos com os primeiros anos de PQT levaram ao estabelecimento de metas mais audaciosas: eliminar a hanseníase até o ano 2000, atingindo uma prevalência de menos de 1 caso por 10.000 habitantes (WHO, 1991).

De fato, houve queda sustentada do número de casos detectados entre o período de 2000 (719.219 casos reportados) a 2006 (265.661 casos). Após esse período, entretanto, a prevalência parece ter atingido um patamar, com decréscimo lento e inferior ao esperado. Em 2016, foram relatados 214.783 casos novos detectados mundialmente, 4.043 casos a mais que no ano anterior. Esse aumento, que foge ao padrão de decréscimo dos últimos anos, provavelmente está ligado a

programas de busca ativa de casos e melhora nos sistemas de coleta de dados (WHO, 2017).

Quando analisamos a prevalência mundial da hanseníase em 2016, temos um total 171.948 pessoas em tratamento, o que equivale a 0,23 doentes por 10.000 habitantes – essa estatística, todavia, é composta por regiões tão discrepantes quanto o pacífico ocidental (0,03 doentes/10.000 habitantes) e o sudeste asiático (0,6 doentes/10.000 habitantes) (WHO, 2017).

Na realidade, enquanto estes números estão dentro da meta estipulada previamente, a hanseníase está longe de ser erradicada. Apesar da redução global da carga da doença, alguns países ainda constituem bolsões endêmicos onde a transmissão se mantém estável. Dos 214.783 casos reportados em 2016, 95,3% estão concentrados em países considerados “prioridades globais”. Índia (135.485 casos, 63%), Brasil (26.395 casos, 11,7%) e Indonésia (17.202 casos, 7,8%) sozinhos respondem por 82% dos casos novos detectados em 2016 (WHO, 2017).

Assim como no cenário mundial, nacionalmente vemos que há bolsões de hanseníase especialmente concentrados em áreas de baixa renda e subdesenvolvimento. Série histórica fornecida pelo Ministério da Saúde brasileiro (MS) mostra redução no número de casos detectados entre 2001 (26,61/100.000 habitantes) e 2016 (12,23/100.000 habitantes). Esses casos, entretanto, têm distribuição heterogênea ao longo do território nacional. Em 2016, taxas de prevalência/10.000 habitantes têm valores tão discrepantes quanto 7,39 no Tocantins; 7,71 no Mato Grosso; 4,03 no Maranhão e 0,25 em São Paulo; 0,09 no Rio Grande do Sul; 0,18 em Santa Catarina. (MS, 2017).

Uma análise ainda mais criteriosa dos dados apresentados pelo MS nos permite avaliar outros marcadores de qualidade na atenção à hanseníase:

I. Casos novos em menores de 15 anos: devido ao longo período de incubação da doença, são considerados marcadores de circulação do bacilo na comunidade e de mau controle da epidemia. No Brasil, em 2016, observamos (números fornecidos por 100.000 habitantes): 8,92 na região Norte; 5,78 na região Nordeste; 6,42 na região Centro-Oeste; 0,93 na região Sudeste; 0,10 na região Sul;

II. Casos novos com grau 2 de incapacidade (G2D) ao diagnóstico: evidência da demora no diagnóstico e início de tratamento, demonstrando dificuldade de acesso aos sistemas de saúde e falta de capacitação

profissional destes serviços. Do total de casos novos, apresentaram G2D: 7,3% na região Norte; 6,7% na região Nordeste; 6,3% na região Centro-Oeste; 13,1% na região Sudeste; 11,5% na região Sul. Taxas maiores na região Sul e Sudeste provavelmente estão associadas a baixo nível de alerta dos profissionais e da população quanto à doença, retardando o diagnóstico. A Estratégia Global para Hanseníase 2016-2020 pretende alcançar menos que 1 paciente com G2D por milhão de habitante (WHO, 2016);

III. Porcentagem de casos curados: são considerados curados os pacientes que receberam corretamente o tratamento preconizado pela WHO para sua forma clínica da doença. Este indicador aponta qualidade do serviço de saúde no seguimento dos pacientes, bem como redução da carga circulante de bactérias na comunidade. É desejável que esses valores sejam superiores a 85% (WHO, 2016). Na região Norte, foram curados 81,1%; no Nordeste, 80,3%; no Centro-Oeste, 80,5%; no Sudeste, 87,1%; no Sul, 90,6%;

IV. Porcentagem de contatos avaliados: também é um indicador da qualidade do serviço de saúde na busca ativa de novos casos e interrupção da cadeia de transmissão. De todos os contatos registrados, foram avaliados: 76,7% na região Norte; 72,7% na região Nordeste; 82,7% na região Centro-Oeste; 88,1% na região Sudeste; 91,1% na região Sul.

Há ainda que se levar em conta a possibilidade de subnotificação dos casos, como demonstrado por trabalhos de busca ativa de pacientes no Brasil e na Índia. Tais estudos mostram que, mesmo em áreas oficialmente consideradas de baixa endemicidade, existem mais casos não diagnosticados do que a taxa de detecção de casos novos reportada. Estima-se que o número real de doentes possa chegar a oito vezes o número oficial, mostrando que há necessidade de políticas de busca ativa e que essas regiões ainda estão muito longe de atingir as metas de eliminação da hanseníase (SALGADO et al., 2018; WHO, 2017).

2.3 TRANSMISSÃO

Os mecanismos de transmissão do *M. leprae* ainda não estão completamente elucidados. Acredita-se que a principal forma de contágio seja por via aérea, através de contato com indivíduos bacilíferos. Contudo, a existência de casos zoonóticos e a não identificação de casos-índice para todos os pacientes ainda levantam dúvidas quanto à possibilidade de outras formas de transmissão (BRATSCHI et al., 2015).

A transmissão inter-humana é considerada a principal via de contágio. Em revisão sistemática da literatura, Bratschi e colaboradores (2015) afirmam que, em favor desta teoria, podemos levar em conta as evidências que mostram os agrupamentos de casos e o risco aumentado de desenvolvimento da doença em pessoas em contato com portadores – que se correlaciona positivamente com o grau de convivência e a carga bacilar do caso índice. Ademais, já foi demonstrado que contatos domiciliares de pacientes com hanseníase carregam o bacilo em suas narinas, mesmo que transitoriamente. É questionável se a presença de *M. leprae* no trato respiratório superior é indicativo de desenvolvimento futuro da doença ou possibilidade de transmissão (ARAÚJO, 2012).

Inoculação direta do bacilo na pele através de feridas ou procedimentos tem sido relatada, porém em casos esporádicos. Apesar da possibilidade de haver contágio por essa via, estes episódios parecem ser extraordinários e de pouca importância epidemiológica (BRATSCHI, 2015).

Finalmente, a transmissão zoonótica ou ambiental também foi estudada. Sabe-se que o bacilo infecta tatus (*D. novemcinctus*), em especial no sul dos Estados Unidos, onde se observa possível transmissão entre animais e humanos (BRATSCHI, 2015). Truman et al. (2011) demonstraram que uma cepa específica de *M. leprae*, não descrita em outras regiões, infectava tatus e humanos no estado de Louisiana, EUA, indicando um provável comportamento zoonótico nessa região. Outros estudos mostram que o bacilo de Hansen pode sobreviver por dias na água ou no solo, porém não é possível estabelecer a viabilidade dessas bactérias ou ligá-las a casos humanos (BRATSCHI, 2015).

2.4 GENÉTICA E IMUNOLOGIA DO HOSPEDEIRO

A evolução clínica de um paciente infectado pelo bacilo de Hansen é muito variável – o indivíduo pode apresentar uma infecção subclínica com cura espontânea ou evoluir para formas disseminadas da doença, com um amplo espectro de manifestações entre esses extremos. A homogeneidade genética entre as linhagens de *M. leprae* distribuídas pelo globo não justifica tamanha diversidade de quadros clínicos; é a resposta imune do paciente, definida pelo seu *background* genético, a principal determinante do fenótipo clínico. Estudos sugerem que a susceptibilidade à doença segue um modelo de herança poligênico, com vários genes candidatos a associações: MHC/HLA de classe I e II, *LTA*, *IFNG*, *IL10*, *IL12*, *PARK2*, *NOD2*, *SCL11A1*, dentro outros (SAUER et al., 2015).

O papel dos linfócitos T CD4 é central no desenvolvimento da doença. A depender de sua predisposição genética, o indivíduo infectado apresentará predomínio de resposta imunológica de perfil Th1 ou Th2 contra o bacilo. Naqueles em que predomina a resposta Th1, marcada pela secreção de IFN- γ , há resposta imune mediada por células (*cell mediated immunity* – CMI), que é capaz de eliminar ou ao menos conter a infecção pelo bacilo. Nos indivíduos com resposta do tipo Th2, há maior secreção de IL-4, com consequente estímulo à imunidade humoral, com produção de anticorpos por linfócitos B. Como o *M. leprae* é um patógeno intracelular, essa imunidade é pouco efetiva e esses pacientes cursam com doenças disseminadas (SAINI et al., 2017; NATH et al., 2015).

2.5 CLASSIFICAÇÃO E QUADRO CLÍNICO

Frente à multiplicidade de apresentações clínicas, diversos sistemas de classificação para a hanseníase foram usados ao longo do tempo. Atualmente, dois são mais difundidos e têm diferentes aplicações práticas:

I. Classificação operacional proposta pela WHO em 1998, que divide os pacientes em paucibacilares (PB – que apresentam até 5 lesões) e multibacilares (MB – que apresentam mais que 5 lesões) (WHO, 1998);

II. Classificação de Ridley e Jopling (R&J), proposta por estes autores em 1966 e que divide o espectro da doença em cinco grupos: duas formas

polares e três formas intermediárias entre esses polos (RIDLEY; JOPLING, 1966).

A classificação operacional da WHO é útil por não depender de treinamento específico no reconhecimento de diferentes lesões cutâneas ou da disponibilidade de baciloscopia, possibilitando uma decisão diagnóstica rápida quanto ao tratamento a instituir ao paciente (RODRIGUES JÚNIOR, 2016).

Por sua vez, a classificação de R&J é mais adequada a serviços de referência e ao uso em pesquisa, por caracterizar de maneira mais detalhada os pacientes e, portanto, será prioritariamente utilizada neste texto.

Ridley e Jopling (1966) dividiram os portadores de hanseníase em cinco grupos distintos, com base em critérios clínicos (número, tamanho e aspecto das lesões) e histológicos (composição e organização dos granulomas). As descrições feitas pelos autores viriam, posteriormente, a concordar com as descobertas de perfis imunológicos específicos em cada grupo de doentes.

Em uma extremidade do espectro estão os pacientes tuberculoides (TT), com resposta imune Th1 e forte CMI. Estes indivíduos apresentam uma ou poucas lesões, eritematosas, infiltradas, bem delimitadas, por vezes com rarefação pilosa, anidrose e hipoestesia. Não é raro o achado de espessamento neural em troncos adjacentes à lesão. Histologicamente, essas lesões apresentam granulomas epitelioides na derme circundados por uma população de linfócitos. BAAR não são visualizados (RIDLEY; JOPLING, 1966; TALHARI; TALHARI; PENNA, 2015).

Na extremidade oposta do espectro, situam-se os pacientes Virchowianos (LL), cuja imunidade é predominantemente Th2/humoral. Estes apresentam lesões de morfologia variada, de máculas a nódulos, difusas, por vezes com bordas mal definidas e infiltração de toda a pele. O acometimento neural pode ser disseminado, com várias áreas de hipoestesia. Ocorre perda de pelos (madarose) e infiltração da face. A histologia mostra macrófagos espumosos, vacuolizados e repletos de BAAR agrupados em globias (RIDLEY; JOPLING, 1966; TALHARI; TALHARI; PENNA, 2015).

Entre os polos TT e LL, foram individualizadas três formas intermediárias (*borderline*) da doença: dimorfa-tuberculoide (BT), dimorfa-dimorfa (BB) e dimorfa-virchowiana (BL). Esses pacientes apresentam características intermediárias entre os polos pois têm uma resposta imunológica mista entre Th1/Th2. Ao contrário dos indivíduos polares, estes costumam apresentar flutuações da imunidade contra o

bacilo, que pode tornar-se mais efetiva à medida que a carga bacilar diminui com uso da PQT ou pode caminhar para formas anérgicas se a doença não for tratada (TALHARI; TALHARI; PENNA, 2015).

2.6 ACOMETIMENTO NEUROLÓGICO E HANSENÍASE NEURAL PRIMÁRIA

O acometimento neural está presente em todos os pacientes com hanseníase, sendo a presença de áreas cutâneas hipoestésicas o sinal mais precoce da doença. O bacilo atinge os nervos periféricos através da circulação sanguínea, infectando o endotélio do *vasa nervorum*. Focos de inflamação permitem a internalização do bacilo ao endoneuro, provavelmente carregado por macrófagos. Nesta localização, infecta as células de Schwann (SC), pelas quais tem predileção (SCOLLARD; TRUMAN; EBENEZER, 2015).

Já foi demonstrado que a internalização do patógeno nas SC é mediada por antígenos específicos, em especial o PGL-1. Este glicolipídio presente na parede celular do *M. leprae* possui domínios que interagem com as moléculas de laminina-2 presentes na lâmina basal do complexo célula de Schwann-axônio. Mais especificamente, porções do PGL-1 interagem com a subunidade $\alpha 2$ da laminina, com expressão restrita a esse tecido, o que justifica a predileção do agente por nervos periféricos (RAMBUKKANA, 2001). A presença do bacilo no nervo estimula reação inflamatória local que leva aos achados clínicos observados. Semelhantemente ao que se observa nas lesões cutâneas, em pacientes tuberculoídes a formação de granulomas pode ter efeito destrutivo nas estruturas locais. Ademais, o edema local pode levar a episódios de isquemia-reperfusão, também lesando o nervo (SCOLLARD; TRUMAN; EBENEZER, 2015). Biópsias de nervo demonstram aumento da expressão de TNF (KHANOLKAR-YOUNG et al., 1995) e metaloproteinases (TELES et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2010), reforçando o microambiente inflamatório nos fascículos afetados.

Clinicamente, alguns pacientes podem apresentar-se apenas com sinais e sintomas neurológicos, sem lesões cutâneas. Estes casos, chamados de hanseníase neural primária (*primary neural leprosy* – PNL) correspondem a uma porção variável do total de casos de hanseníase. Santos et al. (2017) mostraram prevalência de 22,1% de PNL entre 2014 e 2016 em um serviço médico, em

contraste com relatos da literatura entre 5,5% a 17,1% (TALWAR; JAH; TIWARI, 1992), o que provavelmente se relaciona à ausência de testes específicos para a doença, levando a subdiagnóstico ou diagnóstico tardio.

Revisão feita por Garbino e colaboradores (2013) mostra que o acometimento neural parece ser primariamente sensitivo, em especial térmico e doloroso, e assimétrico (mononeuropatia múltipla). Os nervos mais acometidos são o ulnar, radial superficial, sural, fibular superficial e tibial.

2.7 EXAMES COMPLEMENTARES NO DIAGNÓSTICO

2.7.1 Baciloscopia

A baciloscopia de esfregaços de linfa para pesquisa de BAAR é uma técnica útil por diversas razões: faz parte dos critérios diagnósticos definidos pela WHO, bem como da classificação dos pacientes entre multi e paucibacilares (WHO, 1998). Permite, ainda, a avaliação: i) da morfologia dos bacilos, que é um indicativo da viabilidade destes e ii) da carga bacilar do paciente, expressa em escala logarítmica variável de 0 a 6 (LASTÓRIA; MORGADO DE ABREU, 2014).

A técnica, entretanto, tem sensibilidade variável, sendo por definição negativa nos indivíduos TT e fracamente positiva nos BT. Estudo retrospectivo realizado em Recife mostrou que, de um total de 1.213 pacientes, a baciloscopia foi positiva em apenas 360 (29,7%) (CAVALCANTI et al., 2012). Van Brakel e colaboradores (2005) relatam uma coorte de 303 pacientes MB na Índia, dos quais 63,7% têm baciloscopia negativa.

2.7.2 Histologia

A coleta de amostra de pele ou nervo para estudo histológico permite caracterizar o processo inflamatório local e quantificar os bacilos presentes na amostra. Os achados microscópicos no polo tuberculoide são a formação de granulomas de células epitelioides e células de Langhans associados a infiltrado inflamatório rico em linfócitos, ocupando a derme e encostando na epiderme, muitas

vezes com destruição de nervos e anexos. BAAR são ausentes ou raros. Por outro lado, no polo lepromatoso, os granulomas são desorganizados e constituídos por macrófagos espumosos (células de Virchow), repletos de bacilos, formando globias. Linfócitos são raros e há uma faixa de tecido conjuntivo separando a epiderme do processo inflamatório dérmico (faixa de Unna). Quanto aos pacientes dimorfos, na medida em que caminham do polo de resistência ao polo anérgico, gradativamente ocorre indiferenciação dos granulomas e aumento do índice baciloscópico. A avaliação desses fatores em conjunto permite classificá-los dentro do espectro da doença. (RIDLEY; JOPLING, 1966; FOSS, 1999; LASTÓRIA; MORGADO DE ABREU, 2014).

2.7.3 Intradermorreação de Mitsuda

Reações cutâneas à antígenos de *M. leprae* são formas de avaliação da imunidade celular do indivíduo contra a bactéria. A reação de Mitsuda consiste na inoculação intradérmica de cepas inativadas, com leitura da resposta em quatro semanas. É considerado positivo quando observa-se uma pápula de 5mm ou mais – esta é a representação cutânea dos granulomas observados histologicamente em indivíduos tuberculóides. O teste não tem valor diagnóstico, mas permite inferir o tipo de resposta imune do doente, já que a positividade da reação diminui em direção ao polo lepromatoso (LASTÓRIA; MORGADO DE ABREU, 2014; MITSUDA, 1919).

