

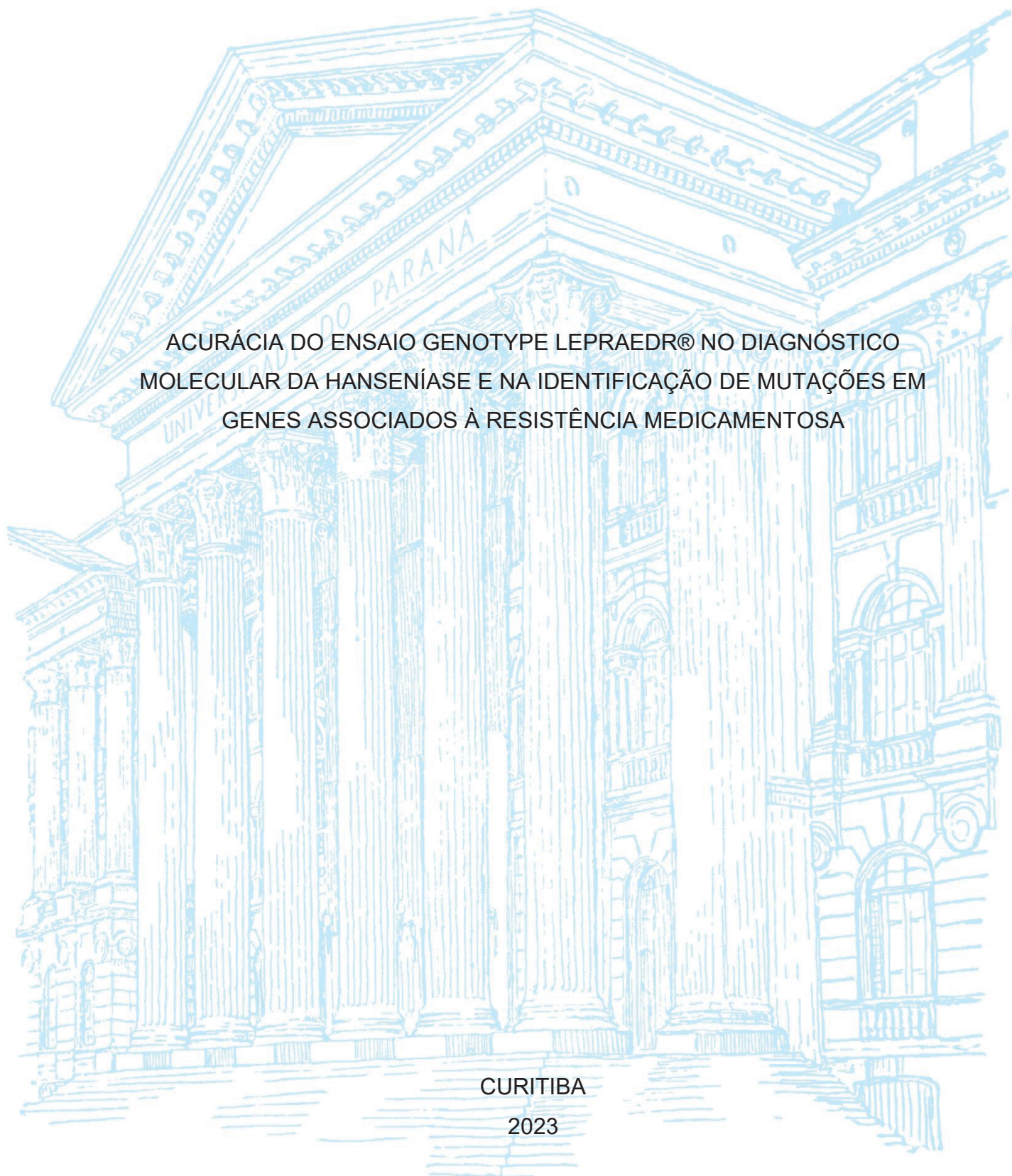
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALINE RAQUELL LECK