2.7.4 Sorologia

A detecção de anticorpos contra antígenos do *M. leprae* é estudada como forma de diagnosticar e classificar os doentes, além de ser um método aplicável ao rastreio dos comunicantes por seu baixo custo e facilidade de execução. Vários substratos são usados para ELISA ou testes laterais de detecção rápida (ML Flow), com destaque para o glicopeptídeo fenólico (PGL-1) e uma proteína de fusão denominada LID-1, além de conjugados entre estas duas moléculas (FABRI et al., 2015).

Moura et al. (2008), em revisão da literatura, encontraram valores de sensibilidade para sorologia anti-PGL-1 variáveis entre 51,2% a 97,4% em MB e

6,9% a 57,3% em PB, demonstrando que, para diagnóstico, essa metodologia ainda é mais adequada aos pacientes do polo lepromatoso.

Vários estudos corroboram a associação entre a positividade da sorologia anti-PGL-1 e o desenvolvimento de hanseníase no futuro. Bazan-Furini e colaboradores (2011) avaliaram a presença de anticorpos anti-PGL-1 em contatos domiciliares de hanseníase, encontrando positividade em 18,1% dos indivíduos avaliados, dos quais 3,4% desenvolveram hanseníase BT em um ano de seguimento. Outro estudo testou contatos domiciliares de pacientes MB, com risco relativo de 7,2 para desenvolvimento de hanseníase naqueles com sorologia positiva (DOUGLAS et al., 2004). Especula-se ainda que indivíduos com sorologia positiva possam ser portadores de infecção subclínica e participar da transmissão do bacilo na população (ARAÚJO et al, 2012; ARAÚJO et al., 2016).

Títulos de anticorpos anti-PGL-1 e anti-LID-1 decrescem durante o tratamento com PQT, podendo auxiliar na avaliação da resposta terapêutica (DUTHIE et al., 2011; RADA et al., 2012).

2.7.5 Eletrofisiologia

Os estudos de eletrofisiologia permitem avaliar o grau e localização das lesões neurais, podem guiar o sítio de biópsia na PNL e detectam alterações precoces em pacientes oligo ou assintomáticos, antes que seja possível sua detecção ao exame clínico (SANTOS et al. 2017; VAN BRAKEL et al. 2008). Apesar de não haver padrão eletroneuromiográfico patognomônico da doença, na maioria das vezes observa-se uma mononeuropatia múltipla assimétrica, sensitivo-motora, com focos de desmielinização. Outros padrões encontrados em menor frequência são o de mononeuropatia isolada em pacientes tuberculoides e polineuropatia distal em pacientes Virchowianos (GARBINO; HEISE; MARQUES, 2016).

2.7.6 Exames de imagem

Exames de imagem, em particular a ressonância nuclear magnética (MRI) e a ultrassonografia (US) têm sido utilizados na avaliação morfológica de nervos periféricos em pacientes com hanseníase. Artigo de Matinoli et al. (2002) comparou

os métodos, demonstrando sua sensibilidade na detecção não só de sinais de neuropatia hansênica, como aumento do volume dos nervos e anormalidades fasciculares, mas também de neurite nos episódios reacionais, como edema, hipercaptação de contraste na MRI e aumento da vascularização ao Doppler ultrassonográfico. Jain e colaboradores (2009) mostraram que a avaliação dos nervos por US é mais sensível na detecção de alterações quando comparada à avaliação clínica. Outros estudos têm evidenciado que o aumento da área de secção do nervo e a assimetria desta medida em relação ao nervo contralateral auxiliam no diagnóstico e seguimento da neuropatia hansênica (FRADE et al., 2013; LUGAO et al., 2016).

2.7.7 Avaliação da imunidade celular

Testes que visam a avaliar a resposta imune celular a antígenos de *M. leprae* vem sendo propostos como uma alternativa diagnóstica, em especial para os casos PB. O teste de Mitsuda, proposto há quase um século, já era uma forma de avaliação desta imunidade, porém não é capaz de detectar infecção. À semelhança do que vem sendo usado para diagnóstico de tuberculose, ensaios de liberação de IFN- γ (*interferon-gamma release assay* – IGRA) podem ser um caminho para identificar portadores de formas paucibacilares. Muitas moléculas têm sido testadas como estimuladoras nestes testes; entretanto, especialmente em áreas endêmicas para tuberculose e onde há cobertura vacinal com BCG, pode haver reatividade cruzada (GELUK, 2013a). Outros estudos, por sua vez, avaliam a secreção de outros mediadores inflamatórios após exposição, na expectativa que possam discernir indivíduos infectados, em especial em populações endêmicas (GELUK, 2013b). Estudos em pacientes com tuberculose mostram que a razão entre os níveis circulantes de IFN- γ e IL-10 (esta mediadora de resposta Th2) se relacionam com a severidade da doença (HASAN et al., 2009). É possível que um painel de citocinas, associado a detecção de anticorpos anti-PGL-1, possa acessar mais acuradamente o estado imunológico do sujeito e permita uma decisão terapêutica no futuro (CORSTJENS et al., 2011).

2.7.8 Reação em cadeia da polimerase no estudo da hanseníase

Os primeiros trabalhos utilizando a reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction* – PCR) na detecção do *M. leprae* em pacientes datam de 1989 (WOODS; COLE, 1989; HARTSKEERL; DE WIT; KLATSER, 1989). Ao longo de quase 30 anos, pesquisadores têm buscado aprimorar a técnica, testando novos alvos genéticos, amostras clínicas, métodos de extração do material genético, com extensa aplicabilidade clínica. Martinez et al. realizaram revisão da literatura existente sobre o assunto em 2014 e destacam os seguintes empregos para a PCR:

2.7.8.1 Detecção do bacilo e diagnóstico

Estudos mostram que técnicas de PCR e, principalmente, qPCR, podem detectar quantidades muito pequenas de bacilos. Truman et al. (2008) mostraram um limiar de detecção da ordem de 10fg de DNA, utilizando DNA purificado do bacilo, o que equivale a aproximadamente 3 genomas DE *M. leprae*. Em uma condição mais próxima à realidade das amostras clínicas, estimou-se que um número mínimo de 300 bactérias foi necessário para a detecção em amostras extraídas das patas de camundongos, número que ainda é muito inferior aos 10⁴ bacilos necessários para detecção por baciloscopia convencional.

Diversas amostras clínicas foram utilizadas na pesquisa do bacilo – biópsia cutânea, raspado dérmico, nervos, urina, *swabs* nasais e orais, sangue, lesões oculares; vários genes foram considerados como alvo para amplificação – genes para os antígenos de 36kDa, 18kDa e 65kDa, complexo 85, 16sRNA e sequências repetitivas, como RLEP. A sensibilidade do exame é variável na literatura, principalmente por não haver padronização e cada laboratório desenvolver protocolos individuais. Em grupos de indivíduos PB, revisão da literatura mostrou sensibilidade variável entre 33%-83% (MARTINEZ et al. 2014). Estudo comparativo entre 4 genes-alvo (RLEP, 16s RNA, *sodA* e Ag85B), utilizando qPCR em biópsias de pele, mostrou sensibilidade de 91,5% para o gene RLEP, com especificidade de 73,3% (atribuída a quatro casos com diagnóstico de outras dermatoses que os autores acreditam terem sido erros diagnósticos) e uma área sobe a curva ROC de 82,4%, sendo superior aos demais *primers* testados (MARTINEZ et al., 2011).

A técnica de qPCR permite, ainda, quantificar o material genético presente na amostra. Truman et al. (2008) demonstraram forte relação entre a contagem molecular utilizando *primers* para RLEP e aquela feita por microscopia convencional, com coeficiente de Pearson $r^2=0,96$. Rudeeaneksin e cols. (2008) demonstraram resultados semelhantes utilizando 16s RNA, com concordância entre as contagens molecular e microscópica, $r^2=0,608$. Neste mesmo estudo, pacientes MB tiveram limite de detecção (*cycle threshold* – Ct) menores que pacientes PB. Esses dados falam a favor da possibilidade de utilização da qPCR para estimar a carga bacilar do indivíduo, com possíveis implicações no esquema de tratamento escolhido.

2.7.8.2 Monitorização do tratamento

Alguns estudos tentaram avaliar o sucesso do tratamento com PQT pela negativação da PCR. De fato, há uma redução inicial na positividade do exame, como demonstrado por Kampirapap et al. em 1998: utilizando PCR para um fragmento do gene *pra* de 531pb em biópsias de pele, os pesquisadores observaram que, dentre os indivíduos com PCR positiva ao início do tratamento, 54,3% e 50,3% mantinham positividade após 1 e 6 meses, respectivamente, no grupo MB; e 61,8% e 53,8% no grupo PB. O lento *clearance* dos bacilos após o tratamento parece inviabilizar o uso do DNA como método de controle do sucesso terapêutico, como demonstrado por estudo que encontrou PCR positiva em amostras de indivíduos com diagnóstico de hanseníase indeterminada, seis a oito anos após o tratamento (SANTOS et al., 2001).

Neste sentido, autores tentaram utilizar a detecção de RNA pelo fato deste ácido nucleico ter maior *turnover* e, portanto, sua presença estar associada a bacilos viáveis. Lini et al. (2009) quantificaram DNA e mRNA de *hsp18* em biópsias de pele de pacientes lepromatosos ao longo do tratamento e verificaram que, 24 meses após início da PQT, mRNA não podia mais ser detectado nos espécimes, apesar da detecção de DNA se manter.

Técnicas de PCR também podem ser usadas para a avaliação de resistência bacilar a antimicrobianos. A avaliação convencional de resistência, conforme descrita por Shepard em 1960 é feita pela inoculação de *M. leprae* obtido de pacientes em patas de camundongos, que recebem antibióticos. O resultado é

obtido após 12 meses, observando o crescimento ou não dos bacilos no local de inoculação – uma técnica, portanto, cara e demorada. Com o melhor entendimento do genoma do bacilo, notou-se que as resistências a rifampicina, dapsona e ofloxacina estão ligadas a mutações em regiões específicas dos genes *rpoB*, *folP1* e *gyrA*, respectivamente. A PCR permite amplificar estas regiões para posterior sequenciamento e identificação de mutações, fornecendo uma informação de grande valor no manejo clínico do paciente de forma rápida e mais barata (WILLIAMS; GILLIS, 2012).

2.7.8.3 Estudo da transmissão e avaliação de comunicantes

A possibilidade de detectar pequeno número de bacilos tem ajudado no esclarecimento das vias de transmissão da doença. Diversos estudos demonstram a presença da bactéria no trato respiratório superior. Martinez et al (2008), em revisão da literatura, relatam positividade variável da PCR em *swab* nasal entre 1,8% a 31% em contatos domiciliares e moradores de áreas endêmicas. Um outro estudo avaliou PCR em amostras de *swab* nasal, biópsia de turbina nasal e sangue periférico, além de sorologia anti-PGL-1, de pacientes e seus contatos domiciliares. Nestes últimos, PCR foi positiva em 49% em *swabs* nasais, 53,8% em biópsias de turbina e 6,7% no sangue. Sorologia foi positiva em 18,3% dos contatos. Após seguimento desta coorte, observou-se aumento do risco de desenvolvimento de doença nos indivíduos com PCR positiva no sangue (risco relativo 5,4, IC 95% 1,3-23,62) e sorologia positiva (risco relativo 5,97, IC 95% 1,45-24,5). Estes achados reforçam a hipótese da transmissão aérea do bacilo, com disseminação hematogênica para os nervos, bem como a possível relevância dos portadores assintomáticos na manutenção da endemia. Além disso, definem dois exames cuja positividade alerta para a necessidade de seguimento mais intensivo pelo risco de doença no futuro. (ARAÚJO et al., 2016).

3 JUSTIFICATIVA

A ausência de um exame laboratorial “padrão ouro” que auxilie no diagnóstico etiológico da hanseníase, em especial nos casos PB, atrasa o diagnóstico e, dessa forma, leva à progressão da doença para incapacidade. É necessário o desenvolvimento de um teste aplicável em campo, cujos resultados possam ser obtidos rapidamente para auxílio na decisão diagnóstica.

A dificuldade na avaliação de pacientes PB e comunicantes, cujo quadro clínico é por vezes frustrante, enseja o desenvolvimento de ferramentas diagnósticas sensíveis na detecção da infecção pelo *M. leprae*.

Ademais, é fundamental que se comparem os *primers* descritos na literatura em sua acurácia diagnóstica, posto que a sensibilidade da PCR é influenciada pelo tamanho do *amplicon*, por características intrínsecas aos *primers* e pelo número de cópias do alvo no genoma de interesse.

Frente a este cenário, a coleta de linfa em papel filtro é um método ágil e pouco invasivo para obtenção de amostras de DNA, adequado à situação de pouca infraestrutura frequentemente encontrada nos bolsões de hanseníase. Permite, ainda, o envio destes espécimes a centros de referência, nos quais pode-se estabelecer um aparato para realização da PCR e prover auxílio aos profissionais de campo.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os resultados da PCR em amostras de DNA extraído de linfa coletada em papel filtro de pacientes com hanseníase, nas formas PB e MB, utilizando 4 pares de *primers* descritos na literatura.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Padronizar a extração do DNA de amostras de linfa, coletadas em papel filtro, como substrato para PCR no diagnóstico de hanseníase;
- II. Comparar a frequência da positividade da PCR com 4 pares de *primers* para o diagnóstico de hanseníase descritos na literatura;
- III. Comparar a frequência da positividade da PCR com os resultados da baciloscopia e sorologia anti-PGL-1.

5 CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HC – FMRP), processo CAAE 38527314.0.1001.5440, parecer 994.617, de 19 de março de 2015.

A guarda e uso das amostras coletadas previamente ao início deste trabalho foi aprovada pelo mesmo comitê, processo HCRP nº3605/2006.

5.2 CASUÍSTICA

5.2.1 Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos no estudo pacientes com diagnóstico clínico-laboratorial de hanseníase, virgens de tratamento, de acordo com os critérios definidos pela WHO em 1997:

- I. Lesões cutâneas eritematosas ou hipopigmentadas com redução de sensibilidade;
- II. Acometimento de nervos periféricos, demonstrado por espessamento e perda de sensibilidade;
- III. Esfregaço de linfa positivo para BAAR.

O laboratório de Dermatologia do HC-FMRP-USP conta com um banco de amostras de linfa colhidas de pacientes atendidos no Ambulatório de Hanseníase deste hospital no período de 2006 a 2010. Foram selecionadas aleatoriamente 39 amostras que se enquadravam nos critérios acima descritos para participação no estudo, que constituem o grupo geral de participantes. Além destes, para a fase inicial de padronização dos métodos, três pacientes multibacilares, com BI maior ou igual a 2+, forneceram amostras recentes de linfa e compuseram um grupo piloto do estudo.

5.2.2 Classificação dos pacientes

Os pacientes foram classificados seguindo a classificação de Ridley e Jopling em tuberculoides (TT), dimorfo-tuberculoides (BT), dimorfo-dimorfos (BB), dimorfo-Virchowianos (BL), Virchowianos (LL) e indeterminados (I), de acordo com critérios clínico-laboratoriais.

Posteriormente, foram divididos em dois grupos: paucibacilares (PB), compreendendo os I, TT e BT, nos quais não foram encontrados bacilos na baciloscopia ou biópsia; e multibacilares (MB), compreendendo os BT com bacilos presentes na baciloscopia e/ou biópsia, BB, BL e LL.

5.2.3 Caracterização da amostra

O grupo de pacientes é composto por 39 indivíduos, dos quais 12 (30,76 %) são PB e 27 (69,23%) são MB.

No grupo PB, 41,66% são mulheres e 58,33% são homens. A idade dos pacientes varia entre 23 e 61 anos, com mediana de 40 anos. Os pacientes estão classificados da seguinte maneira: 2 I (16,66%), 5 TT (41,66%) e 5 BT (41,66%).

No grupo MB, 22,22% são mulheres e 77,77% são homens. A idade dos pacientes varia entre 17 e 73 anos, com mediana de 50 anos. A classificação de acordo com Ridley e Jopling é a seguinte: 2 BT (7,40%), 4 BB (14,81%), 8 BL (29,62%) e 13 LL (48,14%).

Além do grupo principal de pacientes, foram utilizadas amostras recentes coletadas de três pacientes multibacilares para padronização dos métodos, constituindo um grupo piloto do estudo.

Tabela 1 – Caracterização da amostra de pacientes segundo a classificação operacional da WHO e Ridley-Jopling

	Classificação Operacional		P-valor
	PB N = 12	MB N = 27	
Idade (anos) – mediana (IQR)	40 (29,3-49,8)	50 (40-56)	0,112
Gênero	N (%)	N (%)	0,262
Masculino	7 (58,33)	21 (77,77)	
Feminino	5 (41,66)	6 (22,22)	
Classificação R&J	N (%)	N (%)	
I	2 (15,38)		
TT	5 (41,66)		
BT	5 (41,66)	2 (7,40)	
BB		4 (14,81)	
BL		8 (29,62)	
LL		13 (48,14)	

IQR: intervalo inter-quartil

5.3 MATERIAIS E MÉTODOS

5.3.1 Coleta de amostras de linfa

A coleta de amostra de raspado dérmico foi realizada de acordo com as orientações da *International Federation of Anti-Leprosy Associations* (ILEP) com adaptações para coleta de material em papel filtro. A região de coleta é higienizada com álcool e submetida a isquemia local com pinça hemostática, seguida de incisão superficial da pele com lâmina de bisturi estéril. Em seguida, a lâmina é utilizada para raspar o leito da incisão e o material resultante é alocado em lâminas de vidro para microscopia. Realiza-se então novo raspado, desta vez pondo o esfregaço em papel filtro. Os mesmos passos são repetidos para todos os sítios de coleta: lóbulos auriculares, face posterior dos cotovelos e face anterior dos joelhos.

As amostras para microscopia seguem a rotina do serviço para coloração por Ziehl-Neelsen e contagem de bacilos – a baciloscopia foi considerada positiva quando encontrados bacilos em ao menos um dos sítios examinados. As amostras coletadas em papel filtro são utilizadas para extração de DNA.

Para o grupo piloto de três pacientes, antes da coleta do raspado dérmico, foi coletada, em papel filtro distinto, uma amostra da linfa que flui da incisão, nos três sítios relatados e também de lesão cutânea.

5.3.2 Eluição do DNA das amostras

Após coleta, o papel filtro é armazenado em envelope a temperatura ambiente. Para eluição do DNA, a área do papel contendo a amostra é recortada e acondicionada em microtubo, ao qual se acrescenta água Milli-Q até cobertura do papel (100 a 200 μ L). O tubo é então incubado a 95°C por 15 minutos e armazenado em freezer a -20°C. As amostras foram coletadas e o DNA eluído à época do seguimento dos pacientes no HC-FMRP (2006-2010), sendo armazenadas no banco de amostras desde então.

No grupo piloto, as amostras correspondentes a orelhas, cotovelos e joelhos foram agrupadas em um *pool* para realização das PCRs, resultando então em quatro amostras por paciente: *Pool* de linfa e raspado dérmico de orelhas, cotovelos e joelhos; linfa e raspado dérmico de lesão cutânea.

5.3.3 Extração do DNA das amostras

A extração e purificação do DNA foi realizada utilizando o kit NucleoSpin Tissue XS (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha), seguindo as orientações do fornecedor para amostras de sangue em papel filtro.

Os fragmentos de papel filtro e líquido eluído são alocados em microtubo, ao qual são acrescentados 160 μ L de buffer T1, seguindo incubação a 94°C por 10 minutos. Após esse período, adicionam-se 16 μ L de proteinase K e incuba-se a amostra a 56°C por 1 hora. A porção líquida é transferida para um novo tubo, ao qual acrescenta-se 160 μ L de buffer B3, com incubação a 70°C por 5 minutos. A seguir, 160 μ L de etanol 100% são acrescentados e procede-se a purificação. A amostra é aplicada a coluna de sílica e centrifugada a 11.000g por 1 minuto. O filtrado é descartado. São realizados mais dois ciclos de centrifugação a 11.000g, com adição de 50 μ L de buffer B5 cada, o primeiro por 1 minuto e o segundo por 2 minutos, novamente com descarte do filtrado. Finalmente, o DNA presente na coluna é eluído

pela adição em 30µL de buffer BE e centrifugação a 11.000g por 1 minuto. A solução final é incubada a 90°C por 8 minutos para remoção dos resíduos de etanol.

Por motivos operacionais, optamos por realizar a extração de todas as amostras de um mesmo paciente em um único tubo, gerando assim um *pool* das amostras representativo dos sítios de coleta.

Medidas da concentração de DNA total nas amostras foram realizadas utilizando espectrofotômetro NanoVue (GE Healthcare Bio-Sciences, USA). Os dados estão resumidos na tabela 2.

Tabela 2 – Quantificação e razão de absorbância a 260nm e 280nm do DNA extraído das amostras de linfa segundo os métodos de extração por eluição com água e por kit comercial

	Eluição	Kit	P
Concentração de DNA (ng/µL)			
- Mediana (IQR)	25,5 (17-32,5)	101,0 (87,4-111)	<0,001
A260/280 - Média ± SD	1,4 ± 0,184	1,56 ± 0,184	0,003

IQR: intervalo inter-quartil

5.3.4 Reação em cadeia da polimerase

A PCR foi realizada individualmente para cada par de *primers*, de acordo com protocolos descritos na literatura, com eventuais modificações necessárias à padronização em nosso laboratório. Para cada reação, além das amostras em questão, foram utilizadas como controle positivos amostras de DNA extraído de biópsias de pele com grande quantidade de bacilos e como controle negativo tubo contendo água em substituição à amostra clínica. Além disso, durante a fase de padronização das reações, DNA extraído de culturas de *M. tuberculosis* e *M. avium intracellulare* complex foram utilizados para testar possíveis reações cruzadas.

Para as reações, utilizou-se enzima GoTaq Flexi DNA Polimerase (Promega, Madison, EUA). Os *primers* selecionados foram produzidos pela Invitrogen (Carlsbad, EUA). As sequências dos *primers*, mix de reagentes e ciclagem estão descritos nas tabelas 3 a 5.

As amostras que se mostraram negativas com os quatro *primers* para hanseníase foram submetidas a qPCR para o gene humano GAPDH, a fim de confirmar a presença de DNA viável na amostra. Amostras negativas para o gene humano foram excluídas do estudo.

Tabela 3 – Pares de *primers* utilizados nas reações de PCR, tamanho do amplicon e referências consultadas

Gene	Primers	Amplicon (pb)	Referência
<i>MntH</i>	5' CGGCTTCACGTCCAGTTTCTTC 3' (<i>MntH1</i>)	336	CRUZ; FURINI; ROSELINO, 2011
	5' TAAGTGCCCTCGATGTAAGCGG 3' (<i>MntH2</i>)		
RLEP	5' GGCCGGATCCTCGATGCAC 3' (R1) 5'GCACGTAAGCTTGTCGGTGG 3' (R2)	372	BANERJEE et al., 2010
Ag85B	5' GTGGTCGGCCTCTCGAT 3' (Ag85BF) 5' CGAGCCAGCATAGATGAACTGATC 3' (Ag85BR)	81	MARTINEZ et al., 2006
Pra-36kDa	5' CTCCACCTGGACCGGCGAT 3' (S13) 5' GACTAGCCTGCCAAGTCG 3' (S62)	531	HARTSKEERL; DE WIT; KLATSER, 1989
GAPDH	5' TGCACCACCAACTGCTTAGC 3' (GAPDHF) 5' GGCATGGACTGTGGTCATGAG 3' (GAPDHR)	87	

Tabela 4 – Reagentes utilizados nas reações de PCR (volumes em µL)

	Ag85B	<i>MntH</i>	pra-36kDa	RLEP
H ₂ O	31,25	31,25	15,25	29,75
Buffer	10	10	10	8
MgCl ₂	4	4	7	3
dNTP	1 [2mM]	1 [2mM]	12 [10mM]	4 [10mM]
Taq DNA Polimerase	0.25	0.25	0.25	0.25
Forward Primer	0,5 [10mM]	0,5 [10mM]	1,5 [20mM]	1,25 [20mM]
Reverse Primer	0,5 [10mM]	0,5 [10mM]	1,5 [20mM]	1,25 [20mM]
Amostra	2,5	2,5	2,5	2,5

Tabela 5 - temperaturas e tempo de ciclagem para cada reação de PCR

Ag85B			<i>MntH</i>			Pra-36kDa			RLEP		
94°C	4'		94°C	4'		94°C	4'		94°C	4'	
94°C	30"		94°C	30"		94°C	2'		94°C	1'	
60°C	1'	40X	60°C	1'	30X	60°C	2'	32X	63°C	2'	35X
72°C	1'		72°C	1'		72°C	3'		72°C	3'	
72°C			72°C	10'		72°C	10'		-		

As amostras foram analisadas em gel de agarose 2% e consideradas positivas quando houvesse visualização da banda de tamanho correspondente ao *amplicon* esperado.

No grupo piloto a PCR usou como substrato o DNA eluído das amostras, enquanto no grupo dos demais pacientes foi utilizado o DNA purificado após uso do kit comercial.

FIGURA 1 – GEL DE AGAROSE A 2% MOSTRANDO AMPLIFICAÇÃO DA BANDA DE 372PB CORRESPONDENTE AO *AMPLICON* DOS *PRIMERS* RLEP. COLUNAS 1 A 12 E 14 A 17: AMOSTRAS DE DNA DE LINFA DE PACIENTES MB, EXTRAÍDAS POR KIT COMERCIAL; 18 E 19: AMOSTRA DE DNA EXTRAÍDO DE BIÓPSIA DE PELE DE PACIENTES MB; 20: CONTROLE NEGATIVO; 21: 100PB DNA *LADDER*.

As amostras 2, 6, 14, 16 e 18 foram sequenciadas para confirmar a especificidade da amplificação.

Em resumo, a 5µL do produto da PCR, foram adicionados 2µL da enzima Illustra ExoProStar 1-Step (GE Healthcare, Reino Unido), seguidos de incubação a 37°C por 15 minutos e 80°C por mais 15 minutos. A seguir, foram adicionados 2µL de Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, EUA), 2µL tampão 5X, 0,7µL do *primer* sense ou anti-sense (10pM) e 4,3µL de água. A reação foi realizada com 96°C por 10 minutos e 25 ciclos de 95°C por 45 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos. O DNA resultante foi precipitado pela adição de etanol, ao qual se adicionam 10µL de formamida. A leitura foi feita no ABI3500 Genetic Analyzer

(ThermoFisher, EUA). Todas as amostras sequenciadas corresponderam a *M. leprae*, sem reação cruzada com outras espécies.

As 5 amostras sequenciadas apresentaram sequências correspondentes exclusivamente ao genoma de *M. leprae*, abaixo exemplificada com o sequenciamento da amostra 6 (figuras 2 e 3).

As sequências obtidas foram pesquisadas utilizando o BLAST (National Center for Biotechnology Information – NCBI), resultando em reconhecimento exclusivo com sequências do genoma de *M. leprae*, conforme exemplificado na figura 4.

FIGURA 2 – CROMATOGRAMA MOSTRANDO SEQUENCIAMENTO GENÉTICO DO FRAGMENTO AMPLIFICADO NA AMOSTRA 6.

FIGURA 3 – CROMATOGRAMA MOSTRANDO SEQUENCIAMENTO GENÉTICO DO FRAGMENTO AMPLIFICADO NA AMOSTRA 6 (CONTINUAÇÃO).

FIGURA 4 – SEQUÊNCIA CONFIRMADA DA AMOSTRA 6 NA FERRAMENTA BLAST, MOSTRANDO ALINHAMENTO EXCLUSIVO COM SEQUÊNCIAS DO GENOMA DE *MYCOBACTERIUM LEPRAE*

Lineage Report				
Organism	Blast Name	Score	Number of Hits	Description
Mycobacterium	high GC Gram+		43	
▪ Mycobacterium leprae	high GC Gram+		41	
▪ Mycobacterium leprae Kyoto-2	high GC Gram+	610	1	Mycobacterium leprae Kyoto-2 hits
▪ Mycobacterium leprae Br4923	high GC Gram+	610	1	Mycobacterium leprae Br4923 hits
▪ Mycobacterium leprae	high GC Gram+	610	41	Mycobacterium leprae hits

5.3.5 ELISA anti-PGL-1

Amostras de soro dos pacientes foram submetidas a ELISA anti-PGL-1 padronizado *in house*, conforme rotina do serviço. Em resumo, a microplaca de 96 poços é sensibilizada com a proteína PGL-1, em temperatura ambiente, *overnight*. Após, albumina de soro bovino ou leite Molico® em PBS é utilizado para bloqueio de ligações inespecíficas. A seguir, lava-se com PBS, e o soro teste (1/100) é adicionado aos poços. Após a incubação com o soro, será adicionado aos poços o anticorpo anti-IgM humano produzido em coelho. Após o tempo de incubação, a placa será lavada e o substrato adicionado, e, depois de aproximadamente 30 minutos, a reação é bloqueada com solução *stop* (ácido sulfúrico). A leitura da absorbância é feita em 490nm em leitora de microplaca e o resultado é fornecido pelo índice entre a absorbância da amostra e do grupo controle, sendo considerado positivo quando maior que 1.

6 RESULTADOS

6.1 BACILOSCOPIA

A baciloscopia da linfa foi positiva em 55,55% dos pacientes MB; de acordo com a classificação de Ridley e Jopling, a baciloscopia foi positiva em: 25% dos indivíduos BB, 50% dos indivíduos BL e 76,9% dos pacientes LL. Não houve positividade dos indivíduos BT que foram considerados MB pela presença de bacilos na biópsia. Os dados são resumidos na tabela 6.

Tabela 6 - Positividade da baciloscopia em pacientes com hanseníase, de acordo com a classificação operacional (OMS) e de Ridley e Jopling (R&J)

Forma clínica da hanseníase		Baciloscopia N (%)	
		Positiva	Negativa
Classificação OMS	PB	0	12 (100)
	MB	15 (55,55)	12 (44,44)
Classificação R&J	I	0	2 (100)
	TT	0	5 (100)
	BT	0	7 (100)
	BB	1 (25)	3 (75)
	BL	4 (50)	4 (50)
	LL	10 (76,9)	3 (23,07)
Total		15 (38,46)	24 (61,53)

6.2 ELISA anti-PGL-1

A sorologia foi realizada em todos os pacientes PB e em 25 dos pacientes MB.

Em relação aos anticorpos anti-PGL-1, resultados acima do valor de cut-off foram observados em 67,56% do grupo total. De acordo com a classificação operacional, houve positividade em 33,33% no grupo PB e 84% no grupo MB.

Dentre os pacientes PB, o ELISA foi positivo em 80% dos indivíduos BT e negativo nos demais grupos. O valor médio do índice foi de 1,58 (SD=0,823, IC95% 0,45-1,6).

Dentre os pacientes MB, o ELISA foi positivo em 50% dos indivíduos BT e BB, 87,5% dos BL e 100% dos LL. O valor médio do ELISA no grupo foi de 4,55 (SD=3,94, IC95% 2,45-6,20).

Tabela 7 - positividade da sorologia anti-PGL-1 em pacientes com hanseníase, de acordo com a classificação operacional (OMS) e de Ridley e Jopling (R&J)

Forma clínica da hanseníase		Sorologia anti-PGL-1 N (%)	
		Positiva	Negativa
Classificação OMS	PB	4 (33,33)	8 (66,66)
	MB	21 (84)	4 (16)
Classificação R&J	I	0	2 (100)
	TT	0	5 (100)
	BT (PB)	4 (80)	1 (20)
	BT (MB)	1 (50)	1 (50)
	BB	2 (50)	2 (50)
	BL	7 (87,5)	1 (12,5)
	LL	11 (100)	0 (0)
Total		25 (67,56)	12 (32,43)

Os índices de anticorpos anti-PGL-1 foram maiores no grupo MB, comparados ao grupo PB (figura 5).

FIGURA 5 – DISTRIBUIÇÃO DOS ÍNDICES DE ANTICORPOS SÉRICOS ANTI-PGL-1, DETERMINADOS POR ELISA, NOS GRUPOS PB E MB. LINHAS HORIZONTAIS DENTRO DOS BOXES MOSTRAM A MEDIANA; LIMITES DOS BOXES 25° E 75° PERCENTIS. AS BARRAS MOSTRAM OS VALORES MÍNIMO E MÁXIMO. A MÉDIA É REPRESENTADA PELO SINAL DE + NO INTERIOR DO BOX. A LINHA TRACEJADA REPRESENTA O CUT-OFF DO MÉTODO. ($P=0,004$)

6.3 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

No grupo piloto, cada paciente foi representado por 4 amostras: linfa e raspado dérmico de orelhas, cotovelos e joelhos, agrupados; e linfa e raspado dérmico de lesão cutânea. A PCR utilizando DNA eluído das amostras de papel filtro teve 100% de positividade para os *primers* *MntH*, RLEP e Ag85B, e 91,66% de resultados positivos utilizando os *primers* Pra-36kDa (uma amostra negativa, correspondente ao raspado dérmico de lesão cutânea de um paciente).

No grupo geral de pacientes, não houve amplificação com nenhum dos *primers* quando utilizado o DNA eluído das amostras.

Após extração do DNA com kit, considerando-se os quatro *primers* utilizados, a positividade da PCR teve a frequência de 48,71% entre todos os pacientes. Os

resultados, entretanto, foram positivos apenas no grupo MB. Não foram observadas reações de PCR positivas no grupo PB.

Dentre os pacientes MB, a positividade da PCR foi frequente em 70,37% quando consideramos os 4 pares de *primers* combinados. Individualmente, a frequência de positividade para cada *primer* foi: 11,11% com *MntH*; 66,66% com RLEP; 7,69% com Ag85B e 12,5% com pra-36kDa. Para os *primers* Ag85B e Pra-36kDa, a PCR foi realizada em amostras de 26 e 24 pacientes MB, respectivamente; isto foi necessário pelo pequeno volume obtido nas alíquotas após extração do DNA. Os resultados estão apresentados na tabela 8.

Tabela 8 - positividade da PCR em pacientes com hanseníase multibacilar, de acordo com a classificação operacional (OMS) e de Ridley e Jopling (R&J)

	Todos os pacientes	PCR positiva - N (%)			
		BT	BB	BL	LL
4 pares de <i>primers</i>	19 (70,37)	1 (50)	1 (25)	6 (75)	11 (84,61)
<i>MntH</i>	3 (11,11)	0 (0)	0 (0)	1 (12,5)	2 (15,38)
RLEP	18 (66,66)	1 (50)	1 (25)	5 (62,5)	11 (84,61)
Ag85B	2 (7,69)	0 (0)	0 (0)	1 (14,28)	1 (7,69)
Pra-36kDa	3 (12,5)	0 (0)	0 (0)	1 (16,66)	2 (16,66)

6.4 COMPARAÇÃO ENTRE OS TESTES DIAGNÓSTICOS UTILIZADOS

Dentre os pacientes PB, o ELISA anti-PGL-1 resultou positivo em 33,33% dos casos. Os títulos, entretanto, tendem a ser menores em relação aos MB, ficando mais próximos ao cut-off do método. Neste grupo, a positividade também foi restrita aos pacientes classificados como BT, sendo negativo nos I e TT.

6.4.1 Pacientes multibacilares

Como não houve amplificação da PCR no grupo PB, os resultados da PCR serão analisados exclusivamente para o grupo MB.

Dentre os pacientes MB, não foi observada diferença estatística entre os resultados da PCR com *primers* *MntH* e Ag85B ($P=0,317$), *MntH* e Pra-36kDa ($P=1,0$) e Ag85B e Pra-36kDa ($P=0,564$); o *primer* RLEP foi superior ao *MntH*

($P<0,001$), Ag85B ($P<0,001$) e Pra-36kDa ($P=0,001$), conforme demonstrado na tabela 9. Dentre as amostras testadas, uma amostra foi positiva para os *primers* Ag85B, *MntH* e Pra-36kDa e negativa para RLEP. A positividade entre os diferentes pares de *primers* é comparada na tabela 9.