ACURÁCIA DO ENSAIO GENOTYPE LEPROADR® NO DIAGNÓSTICO
MOLECULAR DA HANSENÍASE E NA IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES EM
GENES ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA MEDICAMENTOSA

CURITIBA

2023



ALINE RAQUELL LECK

ACURÁCIA DO ENSAIO GENOTYPE LEPROADR® NO DIAGNÓSTICO
MOLECULAR DA HANSENÍASE E NA IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES EM
GENES ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA MEDICAMENTOSA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Danielle Malheiros
Coorientador: Prof. Dr. Ciro Martins Gomes

CURITIBA

2023

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Leck, Aline Raquell

Acurácia do ensaio GenoType LepraeDR® no diagnóstico molecular da hanseníase e na identificação de mutações em genes associados à resistência medicamentosa / Aline Raquell Leck. – Curitiba, 2023.

1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Genética.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Danielle Malheiros.

Coorientador: Prof. Dr. Ciro Martins Gomes

1. Hanseníase. 2. Diagnóstico. 3. Resistência a medicamentos. I. Ferreira, Danielle Malheiros. II. Gomes, Ciro. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Genética. IV. Título.

Bibliotecária: Giana Mara Seniski Silva CRB-9/1406

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação GENÉTICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **ALINE RAQUELL LECK** intitulada: **ACURÁCIA DO ENSAIO GENOTYPE LEPRÆDR® NO DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA HANSENÍASE E NA IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES EM GENES ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA MEDICAMENTOSA**, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 31 de Março de 2023.

Assinatura Eletrônica

06/04/2023 17:21:03.0

DANIELLE MALHEIROS FERREIRA

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

18/04/2023 12:24:57.0

LIANA ALVES DE OLIVEIRA

Avaliador Externo (FACULDADES INTEGRADAS DO BRASIL)

Assinatura Eletrônica

06/04/2023 20:05:59.0

ANGELICA BEATE WINTER BOLDT

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

À minha avó Conceição (*in memoriam*) pela construção de nossa família, por seu exemplo de força e amor. Você sempre estará em meu coração.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo perfeito encaixe deste quebra-cabeça da vida! Àqueles que caminham ao meu lado sabem quantos desdobramentos foram necessários para chegar até aqui... Deus se fez presente em todas as etapas, no processo seletivo, na conciliação do trabalho com as provas e aulas síncronas, neste projeto cheio de propósito e finalmente, na conquista em forma de conclusão deste trabalho.

Aos meus pais, Antônio Tomaz e Maria Rosa, por me ensinarem tanto, pelo amor, paciência, apoio, força e por sempre acreditarem em mim. Vocês são meu primeiro e mais especial exemplo de valores, determinação, vontade e realização.

À UFPR, pelo papel indispensável em minha história! Na biologia, no intercâmbio e agora no mestrado. Sinto-me orgulhosa por fazer parte desta comunidade e muito grata por todas as oportunidades que ela me proporcionou.

À minha orientadora, Prof.^a Dani Malheiros, por ter me recebido de braços abertos, confiado em meu trabalho e comprometimento. Sempre gentil e disposta a escutar, o coração da Dani é enorme! Obrigada pelo carinho, respeito, aprendizados, orientação e por ter entrado comigo nesta!

Ao meu coorientador, Prof.^o Ciro Gomes, pela linda oportunidade de tornar-me parte deste projeto grandioso, pelos ensinamentos e por fazer tanta diferença na vida de seus pacientes.

À Mobius Life Science, meus líderes e colegas, pela oportunidade de atuação em projetos de tanta relevância para saúde pública de nosso país, em especial à Camila Santos pela compreensão e parceria durante essa etapa, à Patricia Estrela por estar sempre disposta a contribuir com este trabalho e à Isadora Stella por divulgar o processo seletivo de mestrado, compartilhar aulas e cadernos de estudo, além de apresentar-me minha orientadora!