Tabela 9 - comparação dos resultados da PCR com *primers* Ag85B, *MntH* e Pra-36kDa com a PCR com *primers* RLEP, em pacientes com hanseníase MB

PCR	RLEP		<i>P</i> -valor
	+	-	
	N (%)	N (%)	
Ag85B			
+	1	1	$P<0,001$
-	16	8	
<i>MntH</i>			
+	2	1	$P<0,001$
-	16	8	
Pra-36kDa			
+	2	1	$P=0,001$
-	13	8	

O ELISA anti-PGL-1 apresentou frequência de positividade superior à PCR com os *primers* *MntH* ($P<0,001$), Ag85B ($P<0,001$) e Pra-36kDa ($P<0,001$), bem como à baciloscopia ($P=0,011$); a positividade da sorologia não teve diferença estatística em relação à PCR com *primers* RLEP ($P=0,059$) ou com os quatro *primers* combinados ($P=0,102$). Do total de 25 pacientes em que a sorologia foi realizada, um deles apresentou sorologia negativa e PCR positiva com *primers* RLEP.

A baciloscopia teve positividade maior que a PCR com os *primers* *MntH* ($P=0,001$), Ag85B ($P<0,001$) e Pra-36kDa ($P=0,004$); não houve diferença estatística entre baciloscopia e PCR com *primer* RLEP ($P=0,083$); a baciloscopia teve desempenho estatisticamente inferior em relação ao resultado das PCRs combinadas ($P=0,046$). Dentre o total de amostras, quatro pacientes apresentaram baciloscopia negativa e PCR positiva. Destes, três foram positivas exclusivamente com o *primer* RLEP, enquanto a outra amostra foi positiva com os demais *primers* e negativa com RLEP.

Tabela 10 - Comparação da frequência dos resultados positivos e negativos da PCR com aqueles da sorologia anti-PGL-1 e baciloscopia em pacientes com hanseníase MB

PCR	ELISA anti-PGL-1		Baciloscopia	
	+	-	+	-
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
Todos os primers				
+	16 (64)	1 (4)	15 (55,55)	4 (14,81)
-	5 (20)	3 (12)	0 (0)	8 (29,62)
P-valor	0,102		0,046	
Ag85B				
+	2 (8,33)	0 (0)	1 (3,84)	1 (3,84)
-	18 (75)	4 (16,66)	14 (53,84)	10 (38,46)
P-valor	<0,001		<0,001	
MntH				
+	3 (12)	0 (0)	2 (7,40)	1 (3,70)
-	18 (72)	4 (16)	13 (48,14)	11 (40,74)
P-valor	<0,001		0,001	
RLEP				
+	15 (60)	1 (4)	15 (55,55)	3 (11,11)
-	6 (24)	3 (12)	0 (0)	9 (33,33)
P-valor	0,059		0,083	
Pra-36kDa				
+	3 (13,63)	0 (0)	2 (8,33)	1 (4,16)
-	15 (68,18)	4 (18,18)	11 (45,83)	10 (41,66)
P-valor	<0,001		0,004	

7 DISCUSSÃO

Diversos estudos têm avaliado o uso da PCR no diagnóstico de hanseníase. Ainda há, entretanto, ampla discussão quanto a que *primers* e amostras clínicas utilizar, a fim de obter um teste que tenha boa acurácia, possa ser aplicado em campo e seja pouco invasivo.

O DNA extraído de biópsias de pele é frequentemente usado como substrato para a realização de PCR, com resultados interessantes descritos na literatura. Podemos citar dois estudos recentes: Chaitanya et al. (2018) demonstram positividade da PCR em 60,3% dos pacientes PB usando *primers* para a região RLEP e 81% com uma técnica de PCR MULTIPLEX; Azevedo e colaboradores (2017) encontraram 55,2% de positividade em TT, 95,2% em BT e 100% em BB, BL e LL. Apesar dos bons resultados, o uso da biópsia cutânea esbarra em um obstáculo prático à sua aplicação: a necessidade de procedimento cirúrgico para obtenção da amostra e uma maior complexidade no seu processamento – a amostra deve ser embebida em parafina ou conservada sob refrigeração até a extração do material genético.

Outra amostra frequentemente utilizada são os *swabs* nasais, cuja aquisição é muito mais simples do que as biópsias de pele. Vários estudos já demonstraram a presença do *M. leprae* na cavidade nasal de indivíduos, especialmente nos comunicantes de doentes ou moradores de áreas endêmicas. A presença do bacilo nestas amostras, todavia, ainda não tem papel completamente elucidado. Araújo et al. (2016) demonstraram positividade na PCR de *swab* nasal em 49% dos comunicantes domiciliares avaliados; após seguimento de 5 a 7 anos, entretanto, este não se mostrou fator determinante na instalação da doença. Apesar de esta ser a provável via de contágio, não está claro se aqueles com PCR positiva em *swab* nasal terão manifestações clínicas e, o que limita o uso dessa técnica como teste diagnóstico.

No mesmo estudo de 2016, Araújo e colaboradores testaram amostras de sangue dos comunicantes domiciliares, mostrando que a positividade da PCR nestas amostras representava um risco relativo de 5,54 vezes para desenvolvimento da doença. Sua positividade (6,7%), entretanto, foi muito inferior à do *swab* nasal. Em outro estudo foi demonstrada a presença de *M. leprae* em sangue periférico de

pacientes MB (95,92%), PB (70%) e comunicantes domiciliares (6,25%), utilizando uma técnica de *nested* PCR (WEN et al., 2013).

Algumas amostras são utilizadas com menor frequência, porém também apresentam positividade na detecção do bacilo. Morgado de Abreu et. al (2014) identificaram a presença de *M. leprae* em 78% dos pacientes do estudo, usando amostras parafinadas de biópsias de mucosa oral e *primers MntH*. Outro estudo avaliou a PCR em amostras de urina de pacientes com hanseníase, encontrando 75% de positividade em pacientes TT e 30% em pacientes LL, antes do tratamento (CALEFFI et. al, 2012).

Em nosso estudo, optamos por utilizar amostras de linfa de orelhas, cotovelos e joelhos, coletadas em papel filtro, pois: constituem uma amostra clínica de fácil obtenção, sem necessidade de procedimento cirúrgico; são sítios frequentemente acometidos pelo bacilo, correspondendo aos locais de coleta da baciloscopia; a amostra pode ser armazenada em envelope a temperatura ambiente, facilitando seu manuseio e remessa para serviços de referência.

A positividade da PCR em amostras de linfa e raspado dérmico foi avaliada em outros trabalhos. Kang et al. (2003) extraíram DNA a partir da lâmina de bisturi utilizada na coleta da baciloscopia e realizaram PCR com *primers* para o gene da proteína de 18kDa e para uma região da sequência repetitiva RLEP, com 10,7% de positividade para o primeiro e 73% para o segundo. No mesmo estudo, 67,7% dos casos com baciloscopia negativa foram positivos na PCR com *primers* para a região RLEP. Realizando a extração de DNA das lâminas de microscópio usadas na baciloscopia, Azevedo et al. (2017) mostraram positividade da qPCR, também com *primers* para a região RLEP, de 84% no total de pacientes, com correlação negativa entre o Ct e o índice bacilosκόico; e Siwakoti e colaboradores (2016) realizaram PCR com *primers* par a região RLEP, encontrando sensibilidade de 44% em PB e 78% em MB. Santos et. al (1993) coletaram linfa diretamente do lóbulos auriculares e submeteram a um processo de choque térmico para extração do DNA. O material foi usado para PCR convencional com *primers* para a região repetitiva do *M. leprae* e *Southern blot*, encontrando positividade de 21,05% após PCR e 68,42% após a hibridização. Não há, entretanto, trabalhos que utilizem a linfa coletada em papel filtro descritos na literatura.

Dentre nossos pacientes, não tivemos amplificação em qualquer amostra de pacientes PB; os *primers MntH*, Ag85B e pra-36kDa tiveram desempenho inferior à

baciloscopia na detecção do bacilo, enquanto RLEP mostrou positividade estatisticamente semelhante, tanto entre todos os pacientes como apenas entre os MB. Apenas ao considerarmos as quatro PCRs combinadas sua positividade se torna superior à da baciloscopia. Tal fato é inesperado, considerando-se que o exame microscópico tem um limite inferior de detecção em torno de 10^4 bacilos/g de tecido examinado, enquanto a PCR consegue detectar quantidades tão pequenas quanto 300 bacilos em amostras clínicas (TRUMAN et al., 2008).

Uma possível explicação para estes resultados é o método de coleta das amostras e o tempo decorrido até a realização das PCRs. Ressaltamos que foram utilizadas amostras armazenadas em banco, coletadas no período de 2006-2010, e que as PCRs foram realizadas nos anos de 2015-2017. Durante este período, as amostras foram manuseadas por outros pesquisadores, o que pode ter levado a degradação do DNA e diminuição da qualidade das mesmas.

Alguns fatores influenciam na preservação das amostras, como a presença de nucleases endógenas, exposição a luz ultravioleta, umidade, temperaturas elevadas e a contaminação por bactérias e fungos (BUS; ALLEN, 2014). Como as amostras foram armazenadas após eluição em água, consideramos que parte das nucleases e outros fatores inibitórios não foram inativados, podendo manter algum grau de ação que tenha contribuído para a perda de integridade do DNA. Um estudo comparou a extração de DNA total em amostras de sangue antes e após congelamento. Apesar de não haver alterações em *DNA fingerprinting* após repetidos ciclos de congelamento e descongelamento, a extração após congelamento a -70°C teve um rendimento 25% menor do que das amostras a fresco (ROSS; HAITES; KELLY, 1990). O armazenamento de amostras desidratadas é uma alternativa ao congelamento, já que a dissecação rápida diminui a atividade de bactérias e enzimas. Hara et. al (2016) demonstraram que sangue armazenado de forma seca em gaze de algodão foi melhor para a detecção de mRNA em comparação a amostras de sangue total. Atualmente, existem cartões desenvolvidos especialmente para esta finalidade (*FTA Cards*, Merck, Darmstadt, Alemanha) e que permitem o armazenamento das amostras em local seco e escuro por vários anos (BUS; ALLEN, 2014). Aye e colaboradores (2011) compararam a extração de DNA por dois métodos: coleta em *FTA Elute Cards* e conservação da lâmina de bisturi em álcool 70%, realizando *nested* PCR com a região RLEP como alvo. Os autores não encontraram diferenças na área sob a curva ROC entre os dois métodos,

destacando entretanto a maior praticidade do processo de extração usando os *FTA cards*, que permitem obter o DNA após eluição e aquecimento, bem como a manutenção da integridade do material genético ao longo dos anos. O processo de extração utilizado nos *FTA Elute Cards* é muito semelhante à técnica de eluição utilizada nos nossos experimentos, com a diferença de que os *Cards* têm em sua composição compostos que lisam a membrana celular, denaturam proteínas e protegem os ácidos nucleicos, garantindo assim a pureza e integridade do DNA extraído. Seu uso em larga escala, entretanto, pode ser limitado pelos custos, superiores ao do papel filtro. Em estudos futuros, é interessante que a extração do DNA das amostras seja realizada antes do armazenamento em freezer, independente do método utilizado – *FTA Cards*, extração por kit comercial ou *in house* – eliminando assim possíveis componentes responsáveis pela degradação do material, ou que as amostras sejam mantidas dessecadas até o momento de sua utilização.

A integridade do DNA presente nas amostras foi avaliada através de qPCR para o gene humano GAPDH. A positividade da PCR indica que há material genético viável e que permite amplificação. Devemos levar em conta, entretanto, que o DNA do hospedeiro está presente em quantidades muito superiores ao DNA do *M. leprae* nas amostras. Dessa forma, é possível que a presença de inibidores da PCR ou que a degradação do DNA afetem de forma mais importante as reações cujo alvo são genes presentes em cópias simples no material genético da bactéria e que, portanto, estão em número muito reduzido no ensaio.

A hipótese de que o armazenamento tenha efeitos deletérios sobre o material estocado se reforça quando levamos em consideração a positividade das PCRs no grupo piloto de pacientes. Neste grupo, formado por pacientes MB com BI superior a 2+, as PCRs foram realizadas poucas semanas após a coleta, com positividade em 100% das amostras com os *primers* *MntH*, Ag85B e RLEP e 91,66% com Pra-36KDa, mesmo utilizando apenas o DNA eluído do papel filtro como substrato. Assim, acreditamos que a eluição do DNA a partir do papel filtro pode fornecer, ao menos a curto prazo, substrato para utilização na realização da PCR.

Não houve amplificação em qualquer amostra dos pacientes PB. A negatividade da PCR em 100% das amostras dos pacientes do grupo PB confirma a negatividade da baciloscopia e, conseqüentemente, a classificação da forma PB. Porém, desencoraja seu uso em pacientes e comunicantes PB.

A ausência de amplificação no grupo de pacientes PB contrasta com achados da literatura. Wichitwechkarn et. al (1995) encontraram 18,2% de positividade em amostras de raspado dérmico de pacientes PB através de PCR convencional e *Southern blot*, utilizando *primers* para o gene Pra-36kDa. Com a mesma técnica, Kampirapap et. al (1998) obtiveram 22% de positividade em raspado dérmico de pacientes PB antes do início do tratamento. Além das considerações já realizadas sobre a conservação e extração do DNA das amostras, é possível que nossos resultados sejam explicados também pelo pequeno número amostral e pelo uso da PCR convencional. O uso da hibridização aumentou a positividade da PCR de 21,05% para 68,42% em um outro estudo (SANTOS et. al, 1993). Atualmente, há uma tendência à utilização da PCR em tempo real, que parece ser mais sensível que a técnica convencional, além de ser mais ágil para a realização.

A positividade das amostras com *primers* para a região RLEP foi superior àquela observada com os demais *primers*. Este fato provavelmente se deve à presença de múltiplas cópias da região alvo no genoma do bacilo, aumentando as chances de anelamento e amplificação. Mesmo se considerarmos que houve algum grau de degradação do material genético presente nas amostras, há maior chance de haver regiões RLEP preservadas que possibilitem uma reação positiva. Braet e colaboradores (2018) apontam a qPCR com *primers* para a região RLEP como o padrão-ouro para confirmação laboratorial da hanseníase. Neste estudo, os autores relatam 100% de sensibilidade em amostras de raspado dérmico (incluindo amostras com baciloscopia negativa) e 100% de especificidade, tanto nas amostras testadas de diferentes micobactérias quanto pela pesquisa no banco de dados do NCBI, que não encontrou reação cruzada com outros genomas conhecidos. Nossos resultados não mostraram positividade semelhante, provavelmente pelas questões de degradação das amostras já discutidas e pelo uso de técnica de PCR convencional e não em tempo real.

Curiosamente, uma amostra foi positiva com os *primers* Ag85B, *MntH* e pra-36kDa e negativa com RLEP. Essa amostra pertence a um paciente com hanseníase dimorfa-virchowiana (BL), em que as baciloscopias foram negativas e o ELISA anti-PGL-1 teve índice de 1,8. Esse caso mostra que, apesar dos melhores resultados obtidos com RLEP, há complementariedade entre os diferentes *primers*, podendo haver resultados diferentes da PCR em uma mesma amostra, a depender

do alvo utilizado. A combinação de múltiplos alvos aumenta a chance de amplificação do DNA em uma determinada amostra clínica.

A sorologia anti-PGL-1 foi, dentre os testes executados, a única que apresentou resultados positivos no grupo PB. Entretanto, esta positividade só foi observada nos pacientes BT, dos quais 80% tiveram anti-PGL-1 positivo. Dessa forma, a sorologia continua sendo de pouca utilidade no extremo tuberculoide do espectro e nos indivíduos com hanseníase indeterminada. Convém discutir se, nesses casos, a positividade do ELISA tem implicações na classificação e tratamento destes pacientes. Sabemos que os indivíduos BT podem ser pauci ou multibacilares, a depender dos achados de baciloscopia e biópsia. A sorologia não é considerada para a classificação operacional do paciente, mas é necessário observar que pacientes BT com títulos de anticorpos elevados podem ter uma tendência a migrar para o polo lepromatoso. A positividade do ELISA se relaciona positivamente com baciloscopia e é uma representante da carga bacteriana do paciente (SCHURING et. al, 2006). Outros estudos já relatam a importância da sorologia como método auxiliar na classificação do paciente, com possíveis implicações na escolha do regime terapêutico, especialmente para profissionais generalistas (CONTIN et. al, 2011).

Comparativamente à sorologia anti-PGL-1, a PCR com os *primers* *MntH*, Ag85B, Pra-36kDa e RLEP se mostrou inferior na detecção dos casos no grupo total de pacientes. Considerando-se apenas os pacientes MB, a sorologia foi superior aos *primers* *MntH*, Ag85B e Pra-36kDa, com resultados estatisticamente idênticos aos dos *primers* RLEP e das quatro PCRs combinadas. Apesar da positividade dos exames ser semelhantes, é importante destacar que sua interpretação não é. Enquanto a PCR é uma evidência direta da infecção cutânea pelo *M. leprae*, a sorologia é um marcador de exposição ao bacilo, não implicando necessariamente no desenvolvimento futuro de manifestações clínicas. Além disso, o ELISA é frequentemente positivo em áreas endêmicas e em comunicantes domiciliares, representando uma população sob risco maior de adoecimento (ARAUJO et al., 2016). É interessante notar, ainda, que uma amostra com sorologia negativa teve PCR positiva com *primers* RLEP. Na ausência de um teste padrão-ouro que seja aplicável a todos os pacientes, os diferentes exames disponíveis se mostram complementares nos seus resultados, devendo ser usados em conjunto no diagnóstico do paciente.