À minha avó, irmãos, padrinhos e grandes amigos, que torceram tanto por essa conquista e compreenderam minha ausência.

E ainda mais especial, agradeço ao Lucas França, pelo amor, compreensão, paciência e por estar ao meu lado nestes dois anos de muito estudo, dedicação, e abdicção de lazer. Os finais de semana não seriam os mesmos sem sua presença, incentivo, amizade, risadas e claro, as comidinhas maravilhosas que me permitiram ficar acordada por tantas horas para conclusão deste trabalho. Com amor, meu muito obrigada!

“De modo suave, você pode sacudir o mundo.”

MAHATMA GANDHI

RESUMO

A hanseníase é uma doença infecciosa debilitante, causada pelo *Mycobacterium leprae*. O Brasil ocupa o segundo lugar mundial em número de novos casos. O diagnóstico de hanseníase em sua maior parte é feito com base nos sinais e sintomas clínicos. Entretanto, aproximadamente 30% dos pacientes não apresentam sintomas cardinais. Mesmo quando baciloscopia e histologia são solicitadas como exames confirmatórios, estes podem ser negativos para uma parte dos pacientes que apresentam poucas lesões. Sem diagnóstico preciso, aumenta a probabilidade de transmissão da doença e de aparecimento de incapacidades relacionadas à doença. Dentro deste contexto, os métodos moleculares para o diagnóstico da hanseníase são considerados estratégias promissoras na área. Entretanto, poucos foram implementados formalmente no sistema público de saúde de países endêmicos. Nosso objetivo foi avaliar a acurácia de um teste comercial baseado em hibridização reversa, o GenoType LepraeDR®, que se propõe a identificar por meio da detecção de material genético o *M. leprae* e suas mutações de resistência medicamentosa. Para tanto, os resultados foram comparados com as metodologias de qPCR de genes alvo *RLEP*, *folP1*, *rpoB* e *gyrA* e nested qPCR dos genes *folP1*, *rpoB* e *gyrA* para diagnóstico e com sequenciamento de Sanger para identificações de mutações de resistência medicamentosa. Em seguida, simulamos o uso de um protocolo em série composto por uma triagem inicial usando o GenoType LepraeDR®, seguido pelo nested qPCR do gene *rpoB*. Foram incluídos 80 indivíduos no presente estudo e 53 tiveram o diagnóstico de hanseníase, enquanto os 27 restantes foram classificados como controles. O teste GenoType LepraeDR® (sensibilidade: 0,45, especificidade: 1) teve desempenho semelhante à qPCR do gene *rpoB* (sensibilidade: 0,49, especificidade: 1). Além disso, o ensaio foi mais específico e menos sensível que o *RLEP* (sensibilidade: 0,89, especificidade: 0,85), *folP1* (sensibilidade: 0,62, especificidade: 0,41), nested *rpoB* (sensibilidade: 0,64, especificidade: 0,93), *gyrA* (sensibilidade: 0,64, especificidade: 0,96) e nested *gyrA* (sensibilidade: 0,64, especificidade: 0,96). O protocolo em série GenoType LepraeDR® seguido do nested qPCR do gene *rpoB* resultou em melhor acurácia (0,76). Provavelmente devido ao número amostral pequeno, não foram encontradas as principais mutações que causam resistência, porém os dados obtidos a partir do sequenciamento de Sanger e o ensaio comercial foram concordantes. O teste GenoType LepraeDR® apresenta algumas vantagens, incluindo especificidade de 100% e capacidade de detecção simultânea de resistência antimicrobiana. Um protocolo em série usando o GenoType LepraeDR® seguido de nested qPCR para o gene *rpoB* mostrou-se uma estratégia prática e de possível execução.

Palavras-chave: hanseníase; diagnóstico; qPCR; resistência medicamentosa; GenoType LepraeDR®.

ABSTRACT

Leprosy is a debilitating infectious disease caused by *Mycobacterium leprae*. Brazil ranks second in the world in number of new cases. The diagnosis of leprosy is mostly based on clinical signs and symptoms. However, approximately 30% of patients do not have cardinal symptoms. Even when bacilloscopy and histology are requested as confirmatory tests, these may be negative for some patients who have few lesions. Without a precise diagnosis, the probability of disease transmission and the onset of disease-related disabilities increases. Within this context, molecular methods for diagnosing leprosy are considered promising strategies in the area. However, few of these have been formally implemented in the public health system of endemic countries. Our objective was to evaluate the accuracy of a commercially available test based on reverse hybridization, the GenoType LepraeDR®, which proposes to identify, through the detection of genetic material, *M. leprae* and its drug resistance mutations. Therefore, the results were compared with the methodologies of qPCR using target genes *RLEP*, *folP1*, *rpoB* and *gyrA* and nested qPCR for genes *folP1*, *rpoB* and *gyrA* for diagnosis and were compared with Sanger sequencing for identification of drug resistance mutations. Then, we simulated the use of a serial protocol composed of an initial screening using the GenoType LepraeDR® followed by the nested qPCR for *rpoB* gene. We included 80 individuals in the present study and 53 had a positive diagnosis for leprosy, while the remaining 27 were classified as controls. The GenoType LepraeDR® test (sensitivity: 0.45, specificity: 1) performed similarly to *rpoB* qPCR (sensitivity: 0.49, specificity: 1). The commercially available assay was more specific and less sensitive than *RLEP* (sensitivity: 0.89, specificity: 0.85), *folP1* (sensitivity: 0.62, specificity: 0.41), nested *rpoB* (sensitivity: 0.64, specificity: 0.93), *gyrA* (sensitivity: 0.64, specificity: 0.96) and nested *gyrA* tests (sensitivity: 0.64, specificity: 0.96). The serial protocol of GenoType LepraeDR® followed by the nested qPCR *rpoB* resulted in better accuracy (0.76). Probably due to the small sample size, the main mutations that cause resistance were not found, but the data obtained from Sanger sequencing and the commercially available assay agreed. The GenoType LepraeDR® test has some advantages, including 100% specificity and ability to simultaneously detect antimicrobial resistance. A serial protocol using the GenoType LepraeDR® followed by nested qPCR for the *rpoB* gene proved to be a practical and possible implementation strategy.

Keywords: leprosy; diagnosis; qPCR; drug resistance; GenoType LepraeDR®.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – NÚMERO DE NOVOS CASOS DE HANSENÍASE EM 2019	25
FIGURA 2 – TAXA DE DETECÇÃO GERAL DE CASOS NOVOS DE HANSENÍASE POR 100.000 HABITANTES SEGUNDO REGIÃO DE RESIDÊNCIA. BRASIL, 2011 A 2020.....	26
FIGURA 3 – PROPORÇÃO DE CASOS NOVOS DE HANSENÍASE AVALIADOS QUANTO AO GRAU DE INCAPACIDADE FÍSICA (GRAU 0, 1 E 2) NO MOMENTO DO DIAGNÓSTICO	27
FIGURA 4 – ANTIGO REGIME DA PQT DIRECIONADOS PARA CRIANÇAS E ADULTOS PAUCIBACILARES E MULTIBACILARES.....	29
FIGURA 5 – ESTRUTURA QUÍMICA DAS DROGAS ANTI-HANSENÍASE.....	31
FIGURA 6 – MUTAÇÕES DE RESISTÊNCIA A MEDICAMENTOS NOS <i>LOCi</i> DOS GENES ALVOS NO GENOMA DE <i>M. LEPRAE</i>	36
FIGURA 7 – PREGUEAMENTO DO SÍTIO DE COLETA (ISQUEMIA) E INCISÃO PARA COLETA DO MATERIAL.....	39
FIGURA 8 – ETAPAS DO ENSAIO MOLECULAR GENOTYPE LEPRAEDR®.....	43
FIGURA 9 – ENSAIO MOLECULAR GENÉTICO PARA A DETECÇÃO DE <i>M. LEPRAE</i> E SUA RESISTÊNCIA À RIFAMPICINA, OFLOXACINA E DAPSONA.....	44
FIGURA 10 – REGIÃO DE RESISTÊNCIA À RIFAMPICINA DO GENE <i>RPOB</i>	45
FIGURA 11 – EXEMPLOS COMPARATIVOS DE CURVAS ROC.....	48
FIGURA 12 – DIAGNÓSTICO REFERÊNCIA (CLÍNICO E LABORATORIAL) E A VERIFICAÇÃO DA ACURÁCIA DO TESTE GENOTYPE LEPRAEDR® NO DIAGNÓSTICO MOLECULAR E NA IDENTIFICAÇÃO DE RESISTÊNCIAS.....	54
FIGURA 13 – CICLAGEM PARA AMPLIFICAÇÃO DOS ALVOS DO GENOTYPE LEPRAEDR®.....	59
FIGURA 14 – TWINCUBATOR – HIBRIDIZAÇÃO DAS FITAS.	59
FIGURA 15 – GUIA ILUSTRADO DE HIBRIDIZAÇÃO – GT45.....	60
FIGURA 16 – FICHA MODELO PARA INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS	61
FIGURA 17 – GRÁFICOS ROC MOSTRANDO O DESEMPENHO DE CADA TESTE ÍNDICE	69