Ainda dentre os pacientes MB, a baciloscopia foi superior na detecção do bacilo quando comparada aos *primers* Ag85B, *MntH* e Pra-36kDa. Seu desempenho foi semelhante à PCR com *primer* RLEP e inferior às quatro PCRs combinadas, reforçando o aumento da sensibilidade do método ao se combinarem diferentes alvos de DNA. Quatro amostras que apresentavam baciloscopia negativa tiveram PCR positiva – três com o *primer* RLEP e uma com os demais – de forma que o uso da PCR em conjunto a outros métodos pode ajudar na identificação do bacilo em amostras clínicas.

Em relação à biópsia cutânea, a PCR também demonstrou resultados inferiores na detecção dos bacilos, seja com cada *primer* individualmente, ou com os resultados combinados. O uso da biópsia de pele como método auxiliar no diagnóstico e classificação da hanseníase é rotineiro nos centros de referência. Entretanto, na ausência de bacilos ao exame microscópico, o exame requer interpretação especializada para avaliação dos casos. Além disso, incorre na necessidade de procedimento cirúrgico e de profissional médico treinado para leitura das lâminas. Assim, apesar de sua utilidade na detecção do bacilo e na classificação do paciente em serviços especializados, a biópsia tem aplicação limitada para a prática de campo.

Em resumo, a coleta da amostra de linfa é rápida, pouco invasiva e de fácil execução, possibilitando a sua realização em campo, enquanto o acondicionamento da amostra em papel filtro permite seu envio para centros de referência para realização da PCR. A eluição em água é um método barato e rápido para extração do DNA da amostra e parece, ao menos a curto prazo, fornecer matéria de qualidade razoável para a PCR. Nosso trabalho apresenta uma limitação quanto a esta avaliação por ser retrospectivo e utilizar amostras colhidas previamente. Estudos prospectivos, que colem e armazenem as amostras sob diferentes condições, podem apontar qual a melhor forma de se realizar a extração do DNA nas amostras de linfa.

Reforçamos, ainda, a necessidade do emprego de técnicas mais sensíveis, como a PCR em tempo real, para obtenção de melhores resultados.

8 CONCLUSÕES

A extração do DNA de linfa, coletada em papel filtro, por kit comercial resultou maior concentração e pureza de DNA quando comparada à eluição com água. Porém, adicionando-se o custo do kit aos demais reagentes utilizados na técnica de PCR, seu uso em grande escala é desfavorecido.

A utilização da PCR para identificar o bacilo *M. leprae* em amostras de linfa é um exame subsidiário que pode auxiliar no diagnóstico de hanseníase. Dentre os *primers* testados, a amplificação da sequência repetitiva RLEP se mostrou superior aos demais, com positividade equivalente ao ELISA anti-PGL-1 e à baciloscopia nos pacientes MB. A PCR foi, ainda, capaz de detectar uma amostra em que a sorologia foi negativa e quatro amostras com baciloscopia negativa, reforçando seu uso conjunto a outras técnicas laboratoriais. Todavia, a negatividade da PCR em amostras de linfa de pacientes PB desencoraja o seu uso também em comunicantes.

REFERÊNCIAS¹

¹De acordo com ABNT NBR6023

REFERÊNCIAS

- 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. **Clin Infect Dis**, v. 63, n. 11, p. 1412-1420, Dec 2016. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27558564> >.
- ARAUJO, S. et al. Unveiling healthy carriers and subclinical infections among household contacts of leprosy patients who play potential roles in the disease chain of transmission. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 107 Suppl 1, p. 55-9, Dec 2012. ISSN 1678-8060. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23283454> >.
- AYE, K. S. et al. FTA card utility for PCR detection of *Mycobacterium leprae*. **Jpn J Infect Dis**, v. 64, n. 3, p. 246-8, 2011. ISSN 1884-2836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21617312> >.
- AZEVEDO, M. C. et al. qPCR detection of *Mycobacterium leprae* in biopsies and slit skin smear of different leprosy clinical forms. **Braz J Infect Dis**, v. 21, n. 1, p. 71-78, 2017 Jan - Feb 2017. ISSN 1678-4391. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27888674> >.
- 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 Infect Dis**, v. 10, p. 252, Aug 2010. ISSN 1471-2334. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20735843> >.
- BAZAN-FURINI, R. et al. Early detection of leprosy by examination of household contacts, determination of serum anti-PGL-1 antibodies and consanguinity. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 5, p. 536-40, Aug 2011. ISSN 1678-8060. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21894372> >.
- BRAET, S. et al. The Repetitive Element RLEP Is a Highly Specific Target for Detection of *Mycobacterium leprae*. **J Clin Microbiol**, v. 56, n. 3, Mar 2018. ISSN 1098-660X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29305545> >.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Hanseníase. Situação epidemiológica – Dados. Available at: < <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/hanseníase/situacao-epidemiologica> > Acesso em 18 de abril de 2018.
- BRATSCHI, M. W. et al. Current knowledge on *Mycobacterium leprae* transmission: a systematic literature review. **Lepr Rev**, v. 86, n. 2, p. 142-55, Jun 2015. ISSN 0305-7518. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26502685> >.
- BUSÍ, M. M.; ALLEN, M. Collecting and preserving biological samples from challenging environments for DNA analysis. **Biopreserv Biobank**, v. 12, n. 1, p. 17-22, Feb 2014. ISSN 1947-5543. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24620766> >.
- CALEFFI, K. R. et al. Use of the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium*

leprae in urine. **Braz J Med Biol Res**, v. 45, n. 2, p. 153-7, Feb 2012. ISSN 1414-431X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22286535> >.

CAVALCANTI, A. A. et al. Concordance between expected and observed bacilloscopy results of clinical forms of leprosy: a 6-year retrospective study in Recife, State of Pernambuco, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 45, n. 5, p. 616-9, Oct 2012. ISSN 1678-9849. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23152346> >.

CHAITANYA, V. et al. Analysis of a novel multiplex polymerase chain reaction assay as a sensitive tool for the diagnosis of indeterminate and tuberculoid forms of leprosy. **International Journal of Mycobacteriology**, v. 6, n. 1, p. 1-8, January 1, 2017 2017. ISSN 2212-5531. Disponível em: < <http://www.ijmyco.org/article.asp?issn=2212-5531> >.

COLE, S. T. et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. **Nature**, v. 409, n. 6823, p. 1007-11, Feb 2001. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11234002> >.

CONTIN, L. A. et al. Use of the ML-Flow test as a tool in classifying and treating leprosy. **An Bras Dermatol**, v. 86, n. 1, p. 91-5, 2011 Jan-Feb 2011. ISSN 1806-4841. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21437528> >.

CORSTJENS, P. L. et al. Lateral flow assay for simultaneous detection of cellular- and humoral immune responses. **Clin Biochem**, v. 44, n. 14-15, p. 1241-6, Oct 2011. ISSN 1873-2933. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21763300> >.

CRUZ, A. F.; FURINI, R. B.; ROSELINO, A. M. Comparison between microsatellites and MI MntH gene as targets to identify Mycobacterium leprae by PCR in leprosy. **An Bras Dermatol**, v. 86, n. 4, p. 651-6, 2011 Jul-Aug 2011. ISSN 1806-4841. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21987128> >.

DOUGLAS, J. T. et al. Prospective study of serological conversion as a risk factor for development of leprosy among household contacts. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 11, n. 5, p. 897-900, Sep 2004. ISSN 1071-412X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15358649> >.

DUTHIE, M. S. et al. Specific IgG antibody responses may be used to monitor leprosy treatment efficacy and as recurrence prognostic markers. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 30, n. 10, p. 1257-65, Oct 2011. ISSN 1435-4373. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21544695> >.

EICHELMANN, K. et al. Leprosy. An update: definition, pathogenesis, classification, diagnosis, and treatment. **Actas Dermosifiliogr**, v. 104, n. 7, p. 554-63, Sep 2013. ISSN 1578-2190. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23870850> >.

FABRI, A. C. O. C. et al. Antigen-specific assessment of the immunological status of various groups in a leprosy endemic region. **BMC Infect Dis**, v. 15, p. 218, May

2015. ISSN 1471-2334. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26021317> >.

FAGET, G. H. Chemotherapy of leprosy. **Star**, v. 6, n. 6, p. 1-3, Feb 1947. ISSN 0049-2116. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20261121> >.

FOSS, N. T. F. Hanseníase: aspectos clínicos, imunológicos e terapêuticos. **An Bras Dermatol**, v. 74, n. 2, 1999. ISSN 1806-4841. Disponível em: < <http://www.anaisdedermatologia.org.br//detalhe-artigo/299> >.

FRADE, M. A. et al. New sonographic measures of peripheral nerves: a tool for the diagnosis of peripheral nerve involvement in leprosy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 3, May 2013. ISSN 1678-8060. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23778664> >.

GARBINO, J. A.; HEISE, C. O.; MARQUES, W. Assessing nerves in leprosy. **Clin Dermatol**, v. 34, n. 1, p. 51-8, 2016 Jan-Feb 2016. ISSN 1879-1131. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26773623> >.

GARBINO, J. A. et al. Primary neural leprosy: systematic review. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 71, n. 6, p. 397-404, Jun 2013. ISSN 1678-4227. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23828524> >.

GELUK, A. Biomarkers for leprosy: would you prefer T (cells)? **Lepr Rev**, v. 84, n. 1, p. 3-12, Mar 2013a. ISSN 0305-7518. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23741878> >.

GELUK, A. Challenges in immunodiagnostic tests for leprosy. **Expert Opin Med Diagn**, v. 7, n. 3, p. 265-74, May 2013b. ISSN 1753-0067. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23537134> >.

GOULART, I. M. et al. Detection of Mycobacterium leprae DNA in skin lesions of leprosy patients by PCR may be affected by amplicon size. **Arch Dermatol Res**, v. 299, n. 5-6, p. 267-71, Aug 2007. ISSN 0340-3696. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17530267> >.

GÓMEZ-VALERO, L. et al. Reconstructing the ancestor of Mycobacterium leprae: the dynamics of gene loss and genome reduction. **Genome Res**, v. 17, n. 8, p. 1178-85, Aug 2007. ISSN 1088-9051. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17623808> >.

HAN, X. Y.; SILVA, F. J. On the age of leprosy. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 2, p. e2544, Feb 2014. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24551248> >.

HAN, X. Y. et al. Comparative sequence analysis of Mycobacterium leprae and the new leprosy-causing Mycobacterium lepromatosis. **J Bacteriol**, v. 191, n. 19, p. 6067-74, Oct 2009. ISSN 1098-5530. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19633074> >.

HARA, M. et al. Effects of storage conditions on forensic examinations of blood samples and bloodstains stored for 20 years. **Leg Med (Tokyo)**, v. 18, p. 81-4, Jan 2016. ISSN 1873-4162. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26832383> >.

HARTSKEERL, R. A.; DE WIT, M. Y.; KLATSER, P. R. Polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae*. **J Gen Microbiol**, v. 135, n. 9, p. 2357-64, Sep 1989. ISSN 0022-1287. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2697743> >.

HASAN, Z. et al. Relationship between circulating levels of IFN-gamma, IL-10, CXCL9 and CCL2 in pulmonary and extrapulmonary tuberculosis is dependent on disease severity. **Scand J Immunol**, v. 69, n. 3, p. 259-67, Mar 2009. ISSN 1365-3083. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19281538> >.

IRGENS, L. M. Leprosy in Norway. An epidemiological study based on a national patient registry. **Lepr Rev**, v. 51 Suppl 1, p. i-xi, 1-130, Mar 1980. ISSN 0305-7518. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7432082> >.

JAIN, S. et al. High-resolution sonography: a new technique to detect nerve damage in leprosy. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 3, n. 8, p. e498, Aug 2009. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19668356> >.

KAMPIRAPAP, K. et al. DNA amplification for detection of leprosy and assessment of efficacy of leprosy chemotherapy. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 66, n. 1, p. 16-21, Mar 1998. ISSN 0148-916X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9614835> >.

KANG, T. J. et al. Comparison of two different PCR amplification products (the 18-kDa protein gene vs. RLEP repetitive sequence) in the diagnosis of *Mycobacterium leprae*. **Clin Exp Dermatol**, v. 28, n. 4, p. 420-4, Jul 2003. ISSN 0307-6938. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12823306> >.

KAR, H. K.; GUPTA, R. Treatment of leprosy. **Clin Dermatol**, v. 33, n. 1, p. 55-65, 2015 Jan-Feb 2015. ISSN 1879-1131. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25432811> >.

KHANOLKAR-YOUNG, S. et al. Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) synthesis is associated with the skin and peripheral nerve pathology of leprosy reversal reactions. **Clin Exp Immunol**, v. 99, n. 2, p. 196-202, Feb 1995. ISSN 0009-9104. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7851011> >.

LASTÓRIA, J. C.; ABREU, M. A. Leprosy: a review of laboratory and therapeutic aspects--part 2. **An Bras Dermatol**, v. 89, n. 3, p. 389-401, 2014 May-Jun 2014. ISSN 1806-4841. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24937811> >.

LINI, N.; SHANKERNARAYAN, N. P.; DHARMALINGAM, K. Quantitative real-time PCR analysis of *Mycobacterium leprae* DNA and mRNA in human biopsy material from leprosy and reactional cases. **J Med Microbiol**, v. 58, n. Pt 6, p. 753-9, Jun

2009. ISSN 0022-2615. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19429751> >.

LUGÃO, H. B. et al. Ultrasonography of Leprosy Neuropathy: A Longitudinal Prospective Study. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 11, p. e0005111, 11 2016. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27851766> >.

MARTINEZ, A. N. et al. Evaluation of real-time and conventional PCR targeting complex 85 genes for detection of Mycobacterium leprae DNA in skin biopsy samples from patients diagnosed with leprosy. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 9, p. 3154-9, Sep 2006. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16954241> >.

MARTINEZ, A. N. et al. Evaluation of qPCR-based assays for leprosy diagnosis directly in clinical specimens. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 10, p. e1354, Oct 2011. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22022631> >.

MARTINEZ, A. N. et al. PCR-based techniques for leprosy diagnosis: from the laboratory to the clinic. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 4, p. e2655, Apr 2014. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24722358> >.

MARTINOLI, C. et al. US and MR imaging of peripheral nerves in leprosy. **Skeletal Radiol**, v. 29, n. 3, p. 142-50, Mar 2000. ISSN 0364-2348. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10794551> >.

MATHESON, C. D. et al. Molecular exploration of the first-century Tomb of the Shroud in Akeldama, Jerusalem. **PLoS One**, v. 4, n. 12, p. e8319, Dec 2009. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20016819> >.

MEIMA, A. et al. Disappearance of leprosy from Norway: an exploration of critical factors using an epidemiological modelling approach. **Int J Epidemiol**, v. 31, n. 5, p. 991-1000, Oct 2002. ISSN 0300-5771. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12435774> >.

MONOT, M. et al. Are variable-number tandem repeats appropriate for genotyping Mycobacterium leprae? **J Clin Microbiol**, v. 46, n. 7, p. 2291-7, Jul 2008. ISSN 1098-660X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18495858> >.

MONOT, M. et al. On the origin of leprosy. **Science**, v. 308, n. 5724, p. 1040-2, May 2005. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15894530> >.

MONOT, M. et al. Comparative genomic and phylogeographic analysis of Mycobacterium leprae. **Nat Genet**, v. 41, n. 12, p. 1282-9, Dec 2009. ISSN 1546-1718. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19881526> >.

MORGADO DE ABREU, M. A. et al. Mycobacterium leprae is identified in the oral mucosa from paucibacillary and multibacillary leprosy patients. **Clin Microbiol Infect**, v. 20, n. 1, p. 59-64, Jan 2014. ISSN 1469-0691. Disponível em: <

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23473290> >.

MOURA, R. S. et al. Leprosy serology using PGL-I: a systematic review. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 41 Suppl 2, p. 11-8, 2008. ISSN 1678-9849. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19618069> >.

NATH, I.; SAINI, C.; VALLURI, V. L. Immunology of leprosy and diagnostic challenges. **Clin Dermatol**, v. 33, n. 1, p. 90-8, 2015 Jan-Feb 2015. ISSN 1879-1131. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25432814> >.

NOORDEEN, S. K.; LOPEZ BRAVO, L.; SUNDARESAN, T. K. Estimated number of leprosy cases in the world. **Lepr Rev**, v. 63, n. 3, p. 282-7, Sep 1992. ISSN 0305-7518. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1406024> >.

OLIVEIRA, A. L. et al. Schwann cells producing matrix metalloproteinases under Mycobacterium leprae stimulation may play a role in the outcome of leprosy neuropathy. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 69, n. 1, p. 27-39, Jan 2010. ISSN 1554-6578. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20010305> >.

RADA, E. et al. Serologic follow-up of IgG responses against recombinant mycobacterial proteins ML0405, ML2331 and LID-1 in a leprosy hyperendemic area in Venezuela. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 107 Suppl 1, p. 90-4, Dec 2012. ISSN 1678-8060. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23283459> >.

RAMBUKKANA, A. Molecular basis for the peripheral nerve predilection of Mycobacterium leprae. **Curr Opin Microbiol**, v. 4, n. 1, p. 21-7, Feb 2001. ISSN 1369-5274. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11173029> >.

RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 34, n. 3, p. 255-73, 1966 Jul-Sep 1966. ISSN 0148-916X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5950347> >.

ROBBINS, G. et al. Ancient skeletal evidence for leprosy in India (2000 B.C.). **PLoS One**, v. 4, n. 5, p. e5669, May 2009. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19479078> >.

ROCHA, E. P. et al. Comparisons of dN/dS are time dependent for closely related bacterial genomes. **J Theor Biol**, v. 239, n. 2, p. 226-35, Mar 2006. ISSN 0022-5193. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16239014> >.

RODRIGUES JÚNIOR, I. A. et al. Leprosy classification methods: a comparative study in a referral center in Brazil. **Int J Infect Dis**, v. 45, p. 118-22, Apr 2016. ISSN 1878-3511. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26928327> >.