FIGURA 18 – SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE E FOREST PLOT PARA OS ENSAIOS DIAGNÓSTICOS DA HANSENÍASE E DETECÇÃO DOS CASOS MULTIBACILARES	72
FIGURA 19 – CURVA ROC MOSTRANDO O DESEMPENHO DAS DUAS ESTRATÉGIAS DE MELHOR ACURÁCIA.	75
FIGURA 20 – FITAS GENOTYPE LEPRÆDR® - DEMONSTRAÇÃO DAS TRÊS CONDIÇÕES DESCRITAS PARA AS AMOSTRAS AVALIADAS EM SEQUENCIAMENTO DO ALVO <i>GYRA</i>	76
FIGURA 21 – FITA GENOTYPE LEPRÆDR® CORRESPONDENTE A AMOSTRA COM MUTAÇÃO SILENCIOSA DE ACORDO COM O SEQUENCIAMENTO DO ALVO <i>RPOB</i>	77
FIGURA 22 – FITAS GENOTYPE LEPRÆDR® - DEMONSTRAÇÃO DAS DUAS CONDIÇÕES DESCRITAS PARA AS AMOSTRAS AVALIADAS EM SEQUENCIAMENTO DO ALVO <i>FOLP1</i>	78

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – CLASSIFICAÇÃO MADRID - 1953.....	22
QUADRO 2 – CRITÉRIOS PARA AVALIAÇÃO DO GRAU DE INCAPACIDADE FÍSICA (GIF).....	23
QUADRO 3 – SÍNTESE DAS REAÇÕES HANSÊNICAS (TIPOS 1 E 2) EM RELAÇÃO A CLASSIFICAÇÃO OPERACIONAL DA HANSENÍASE: CASOS PAUCILARES E MULTIBACILARES	24
QUADRO 4 – ESQUEMA FARMACOLÓGICO 01 E 02 PARA RESISTÊNCIA A RIFAMPICINA.....	32
QUADRO 5 – PRINCIPAIS MUTAÇÕES EM GENES ALVO DE DROGAS ANTI-HANSENÍASE QUE CONFEREM RESISTÊNCIA AO <i>M. LEPRAE</i> ...35	
QUADRO 6 – PERFORMANCE TESTE DIAGNÓSTICO – TABELA DE CONTINGÊNCIA.....	47