ROSS, K. S.; HAITES, N. E.; KELLY, K. F. Repeated freezing and thawing of peripheral blood and DNA in suspension: effects on DNA yield and integrity. **J Med Genet**, v. 27, n. 9, p. 569-70, Sep 1990. ISSN 0022-2593. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2231649> >.

RUDEEANEKSIN, J. et al. LightCycler real-time PCR for rapid detection and quantitation of *Mycobacterium leprae* in skin specimens. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 54, n. 2, p. 263-70, Nov 2008. ISSN 0928-8244. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18783434> >.

SAINI, C. et al. T helper cells in leprosy: An update. **Immunol Lett**, v. 184, p. 61-66, 04 2017. ISSN 1879-0542. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28235552> >.

SALGADO, C. G. et al. Are leprosy case numbers reliable? **Lancet Infect Dis**, v. 18, n. 2, p. 135-137, Feb 2018. ISSN 1474-4457. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29412953> >.

SANTOS, A. R. et al. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA by polymerase chain reaction in the blood of individuals, eight years after completion of anti-leprosy therapy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 8, p. 1129-33, Nov 2001. ISSN 0074-0276. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11784934> >.

SANTOS, A. R. et al. Use of PCR-mediated amplification of *Mycobacterium leprae* DNA in different types of clinical samples for the diagnosis of leprosy. **J Med Microbiol**, v. 39, n. 4, p. 298-304, Oct 1993. ISSN 0022-2615. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8411091> >.

SANTOS, D. F. D. et al. Revisiting primary neural leprosy: Clinical, serological, molecular, and neurophysiological aspects. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 11, n. 11, p. e0006086, Nov 2017. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29176796> >.

SAUER, M. E. et al. Genetics of leprosy: expected and unexpected developments and perspectives. **Clin Dermatol**, v. 33, n. 1, p. 99-107, 2015 Jan-Feb 2015. ISSN 1879-1131. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25432815> >.

SCHREUDER, P. A.; NOTO, S.; RICHARDUS, J. H. Epidemiologic trends of leprosy for the 21st century. **Clin Dermatol**, v. 34, n. 1, p. 24-31, 2016 Jan-Feb 2016. ISSN 1879-1131. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26773620> >.

SCHURING, R. P. et al. Association between anti-pGL-I IgM and clinical and demographic parameters in leprosy. **Lepr Rev**, v. 77, n. 4, p. 343-55, Dec 2006. ISSN 0305-7518. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17343221> >.

SCOLLARD, D. M. et al. The continuing challenges of leprosy. **Clin Microbiol Rev**, v. 19, n. 2, p. 338-81, Apr 2006. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16614253> >.

SCOLLARD, D. M.; TRUMAN, R. W.; EBENEZER, G. J. Mechanisms of nerve injury in leprosy. **Clin Dermatol**, v. 33, n. 1, p. 46-54, 2015 Jan-Feb 2015. ISSN 1879-1131. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25432810> >.

SHEPARD, C. C. THE EXPERIMENTAL DISEASE THAT FOLLOWS THE

INJECTION OF HUMAN LEPROSY BACILLI INTO FOOT-PADS OF MICE. **J Exp Med**, v. 112, n. 3, p. 445-54, Sep 1960. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19867175> >.

SIWAKOTI, S. et al. Evaluation of Polymerase Chain Reaction (PCR) with Slit Skin Smear Examination (SSS) to Confirm Clinical Diagnosis of Leprosy in Eastern Nepal. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 12, p. e0005220, Dec 2016. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28027305> >.

TALHARI, C.; TALHARI, S.; PENNA, G. O. Clinical aspects of leprosy. **Clin Dermatol**, v. 33, n. 1, p. 26-37, 2015 Jan-Feb 2015. ISSN 1879-1131. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25432808> >.

TALWAR, S.; JHA, P. K.; TIWARI, V. D. Neuritic leprosy: epidemiology and therapeutic responsiveness. **Lepr Rev**, v. 63, n. 3, p. 263-8, Sep 1992. ISSN 0305-7518. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1406021> >.

TELES, R. M. et al. Expression of metalloproteinases (MMP-2, MMP-9, and TACE) and TNF-alpha in the nerves of leprosy patients. **J Peripher Nerv Syst**, v. 12, n. 3, p. 195-204, Sep 2007. ISSN 1085-9489. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17868246> >.

TRUMAN, R. W. et al. Enumeration of Mycobacterium leprae using real-time PCR. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 2, n. 11, p. e328, 2008. ISSN 1935-2735. Disponível em t: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18982056> >.

TRUMAN, R. W. et al. Probable zoonotic leprosy in the southern United States. **N Engl J Med**, v. 364, n. 17, p. 1626-33, Apr 2011. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21524213> >.

VAN BRAKEL, W. H. et al. The INFIR Cohort Study: investigating prediction, detection and pathogenesis of neuropathy and reactions in leprosy. Methods and baseline results of a cohort of multibacillary leprosy patients in north India. **Lepr Rev**, v. 76, n. 1, p. 14-34, Mar 2005. ISSN 0305-7518. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15881033> >.

VAN BRAKEL, W. H. et al. Early diagnosis of neuropathy in leprosy--comparing diagnostic tests in a large prospective study (the INFIR cohort study). **PLoS Negl Trop Dis**, v. 2, n. 4, p. e212, Apr 2008. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18382604> >

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leprosy Resolution WHA 44.9**, Forty-fourth World Health Assembly. **Resolution**. Geneva, 1991. Disponível em: < http://www.who.int/neglected_diseases/mediacentre/WHA_44.9_Eng.pdf >

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leprosy Resolution WHA 51.15**, Fifty-first World Health Assembly. **Resolution**. Geneva, 1998. Disponível em: < http://www.who.int/neglected_diseases/mediacentre/WHA_51.15_Eng.pdf >

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Regional Office for South-East Asia. **Global Leprosy Strategy 2016-2020: Accelerating towards a leprosy-free world**. WHO Regional Office for South-East Asia. Disponível em: <<http://www.who.int/iris/handle/10665/208824>>

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Weekly epidemiological record**, v. 92, n. 35, p. 501-520. Sep 2017. Disponível em t: < <http://www.who.int/wer/2017/wer9235/en/>>

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chemotherapy of leprosy for control programmes**. Geneva, Switzerland, 1982. Disponível em: < http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/38984/1/WHO_TRS_675.pdf?ua=1 >

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Expert Committee on Leprosy: seventh report**. Geneva, Switzerland, 1998. Disponível em: < <http://apps.who.int/iris/handle/10665/42060> >

APÊNDICE A – dados clínicos e laboratoriais dos pacientes inseridos no estudo.

No. Amostra	Data de Nascimento	Data Caso Novo	Idade	Gênero	Naturalidade	Procedência	Mitsuda	Anti-PGL1(indice)	Baciloscopia O	Baciloscopia C	Baciloscopia J	Baciloscopia L	Biópsia	Classificação R&J	Classificação operacional	PCR	PCR MntH	PCR RLEP	PCR Ag85B	PCR Pra-36kDa	PCR GAPDH	
518	16/05/64	10/04/06	41	F	IPUÃ	SALES OLIVEIRA	N.R.	1.1	3+	3+	3+	3+	Epiderme sem particularidades. Derme com denso infiltrado inflamatório linfohistiocitário, com frequentes histiócitos xantomatosos. Fite-Faraco com grande quantidade de BAAR íntegros, formando globias.	LL	MB	POS	NEG	POS	NEG	NEG	N.R.	
606	28/04/45	11/10/06	61	M	PONTE VILA	ALTINÓPOLIS	N.R.	1.2	0	0	0	0	Epiderme com discreta hiperqueratose compacta, acantose leve. Derme com moderado e difuso infiltrado inflamatório mononuclear, com frequentes macrófagos xantomizados e células gigantes tipo Langhans, formando granulmas perianexiais e perivasculars. Pesquisa de BAAR negativa.	BT	PB	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	
698	02/12/49	11/04/07	57	F	SANTA ROSA DE VITERBO	SERRA AZUL	N.R.	8.7	4+	4+	4+	4+	Denso infiltrado inflamatório linfohistiocitário superficial e profundo, com destruição de anexos, histiócitos xantomatosos e algumas células gigantes. Fite-Faraco demonstrou grande quantidade de BAAR, formando globias	LL	MB	POS	NEG	POS	NEG	NEG	POS	
702	07/02/68	18/04/07	39	M	SÃO PAULO	AGUAÍ	N.R.	1.6	0	0	0	0	Epiderme atrófica. Derme superficial e profunda com granulomas constituídos por linfócitos, macrófagos e raras células gigantes tipo Langhans, ao redor de vasos e nervos. Pesquisa de BAAR negativa.	BT	PB	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	
730	06/03/36	16/05/07	71	F	BONFIM PAULISTA	RIBEIRÃO PRETO	N.R.	11.3	3+	3+	3+	1+	Epiderme sem alterações. Demre superficial e profunda com moderado infiltrado linfohistiocitário, com grande quantidade de macrófagos vacuolizados com agressão de feixes nervosos. Fite-Faraco com numerosos BAAR íntegros e formando globias	BB	MB	POS	NEG	POS	NEG	NEG	POS	
735	27/12/71	05/03/07	35	F	RIO CLARO	ANDRADINA	N.R.	5.2	0	0	0	0	Epiderme retificada. Fite-Faraco com BAAR em paredes vasculares, em geral íntegros, às vezes agrupados.	LL	MB	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	
742	20/09/76	11/07/07	30	F	UNIÃO - PI	MORRO AGUDO	9mm	0.4	0	0	0	0	Epiderme sem alterações. Derme com discreto infiltrado inflamatório linfocitário superficial e profundo, em trajetos vâsculo-nervosos, onde raramente observam-se alguns histiócitos epitelioides, tendendo a configurar granulomas. Ausência de BAAR.	TT	PB	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	
757	18/07/44	04/07/07	63	M	GUAPÉ - MG	RIBEIRÃO VERDE	N.R.	1.4	0	0	0	0	Infiltrado inflamatório linfohistiocitário perivascular e anexial, com macrófagos xantomatosos. Pesqusa de BAAR com diversos bacilos íntegros, formando globias.	LL	MB	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	
772	12/03/64	10/10/07	43	M	URAI - PR	TAQUARITINGA	0mm	0.5	0	0	0	N.R.	N.R.	BT	PB	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	
782	07/05/68	31/10/07	39	M	RIBEIRÃO PRETO	RIBEIRÃO PRETO	NEG	0.3	0	0	0	N.R.	Epiderme com discreta atrofia. Derme exibe infiltrado inflamatório linfohistiocitário perivascular e perianexial, com macrófagos xantomatosos nos filetes nervosos. Fite-Faraco revelou numerosos BAAR.	BB	MB	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	
788	04/08/80	09/10/07	27	F	RIBEIRÃO PRETO	GUATAPARÁ	N.R.	0.4	0	0	0	0	Epiderme sem alterações. Derme exibe discreto infiltrado inflamatório linfohistiocitário perivascular, perianexial e perineural. Ausência de BAAR.	I	PB	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	
809	14/03/77	13/02/08	30	M	ARARAQUARA	RIBEIRÃO PRETO	5mm	0.8	0	0	0	0	Infiltrado inflamatório linfohistiocitário perineural leve na derme superficial e profunda. Pesquisa de BAAR negativa.	TT	PB	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	
811	29/01/59	09/01/08	48	M	SANTA CRUZ DAS PALMEIRAS	SANTA ROSA DE VITERBO	N.R.	N.R.	3+	3+	3+	N.R.	Epiderme retificada. Derme exibe difuso infiltrado inflamatório linfohistiocitário, superficial e profundo, acompanhando anexos, vasos e nervos. Grande quantidade de BAAR formando globias.	LL	MB	POS	NEG	POS	NEG	NEG	N.R.	
812	25/03/60	09/01/08	47	M	BRODOWSKI	BRODOWSKI	N.R.	0.4	0	0	0	N.R.	Derme superficial e profunda com moderado infiltrado inflamatório granulomatoso composto por histiócitos epitelioides e células multinucleares envoltos por linfócitos, de distribuição perivascular, perianexial e perineural. Fite-Faraco com presença de um bacilo íntegro em meio a	BT	MB	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	
827	02/01/57	27/02/08	51	M	MONTESANTO - MG	RIBEIRÃO PRETO	N.R.	8.1	0	0	4+	N.R.	Epitélio atrófico, derme exibindo nódulo de proliferação histicitiária epiteloide englobando nervos, vasos e anexos. Fite-Faraco com inúmeros bacilos, geralmente íntegros, formando globias.	LL	MB	POS	NEG	POS	NEG	POS	POS	
835	18/08/82	05/03/08	25	F	RIBEIRÃO PRETO	GUATAPARÁ	NEG	0.3	0	0	0	N.R.	Epiderme com discreta hiperqueratose e focos de degeneração hidrópica da basal. Derme superficial com mínimo infiltrado inflamatório linfohistiocitário, perivascular e perianexial. Filetes nervosos preservados. Ausência de BAAR.	I	PB	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	
837	12/10/89	18/03/08	18	M	ILHA SOLTEIRA	RIBEIRÃO PRETO	N.R.	7.4	3+	3+	3+	N.R.	Epiderme retificada, derme exibe intenso infilrado inflamatório linfohistiocitário superficial e profundo acompanhando anexos, vasos e nervos, com células epitelioides xantomizadas, vesiculosas, algumas células gigantes. Fite-Faraco com abundantes BAAR íntegros em globias.	LL	MB	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS	
849	04/06/55	12/03/08	52	M	BORBOREMA	MATÃO	N.R.	9.2	0	0	0	0	Pele com atrofia epidérmica. Presença de intenso infiltrado inflamatório linfohistiocitário, perivascular, perianexial e perineural, superficial e profundo. Fite-Faraco com grande quantidade de BAAR em globias.	BL	MB	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	
854	22/01/85	26/03/08	23	M	SÃO FRANCISCO - PI	SERRANA	5mm	3.1	0	0	0	0	Epiderme sem alterações. Derme superficial e profunda com infiltrado inflamatório linfohistiocitário perivascular, com esboço de granulomas. Pesquisa de BAAR negativa.	BT	PB	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	
870	27/05/47	30/04/08	60	M	MORRO AGUDO	RIBEIRÃO PRETO	8mm	0.3	0	0	0	0	Moderado infiltrado inflamatório linfohistiocitário superficial e profundo de padrão intersticial, perivascular e perianexial, com formação de granulomas. Pesquisa de BAAR negativa.	TT	PB	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	
874	20/09/34	09/04/08	73	M	NOVA LIMA - MG	IGARAPAVA	N.R.	1.4	2+	2+	2+	2+	Infiltrado de macrófagos xantomatosos na derme superficial e profunda, perivascular. Fite-faraco com grande quantidade de BAAR no interior dos macrófagos, formando globias.	LL	MB	POS	NEG	POS	NEG	NEG	POS	
880	07/06/90	28/05/08	17	M	PITANGUEIRAS	PITANGUEIRAS	N.R.	10.2	0	0	0	N.R.	Epiderme retificada. Derme com numerosos histiócitos vacuolizados envolvendo feixes vâsculo-nervosos. Fite-Faraco evidencia numerosos BAAR em filetes nervoso, macrófagos e células endoteliais.	LL	MB	POS	NEG	POS	NEG	NEG	N.R.	
888	15/10/55	25/06/08	52	F	SANTA HELENA - GO	PONTAL	N.R.	1.6	0	0	0	0	Epiderme com discreta atrofia. Derme superficial e profunda com intenso infiltrado inflamatório linfohistiocitário com granulomas epitelioides, perivascular, perianexial, perineural. Não foram identificados BAAR.	BT	PB	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	
905	31/10/58	22/07/08	49	M	CAJURU	CAJURU	N.R.	0.6	0	0	0	N.R.	Epiderme sem alterações. Presença de granulomas epitelioides bem formados acometendo derme superficial e profunda, acompanhando trajetos vâsculo-nervosos. Fite-Faraco sem BAAR.	TT	PB	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	
910	18/01/56	02/07/08	52	M	RIBEIRÃO PRETO	RIBEIRÃO PRETO	N.R.	1.5	1+	1+	1+	1+	Derme com infiltrado inflamatório linfohistiocitário acompanhando anexos, vasos e nervos, superficial e profundo, com inúmeras células de Virchow. Fite-Faraco com abundantes BAAR, isolados e agrupados, nos histiócitos.	BL	MB	POS	NEG	POS	NEG	NEG	N.R.	N.R.
914	07/01/83	13/08/08	25	M	ANDRADAS - MG	SANTO ANTÔNIO	4mm	0.4	0	0	0	N.R.	Secções transversais de nervo periférico aparentemente atrófico, sem sinais de inflamação ou granulomas. Fite-Faraco demosntrou raros bacilos no interior do nervo.	BB	MB	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	
923	27/09/61	03/09/08	46	F	SERTANÓPOLIS - PR	RIBEIRÃO PRETO	N.R.	1.1	1+	1+	1+	N.R.	Derme com granulomas epitelioides mal formados compostos por macrófagos e linfócitos. Fite-Faraco com grande quantidade de BAAR no interior dos macrófagos.	BL	MB	POS	NEG	POS	NEG	NEG	N.R.	
924	21/07/58	02/09/08	50	M	RINCÃO	RINCÃO	N.R.	1.8	0	0	0	N.R.	Atrofia e retificação epidérmica, infiltrado inflamatório linfohistiocitário perivascular, perianexial e perineural, superficial e profundo, inclusive no subcutâneo. Fite-Faraco com grande quantidade de BAAR.	BL	MB	POS	POS	NEG	POS	POS	POS	
925	04/09/66	22/07/08	41	F	BRODOWSKI	BRODOWSKI	9mm	0.6	0	0	0	0	Epiderme preservada. Derme com infiltrado inflamatório granulomatoso perivascular, perianexial e perineural, superficial e profundo. Pesquisa de BAAR negativa.	TT	PB	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	
929	16/02/67	27/08/08	41	F	MINAS NOVAS - MG	BARRINHA	N.R.	1.3	0	0	0	N.R.	Epiderme sem alterações. Derme exibe discreto infiltrado inflamatório linfohistiocitário perivascular, perianexial e perineural. Alguns BAAR íntegros em filetes nervosos.	BT	MB	POS	NEG	POS	NEG	NEG	N.R.	
933	08/12/54	27/08/08	53	M	CAJURU	SERRANA	NEG	2.6	0	0	0	0	Epiderme preservada, derme com discreto infiltrado inflamatório linfohistiocitário em derme superficial, ao redor de vasos, nervos e anexos. Fite-Faraco com BAAR íntegros em filetes nervosos e histiócitos.	BL	MB	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	
945	26/09/58	08/10/08	50	M	FRANCA	RESTINGA	NEG	6.7	0	0	0	N.R.	Pele com discreta acantose. Derme superficial e profunda com moderado infiltrado linfohistiocitário, perivascular e perianexial, com esboço de granulomas. Fite-Faraco com frequentes BAAR.	BL	MB	POS	NEG	POS	N.R.	N.R.	POS	
946	25/04/75	08/10/08	33	M	SÃO JERÔNIMO - PR	ORLÂNDIA	NEG	5.1	3+	3+	3+	N.R.	Epiderme sem alterações, na derme superficial e profunda infiltrado inflamatório linfocitário perivascular e perianexial. Ausência de histiócitos e granulomas epitelioides. Fite-Faraco com vários BAAR, isolados ou em globias, nos anexos cutâneos, filetes nervosos e paredes vasculares.	LL	MB	POS	NEG	POS	NEG	N.R.	N.R.	
952	23/08/53	22/10/08	55	M	JIQUITAI - MG	BARRINHA	2mm	3.5	0	0	0	0	Epiderme sem particularidades. Infiltrado inflamatório linfohistiocitário na derme superficial e profunda, perivascular, perianexial, perineural. Presença de granulomas epitelioides frouxos, com linfócitos de permeio. Fite-Faraco com bacilos íntegros, isolados ou agrupados, em histiócitos.	BB	MB	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	
979	04/07/73	19/11/08	35	M	SÃO RAIMUNDO NONATO - PI	SERRANA	N.R.	7.2	1+	1+	1+	N.R.	Epiderme sem alterações. Derme exibe infiltrado inflamatório linfohistiocitário perivascular, perianexial, envolvendo feixes vâsculo-nervosos e poupando a região subepidérmica, com esboços de granulomas epitelioides. Fite-Faraco com numerosos bacilos, formando globias.	LL	MB	POS	NEG	POS	NEG	POS	N.R.	
982	16/01/44	06/11/08	64	M	ITAMOGI - MG	MOCOCA	N.R.	N.R.	1+	1+	2+	N.R.	Pele com proliferação de epitélio escamoso, com atipias moderadas e exocitose de neutrófilos. Na derme superficial e profunda, agregados de células inflamatórias com histiócitos xantomizados. Fite-Faraco com inúmeras estruturas compatíveis com BAAR.	LL	MB	POS	NEG	POS	NEG	NEG	N.R.	
1088	03/04/44	02/12/09	65	M	CORONEL PROCÓPIO - PR	ORLÂNDIA	N.R.	4.3	2+	4+	4+	3+	Epiderme retificada. Derme superficial e profunda com denso infiltrado inflamatório linfohistiocitário, perivascular e perianexial, sem formação de granulomas ou células gigantes multinucleadas. Notam-se frequentes células de Virchow. Fite-Faraco demonstra inúmeros bacilos livres.	LL	MB	POS	POS	POS	POS	NEG	N.R.	
1149	15/07/44	04/08/10	66	M	CARBONITA - MG	SERRANA	N.R.	13.3	1+	1+	3+	1+	Epiderme atrófica, retificada. Derme com denso infiltrado inflamatório histiocítico perivascular, superficial e profundo, com frequentes globias (Fite-Faraco). Presença de zona de Grenz.	BL	MB	POS	NEG	POS	NEG	NEG	POS	
1153	15/08/58	30/06/10	51	M	RIBEIRÃO PRETO	BONFIM PAULISTA	N.R.	0.4	3+	3+	1+	1+	Epiderme preservada. Derme com denso infiltrado inflamatório linfo histicitário perivascular, perianexial e perineural, superficial e profundo, com células de Virchow. Fite-Faraco revela frequentes bacilos, íntegros e fragmentados, formando globias.	BL	MB	POS	NEG	POS	NEG	NEG	N.R.	

N.R.: Não realizado

POS: Positivo

NEG: Negativo

I: Hanseníase Indeterminada

TT: Hanseníase Tuberculoide

BT: Hanseníase Dimorfa-Tuberculoide

BB: Hanseníase Dimorfa-Dimorfa

BL: Hanseníase Dimorfa-Virchowiana

LL: Hanseníase Virchowiana

PB: Paucibacilar

MB: Multibacilar

ANEXO A – Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE E DA ESPECIFICIDADE DA PCR COM PRIMERS PARA O GENE MntH DO BACILO *M. leprae* E DO ENSAIO ELISA COM OLIGOPEPTÍDEOS mntH NO DIAGNÓSTICO DA HANSENÍASE

Pesquisador: VICTOR HUGO DAMASCENO FERNANDES

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 38527314.0.1001.5440

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP -

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 994.617

Data da Relatoria: 19/03/2015

Apresentação do Projeto:

Serão coletadas amostras de linfa e raspado dérmico (das orelhas, cotovelos e joelhos), biópsia de pele e sangue de pacientes em investigação de hanseníase, bem como linfa, raspado dérmico e amostra de sangue dos contactantes domiciliares desses pacientes. As amostras de linfa, raspado e biópsia serão submetidas a PCR (reação em cadeia da polimerase) para amplificação do gene MntH, específico do bacilo causador da hanseníase,

M. leprae. As amostras de sangue serão processadas para realização de teste Elisa para busca de anticorpos anti peptídeos da proteína MntH. Os resultados serão comparados com as técnicas habituais para diagnóstico da hanseníase (baciloscopia da linfa e raspado dérmico), ELISA anti-PGL1 e PCR para outros genes já descritos na literatura, a fim de comparar a sensibilidade e especificidade dos novos métodos que propomos com os já existentes.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a sensibilidade e a especificidade da PCR com primers específicos para o gene MntH do bacilo *M. leprae* e do ensaio Elisa com peptídeos do MntH para o diagnóstico da hanseníase e contatos: Os resultados dos testes convencionais de ELISA anti-PGL-1 serão comparados com o teste ELISA padronizado in house utilizando-se nove sequências peptídicas específicas da proteína

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

ANEXO A – Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa (cont.)

Continuação do Parecer: 994.617

mntH do bacilo *M. leprae* em amostras de soro; Verificar a sensibilidade da PCR, convencional e em tempo real, com primers específicos para o gene MntH na identificação de *M. leprae*, em amostras de sangue, de linfa, de raspado dérmico de pacientes com as formas paucibacilar e multibacilar, assim como em comunicantes, na proporção mínima de 4:1. Nos pacientes a PCR também será feita em biópsias de pele. Os resultados serão comparados àqueles com primers descritos na literatura, assim como à baciloscopia convencional nas respectivas amostras.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: não há riscos adicionais, pois serão utilizadas as mesmas amostras que já são colhidas habitualmente para a investigação de Hanseníase, em um único momento - todos os procedimentos tem riscos mínimos e são realizados rotineiramente no serviço, sem complicações habituais: Coleta de linfa/raspado dérmico - desconforto local durante a coleta; sangramento leve após a coleta, que usualmente cessa em minutos; Coleta de sangue - dor local discreta; formação de equimoses; sangramento breve; Coleta de amostra de pele - reação alérgica ao anestésico; hipotensão por reflexo vagal; sangramento local; infecção. Os contactantes serão submetidos apenas à coleta de linfa/raspado dérmico e de sangue, com os riscos descritos acima.

Benefícios: As novas técnicas diagnósticas propostas podem ajudar no diagnóstico de casos de hanseníase, especialmente nas formas paucibacilares, levando a tratamento precoce e prevenção de incapacidades. Os comunicantes também terão a oportunidade, caso infectados, de ter o diagnóstico precoce, mesmo antes de manifestações clínicas da doença, evitando assim a progressão para lesões neurais e deformidades.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O bacilo *M. leprae*, não cultivável in vitro, é dificilmente detectado em amostras de pacientes com a forma clínica paucibacilar da hanseníase, assim como em comunicantes (os quais podem estar infectados sem, contudo, terem desenvolvido ainda a doença). Os exames baciloscópicos, de PCR (polymerase chain reaction) e sorológicos contribuem para o diagnóstico, porém, não há teste padrão ouro para tal. Nosso grupo desenhou pares de

primers que amplificam por PCR fragmento interno do gene MntH (proton dependent manganese transporter) do bacilo *M. leprae*, mostrando 100% de especificidade nas várias amostras testadas. Tem-se por objetivos: (1) comparar os resultados de sensibilidade e de especificidade (e valores preditivos) do ensaio ELISA anti-PGL-1 com o teste ora proposto - ELISA-mntH, utilizando-se nove sequências peptídicas da proteína mntH em

amostras de soro de doentes e comunicantes; (2) verificar a sensibilidade da PCR-MntH na

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

ANEXO A – Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa (cont.)

Continuação do Parecer: 994.617

identificação de *M. leprae*, em amostras de DNA de sangue, linfa e raspado dérmico nos doentes e comunicantes, adicionando-se a biópsia de lesão nos doentes, cujos resultados serão comparados à baciloscopia convencional nas respectivas amostras, assim como aos resultados das PCRs descritos na literatura, de acordo com a amostra e população estudadas. Os resultados da PCR serão comparados nas amostras coletadas do mesmo indivíduo, com a finalidade de mostrar similar sensibilidade em amostras de fácil

acesso para coleta, principalmente em crianças, como linfa e raspado dérmico. Assim, esse projeto poderá contribuir para o diagnóstico precoce da hanseníase na população do SUS, em amostras de fácil acesso, em pacientes e comunicantes, especialmente em crianças, contribuindo para a interrupção da cadeia de transmissão.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram anexados todos os documentos solicitados no último parecer deste CEP.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O CEP aprovou os seguintes documentos:

- Projeto de Pesquisa versão 2 de 18/03/2015;
- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido–Pacientes–Versão 2–24/02/2015;
- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido–Comunicantes–Versão 2–24/02/2015;
- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Guarda de Material Biológico Contactantes–Versão 2–26/02/2015;
- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Guarda de Material Biológico Pacientes–Versão 2–26/02/2015.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

ANEXO A – Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa (cont.)

Continuação do Parecer: 994.617

RIBEIRAO PRETO, 23 de Março de 2015

Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
(Coordenador)

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

ANEXO B – Aprovação do armazenamento e uso das amostras em banco

Ribeirão Preto, 28 de fevereiro de 2007

Ofício nº 572/2007
CEP/MGV

Prezada Professora,

O Comitê de Ética em Pesquisa recebeu carta, onde Vossa Senhoria encaminha a proposta de criação de um banco de amostras de biópsias de pele e de sangue de pacientes com os diagnósticos de leishmaniose tegumentar americana, hanseníase e outras doenças granulomatosas.

Sobre o assunto, o Comitê de Ética em Pesquisa em sua 241ª Reunião Ordinária realizada em 26.02.2007, analisou a proposta de criação e a enquadrrou na categoria: **APROVADO**, de acordo com o Processo HCRP nº 3605/2006.

Atenciosamente.

DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssima Senhora
PROFª DRª ANA MARIA FERREIRA ROSELINO
Laboratório de Biologia Molecular – Anexo B – FMRP-USP

ANEXO C – Termo de consentimento livre e esclarecido para coleta de amostra de pacientes

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PACIENTES

Projeto: AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE E DA ESPECIFICIDADE DA PCR COM PRIMERS PARA O GENE *MntH* DO BACILO *M. leprae* E DO ENSAIO ELISA COM OLIGOPEPTÍDEOS *MntH* NO DIAGNÓSTICO DA HANSENIASE.

Pesquisador responsável: Victor Hugo Damasceno Fernandes – Aluno de pós-graduação, Nível Doutorado Direto – FMRP-USP. Telefones para contato: (16) 3602-5161, (16) 3602-2747, (16) 98112-5808.

A hanseníase é uma doença contagiosa, causada pela bactéria *Mycobacterium leprae*, que acomete a pele e os nervos. Representa um problema de saúde pública mundial, principalmente no Brasil, e seu diagnóstico tardio pode levar à perda da sensibilidade e deformidades dos membros devido ao acometimento dos nervos, e incapacidade do indivíduo para o trabalho. O tratamento precocemente instituído pode impedir essa evolução, prevenindo o grave acometimento neural. Diversos estudos vêm sendo realizados com a finalidade de desenvolver um método laboratorial que auxilie no diagnóstico dos casos de hanseníase que deixam dúvidas. Entretanto, ainda não há uma técnica laboratorial que tenha se mostrado altamente sensível e específica para o seu diagnóstico.

Você está sendo convidado a participar de um estudo que poderá introduzir novas metodologias para o diagnóstico da hanseníase: faremos a pesquisa do agente etiológico *M. leprae* por PCR (reação em cadeia da polimerase) e a identificação de antígenos contra o bacilo por ELISA (teste sorológico). Os resultados serão comparados aos já existentes na literatura.

Vimos solicitar a sua permissão para utilizar:

- (1) Amostra de DNA extraído da biópsia de lesão da pele. Duas biópsias contíguas são realizadas - uma para o exame histopatológico e outra para PCR para *M. leprae* - com punch 0,4 cm. A anestesia local é feita em um só momento. Na nossa pesquisa utilizaremos o DNA extraído da amostra encaminhada para PCR no Setor de Dermatologia.
- (2) 20mL de sangue, coletado por venopunção, do qual são extraídos: o soro para o exame de ELISA e o DNA para PCR para *M. leprae*;
- (3) “Sobra” da linfa e do raspado dérmico, coletados dos lóbulos das orelhas, joelhos, cotovelos e eventual lesão cutânea. Essa coleta é realizada rotineiramente, sendo o material alocado em lâmina de vidro e encaminhado ao laboratório de Microbiologia para pesquisa de BAAR. A “sobra” do material será acondicionada em papel filtro para realização da PCR. Todos esses materiais serão acondicionados no Biorrepositório de Amostras de Hanseníase do Laboratório de Dermatologia do HCRP.

Os procedimentos são rotineiros no nosso serviço e não são observados efeitos colaterais graves usualmente. Podemos destacar, como riscos:

- Biópsia de pele – desconforto durante a anestesia; reação alérgica ao anestésico; hipotensão; sangramento local; infecção;
- Punção para coleta de sangue – desconforto local durante a coleta; formação de equimoses (manchas roxas na pele);
- Coleta de linfa/raspado dérmico – desconforto local durante a coleta; sangramento local que cessa em alguns minutos.

Para minimização dos riscos e desconforto durante os procedimentos, são utilizados materiais descartáveis, técnicas de limpeza, assepsia e hemostasia. Em caso de qualquer dúvida sobre os procedimentos, você pode contactar o pesquisador responsável ou o HCRP pelos telefones fornecidos acima. Para esclarecimentos de questões éticas, você também pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP pelo telefone (16) 3602-2228.

As amostras de pele, sangue e linfa serão submetidas a novos exames que não fazem parte da rotina para o atendimento em hanseníase. Você terá acesso a esses resultados durante suas consultas e eles podem, inclusive, auxiliar no diagnóstico da sua doença. Os resultados serão publicados em revistas de trabalhos científicos, mas seu nome não será identificado.

Você tem a liberdade de retirar o seu consentimento a qualquer momento, sem que isso prejudique ou altere o seu atendimento médico. Não haverá gastos durante a pesquisa, enfatizando que sua participação é muito importante para a nossa pesquisa.

Agradeço a sua colaboração, assinando juntamente este termo em duas vias, uma das quais ficará em sua posse.

Estou ciente e de acordo,

Nome do Paciente: _____

Data: _____

Assinatura do Paciente: _____

Pesquisador Responsável: _____

Data: _____

Assinatura do Pesquisador: _____

ANEXO D – Termo de consentimento livre e esclarecido para guarda de amostra em biorrepositório

TERMO DE CONSENTIMENTO PARA GUARDA DE MATERIAL BIOLÓGICO - PACIENTES

Projeto: AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE E DA ESPECIFICIDADE DA PCR COM PRIMERS PARA O GENE *MntH* DO BACILO *M. leprae* E DO ENSAIO ELISA COM OLIGOPEPTÍDEOS *MntH* NO DIAGNÓSTICO DA HANSENÍASE.

Pesquisador responsável: Victor Hugo Damasceno Fernandes – Aluno de pós-graduação, Nível Doutorado Direto – FMRP-USP. Telefones para contato: (16) 3602-5161, (16) 3602-2747, (16) 98112-5808.

Eu, Victor Hugo Damasceno Fernandes, responsável pelo Biorrepositório de Amostras de Hanseníase criado no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto com o objetivo de guardar amostras de sangue, linfa, raspado dérmico e biópsia de pele para a realização de testes diagnósticos para Hanseníase referente ao Projeto de pesquisa Avaliação da sensibilidade e da especificidade da PCR com primers para o gene *MntH* do bacilo *M. leprae* e do ensaio ELISA com oligopeptídeos *MntH* no diagnóstico da Hanseníase, gostaria de convidá-lo (a) para guardar amostra de sangue, linfa, raspado dérmico e biópsia de pele sua para fins de pesquisa e análise científica. Sua participação é voluntária, tendo liberdade de aceitar ou não que sua amostra seja guardada, sem risco de qualquer penalização ou prejuízo no atendimento que lhe for prestado. O (A) Sr. (a) também tem o direito de retirar seu consentimento a qualquer momento.

Este material será coletado durante sua consulta no Ambulatório de Dermatologia. Após coletado será guardado em freezer próprio para estocagem de amostras biológicas. Eu, como responsável pela pesquisa, me comprometo a identificar as amostras e os dados coletados de modo que garanta o seu sigilo e a sua confidencialidade; para isso as suas amostras de sangue, linfa, raspado dérmico e biópsia de pele serão identificadas por meio de números de registro.

Vimos solicitar a sua permissão para utilizar:

- (1) Amostra de DNA extraído da biópsia de lesão da pele. Duas biópsias contíguas são realizadas - uma para o exame histopatológico e outra para PCR para *M. leprae* - com punch 0,4 cm. A anestesia local é feita em um só momento. Na nossa pesquisa utilizaremos o DNA extraído da amostra encaminhada para PCR no Setor de Dermatologia.
- (2) 20mL de sangue, coletado por venopunção, do qual são extraídos: o soro para o exame de ELISA e o DNA para PCR para *M. leprae*;
- (3) “Sobra” da linfa e do raspado dérmico, coletados dos lóbulos das orelhas, joelhos, cotovelos e eventual lesão cutânea. Essa coleta é realizada rotineiramente, sendo o material alocado em lâmina de vidro e encaminhado ao laboratório de Microbiologia para pesquisa de BAAR. A “sobra” do material será acondicionada em papel filtro para realização da PCR. Todos esses materiais serão acondicionados no Biorrepositório de Amostras de Hanseníase do Laboratório de Dermatologia do HCRP.

Os procedimentos são rotineiros no nosso serviço e não são observados efeitos colaterais graves usualmente. Podemos destacar, como riscos:

- Biópsia de pele – desconforto durante a anestesia; reação alérgica ao anestésico; hipotensão; sangramento local; infecção;
- Punção para coleta de sangue – desconforto local durante a coleta; formação de equimoses (manchas roxas na pele);
- Coleta de linfa/raspado dérmico – desconforto local durante a coleta; sangramento local que cessa em alguns minutos.

Para minimização dos riscos e desconforto durante os procedimentos, são utilizados materiais descartáveis, técnicas de limpeza, assepsia e hemostasia. Em caso de qualquer dúvida sobre os procedimentos, você pode contactar o pesquisador responsável ou o HCRP pelos telefones fornecidos acima. Para esclarecimentos de questões éticas, você também pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP pelo telefone (16) 3602-2228.

As amostras de pele, sangue e linfa serão submetidas a novos exames que não fazem parte da rotina para o atendimento em hanseníase. Você terá acesso a esses resultados durante suas consultas e eles podem, inclusive, auxiliar no diagnóstico da sua doença. Os resultados serão publicados em revistas de trabalhos científicos, mas seu nome não será identificado.

Solicitamos também os dados de contato do(a) senhor (a), para que seja possível encontrá-lo(a) posteriormente. Através dos contatos, garantimos fornecer as informações de seu interesse, além de receber eventuais benefícios provenientes do estudo com seu material biológico. Também solicitaremos autorização, caso seja necessário, para o descarte do material armazenado, em caso de contaminação do material ou interrupção da pesquisa.

Dados do doador:

Nome:

Endereço:

RG:

Telefone:

Agradeço a sua colaboração, assinando juntamente este termo em duas vias, uma das quais ficará em sua posse.

Estou ciente e de acordo,

Nome do Paciente: _____

Data: _____

Assinatura do Paciente: _____

Pesquisador Responsável: _____

Data: _____

Assinatura do Pesquisador: _____

ARTIGO

ABSTRACT

Introduction: Polymerase chain reaction (PCR) is sensitive in diagnosing leprosy. Lymph smears can be readily acquired in fieldwork.

Methods: PCR was performed in lymph smears, stored in filter paper, using four sets of primers. Results were compared to other tests.

Results: PCR with Ag85B, *MntH* and Pra36-kDa primers were statistically similar. RLEP primers were superior to the other ones ($p < 0.001$) and equivalent to serology and bacilloscopy amongst MB patients. 100% of the PB group had negative PCR.

Conclusion: PCR in lymph smears stored in filter paper is useful in leprosy diagnosis. RLEP primers showed the greatest positivity in our study.

Key words: Bacilloscopy; ELISA; leprosy; PGL1; RLEP.

FULL TEXT

Worldwide, in the last decade, leprosy new case detection rate is decreasing in a very slow pace – in fact, in the last World Health Organization (WHO) report, there were 4,043 more new cases in comparison to the previous year [1]. Besides that, active case finding programs show that the incidence of the disease is much greater than what is reported [2]. Recognizing leprosy's etiology remains challenging in some cases in which clinical presentation is not exuberant and laboratory tests fail to detect the presence of the bacillus. Facing this scenario, the development of tests that can be easily applied in the field and provide aid in the therapeutic decision to health personnel will facilitate diagnosis, reduce transmission and prevent incapacities.

Polymerase chain reaction (PCR) has been used as a sensitive method in detecting the presence of *Mycobacterium leprae* in different clinical samples – skin biopsy, blood, nasal swab, oral mucosae, lymph, and urine. There are also several pairs of primers described in the literature, with varying sensitivity depending on primer and sample choice. However, there is still no standardized protocol, and each laboratory executes the test in its own manner. Most papers rely on skin biopsies to acquire DNA for PCR, a method that requires trained medical staff and infrastructure to be performed. Lymph samples are readily available in fieldwork. They can be obtained through minimally invasive procedure, without the need of a physician. In addition, samples collected in filter paper can be stored in envelopes at room temperature, allowing their mailing to referral centers, where they can be processed. Hence, lymph samples are a promising material to be used in the evaluation of suspected cases of leprosy.

The objective of this paper was to evaluate the extraction of DNA from lymph smear samples collected in filter paper and its use in PCR for the detection of *M. leprae*. We compare four pairs of primers previously described in the literature (Ag85B, *MntH*, Pra-36kDa and RLEP) and the PCR results to those seen in conventional laboratory techniques for leprosy diagnosis, such as anti-PGL-1 serology and bacilloscopy.

For that, lymph samples were collected from ear lobes, elbows and knees from 39 patients seen in the outpatient clinic of a referral center in Ribeirão Preto, state of São Paulo, Brazil, from 2006 to 2010. The site of collection was cleaned with

70% alcohol and pinched with haemostatic forceps until surface bleaching. The skin was then superficially incised with a sterile surgical blade and the bottom of the incision was scraped. The resulting material was smeared in microscope slides for Ziehl-Neelsen staining and bacilloscopy. A new scraping was made and the material allocated in filter paper and stored at room temperature until DNA extraction. For the extraction, DNA was first eluted in DNase free water at 95 °C for 15 minutes. Samples were stored at -80°C until further processing. For DNA extraction, a pool of ear lobes, knees and elbows DNA extracted from lymph smear collected from each patient were combined and extraction was carried out using NucleoSpin Tissue XS (Macherey-Nagel, Germany), following the manufacturer's instructions for dried bloodstains. The resulting DNA was used in conventional PCR with the four selected primers, as described elsewhere [3-6]. Positivity was assessed by visualization of the expected amplicon in 2% agarose gel. All samples in which the four PCRs were negative were tested for the presence of endogenous DNA using qPCR for the human GPADH gene. Samples with negative qPCR were excluded from the study. Thirty-nine patients composed the population of the study, divided in 12 (30.76%) paucibacillary (PB) and 27 (69.23%) multibacillary (MB), according to WHO operational classification [7]. Anti-PGL-1 serology was tested in 37 patients and resulted above the cut-off value in 25 (67.56%) of them [4 (33.33%) PB and 21 (84%) MB patients]. PB patients classified as borderline-tuberculoid (BT) by Ridley-Jopling classification [8] had positive ELISA in 4 (80%) of them. In the MB group, positive serology was seen in 1 (50%) BT, 2 (50%) mid-borderline (BB), 7 (87.5%) borderline-lepromatous (BL) and 11 (100%) lepromatous (LL) patients. Bacilloscopy and skin biopsy were positive for the presence of *M. leprae* in 15 (55.55%) and 27 (100%) of MB patients, respectively. There was no PCR amplification in the PB group and, therefore, serology was the only positive test amongst them. Regarding the MB group, PCR was positive in 19 (70.37%) of the patients when considered the results of the four primers together (7.69% with Ag85B, 11.11% with *MntH*, 12.5% with Pra-36kDa and 66.66% with RLEP), as shown in table 1. PCR with RLEP primers showed greater positivity when compared to the other three primers ($p<0.001$). There was no statistical difference when comparing *MntH* with Ag85B and Pra-36kDa ($p=0.317$; $p=1.0$, respectively), as well as between Ag85B and Pra-36kDa ($p=0.564$). Comparisons of the PCR results amongst the four sets of primers can be seen in table 2. Bacilloscopy had greater positivity than PCR with Ag85B ($p<0.001$), *MntH*

($p=0.001$) and Pra-36kDa ($p=0.004$); similar to PCR with RLEP ($p=0.083$) and inferior to the results of PCR with the four pair of primers ($p=0.046$). Four samples with a negative bacilloscopy had positive PCR (3 with RLEP primers and one with the remaining sets). Furthermore, in the MB group, anti-PGL-1 serology was superior to PCR results with Ag85B, *MntH* and Pra-36kDa ($p<0.001$) and to bacilloscopy ($p=0.011$); with no statistical difference when compared to the results of PCR with RLEP primers ($p=0.059$) or to PCR with the four primers combined ($p=0.102$). One patient with negative serology had positive PCR using RLEP primers. Data comparing serology, bacilloscopy and PCR results are summarized in table 3.

Several studies using lymph or slit skin smears in the detection of *M. leprae* through PCR with many techniques for DNA extraction were reported. For example, Kang et al. [9] extracted DNA from the scalpel blade used for collecting bacilloscopy and found 73% positivity with RLEP primers – 67.7% of samples with negative bacilloscopy presented positive PCR. Siwakoti et al. [10] extracted DNA from microscope slides used for bacilloscopy, with 44% sensitivity of the PCR in PB patients.

Ours is the first study to use the collection of lymph smear in filter paper to perform PCR in the diagnosis of leprosy. We did not observe amplification of DNA in the PB group with any of the primers used. In the MB group, PCR with RLEP primers showed positivity similar to other reports, while the other primers also had poor results. These results may be explained by the method used for DNA extraction. Since the samples were previously eluted in water, it is possible that endogenous nucleases and other PCR inhibitors contributed to the degradation; also, the presence of bacteria and fungi has a destructive impact on double-stranded DNA; and repeated cycles of freezing and thawing may reduce the yield of DNA extraction, making it harder to succeed in amplification [11, 12]. It is also described that blood stored as bloodstains is more suitable for detecting mRNAs than blood samples [13], which encourages the storage of lymph samples in filter paper, and not after elution. Currently, *FTA Elute Cards* are a novel technology for sample collection. The cards are coated with substances that lyse cell walls and retain inhibitors, allowing DNA extraction through water/heat protocol.

The greater positivity observed with RLEP primers may be due to the presence of multiple copies in the *M. leprae* genome, therefore augmenting the chance of primer annealing and DNA amplification. Besides the possibility of sample

degradation, many studies use real-time PCR (qPCR), which is a more sensitive method for detecting small quantities of DNA. Truman et al. [14] have shown that through qPCR it is possible to detect 10fg of *M. leprae* isolated DNA, which equals about 3 bacterial genomes. In clinical samples, the same study was able to detect 300 copies of the genome, a much smaller number than the 10^4 bacilli necessary for detection in bacilloscopy. Also, even using the RLEP region as target, different primers may show variable sensitivity, and therefore refinements of the method may enhance the bacillus detection [15].

PCR with RLEP primers in lymph samples collected in filter paper have shown similar positivity when compared to anti-PGL-1 ELISA and bacilloscopy in diagnosing MB leprosy. Therefore, this seems to be a promising method for the investigation of suspected cases. Furthermore, it was positive in one sample in which serology was negative and in three samples with negative bacilloscopy. PCR with Ag85B, *MntH* and Pra-36kDa primers also detected *M. leprae* in one sample with both negative bacilloscopy and negative PCR with RLEP primers. This data shows that, combined, different laboratory techniques enhance leprosy diagnosis.

New studies must focus on more sensitive techniques, such as qPCR, to enhance the *M. leprae* detection. In addition, special care should be taken regarding sample collection and processing, in order to prevent DNA degradation.

The authors declare no conflict of interest. We thanks the Fundação Paulista Contra a Hanseníase and FAEPA for financial support.

TABLES

Table 1 – Frequency of PCR positivity amongst MB leprosy patients according to Ridley and Jopling's classification

	Positive PCR - N (%)				
	All MB patients	BT	BB	BL	LL
4 pairs of primers	19 (70,37)	1 (50)	1 (25)	6 (75)	11 (84,61)
<i>MntH</i>	3 (11,11)	0 (0)	0 (0)	1 (12,5)	2 (15,38)
RLEP	18 (66,66)	1 (50)	1 (25)	5 (62,5)	11 (84,61)
Ag85B	2 (7,69)	0 (0)	0 (0)	1 (14,28)	1 (7,69)
Pra-36kDa	3 (12,5)	0 (0)	0 (0)	1 (16,66)	2 (16,66)

Table 2 – Comparison between the results of PCR with Ag85B, *MntH*, Pra-36kDa and RLEP primers, in MB leprosy patients

PCR	RLEP		<i>P</i> -value
	+	-	
	N (%)	N (%)	
Ag85B			
+	1	1	p<0,001
-	16	8	
<i>MntH</i>			
+	2	1	p<0,001
-	16	8	
Pra-36kDa			
+	2	1	p=0,001
-	13	8	

Table 3 – Comparison of the frequencies of positivity amongst the PCR, anti-PGL-1 serology and bacilloscopy in MB leprosy patients

PCR	Anti-PGL-1 ELISA		Bacilloscopy	
	+	-	+	-
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
All primers				
+	16 (64)	1 (4)	15 (55,55)	4 (14,81)
-	5 (20)	3 (12)	0 (0)	8 (29,62)
p-value	0,102		0,046	
Ag85B				
+	2 (8,33)	0 (0)	1 (3,84)	1 (3,84)
-	18 (75)	4 (16,66)	14 (53,84)	10 (38,46)
p-value	<0,001		<0,001	
MntH				
+	3 (12)	0 (0)	2 (7,40)	1 (3,70)
-	18 (72)	4 (16)	13 (48,14)	11 (40,74)
p-value	<0,001		0,001	
RLEP				
+	15 (60)	1 (4)	15 (55,55)	3 (11,11)
-	6 (24)	3 (12)	0 (0)	9 (33,33)
p-value	0,059		0,083	
Pra-36kDa				
+	3 (13,63)	0 (0)	2 (8,33)	1 (4,16)
-	15 (68,18)	4 (18,18)	11 (45,83)	10 (41,66)
p-value	<0,001		0,004	

REFERENCES

1. World Health Organization. Weekly epidemiological report. Sep 2017 [Internet]. [cited 2018 april 19]. Available from: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/258841/WER9235.pdf?sequence=1>
2. Salgado CG, Barreto JG, da Silva MB, Goulart IMB, Barreto JA, de Medeiros Junior NF, et al. Are leprosy case numbers reliable? *Lancet Infect Dis*. 2018;18(2):135-7.
3. Martinez AN, Britto CF, Nery JA, Sampaio EP, Jardim MR, Sarno EN, et al. Evaluation of real-time and conventional PCR targeting complex 85 genes for detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin biopsy samples from patients diagnosed with leprosy. *J Clin Microbiol*. 2006;44(9):3154-9.
4. Cruz AF, Furini RB, Roselino AM. Comparison between microsatellites and *Mt* *MntH* gene as targets to identify *Mycobacterium leprae* by PCR in leprosy. *An Bras Dermatol*. 2011;86(4):651-6.
5. Hartskeerl RA, de Wit MY, Klatser PR. Polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae*. *J Gen Microbiol*. 1989;135(9):2357-64.
6. Banerjee S, Sarkar K, Gupta S, Mahapatra PS, Guha S, Bandhopadhyay D, et al. Multiplex PCR technique could be an alternative approach for early detection of leprosy among close contacts--a pilot study from India. *BMC Infect Dis*. 2010;10:252.
7. WHO Expert Committee on Leprosy (1997 : Geneva, Switzerland) & World Health Organization. (1998). WHO Expert Committee on Leprosy : seventh report. Geneva : World Health Organization. <http://www.who.int/iris/handle/10665/42060>
8. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1966;34(3):255-73.
9. Kang TJ, Kim SK, Lee SB, Chae GT, Kim JP. Comparison of two different PCR amplification products (the 18-kDa protein gene vs. RLEP repetitive sequence) in the diagnosis of *Mycobacterium leprae*. *Clin Exp Dermatol*. 2003;28(4):420-4.
10. Siwakoti S, Rai K, Bhattarai NR, Agarwal S, Khanal B. Evaluation of Polymerase Chain Reaction (PCR) with Slit Skin Smear Examination (SSS) to Confirm Clinical Diagnosis of Leprosy in Eastern Nepal. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(12):e0005220.
11. Buś MM, Allen M. Collecting and preserving biological samples from challenging environments for DNA analysis. *Biopreserv Biobank*. 2014;12(1):17-22.
12. Ross KS, Haites NE, Kelly KF. Repeated freezing and thawing of peripheral blood and DNA in suspension: effects on DNA yield and integrity. *J Med Genet*. 1990;27(9):569-70.

13. Hara M, Nakanishi H, Yoneyama K, Saito K, Takada A. Effects of storage conditions on forensic examinations of blood samples and bloodstains stored for 20 years. *Leg Med (Tokyo)*. 2016;18:81-4.
14. Truman RW, Andrews PK, Robbins NY, Adams LB, Krahenbuhl JL, Gillis TP. Enumeration of *Mycobacterium leprae* using real-time PCR. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008;2(11):e328.
15. Goulart IM, Cardoso AM, Santos MS, Gonçalves MA, Pereira JE, Goulart LR. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin lesions of leprosy patients by PCR may be affected by amplicon size. *Arch Dermatol Res*. 2007;299(5-6):267-71.