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – MUTAÇÕES NO GENE <i>RPOB</i> E AS BANDAS CORRESPONDENTES TIPO SELVAGEM E DE MUTAÇÃO (NUMERAÇÃO DE ACORDO COM O GENOMA DO <i>M. LEPRAE</i>)	45
TABELA 2 – MUTAÇÕES NO GENE <i>GYRA</i> E AS BANDAS CORRESPONDENTES TIPO SELVAGEM E DE MUTAÇÃO (NUMERAÇÃO DE ACORDO COM O GENOMA DO <i>M. LEPRAE</i>)	45
TABELA 3 – MUTAÇÕES NO GENE <i>FOLP1</i> E AS BANDAS CORRESPONDENTES TIPO SELVAGEM E DE MUTAÇÃO (NUMERAÇÃO DE ACORDO COM O GENOMA DO <i>M. LEPRAE</i>)	46
TABELA 4 – PARES DE PRIMERS USADOS PARA AS REAÇÕES DE qPCR.....	57
TABELA 5 – PROTOCOLO DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DOS PRODUTOS DE PCR PURIFICADOS.....	62
TABELA 6 – CONDIÇÕES DE CICLAGEM DAS REAÇÕES DE SEQUENCIAMENTO DOS PRODUTOS DE PCR PURIFICADOS.....	63
TABELA 7 – CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E CLÍNICAS DOS PARTICIPANTES INCLUÍDOS NO ESTUDO.....	66
TABELA 8 – SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE, ACURÁCIA E SEUS RESPECTIVOS INTERVALOS DE CONFIANÇA (95% IC) PARA CADA TESTE INCLUÍDO NO ESTUDO PARA O DIAGNÓSTICO DE HANSENÍASE	68
TABELA 9 – SENSIBILIDADE DE CADA TESTE DE ÍNDICE NA IDENTIFICAÇÃO DE PARTICIPANTES COM ESFREGAÇOS CUTÂNEOS POSITIVOS E NEGATIVOS.....	74
TABELA 10 - AMOSTRAS SEQUENCIADAS PARA O GENE <i>GYRA</i> E SEUS ACHADOS FRENTE A ANÁLISE NO TESTE MOLECULAR GENOTYPE LEPRAE DR®.....	76
TABELA 11 - AMOSTRAS SEQUENCIADAS PARA O GENE <i>RPOB</i> E SEUS ACHADOS FRENTE A ANÁLISE NO TESTE MOLECULAR GENOTYPE LEPRAE DR®.....	77

TABELA 12 - AMOSTRAS SEQUENCIADAS PARA O GENE <i>FOLP1</i> E SEUS ACHADOS FRENTE A ANÁLISE NO TESTE MOLECULAR GENOTYPE LEPRAEDR®.....	78
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

Ala – Alanina

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BLAST – do inglês *Basic Local Alignment Search Tool*

C3 - Componente 3 do sistema complemento

CAAE - Certificado de Apresentação de Apreciação Ética

CC – Controle Conjugado

Células T – Linfócitos T

CONITEC - Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sistema Único de Saúde

Cq – do inglês *Cycle Quantification*

CR1 - Receptor complementar 1

CR3 - Receptor complementar 3

CR4 - Receptor complementar 4

CT – do inglês *Cycle Threshold*

CU – Controle Universal

DdNTPs - Dideoxynucleotídeos

DHPS1 - Dihidropteroato sintase

DNTPs - Deoxynucleotídeos

DRDR - Região determinante de resistência a drogas

ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

folP1 - Dihydropteroate synthase

GIF - Grau de Incapacidade Física

gyrA - DNA gyrase subunit A

HLA - Antígenos Leucocitários Humanos

IB - Índice baciloscópico

IL – Interleucina

LACEN-DF - Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal

MB - Multibacilar

M. leprae - Mycobacterium leprae

M. lepromatosis - Mycobacterium lepromatosis

NCBI - do inglês *National Center for Biotechnology Information*

OMS - Organização Mundial da Saúde

PABA - Ácido para-aminobenzóico

PB - Paucibacilar

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PGL-1 - Glicolípido fenólico-1

PQT – Poliquimioterapia

PQT-U – Poliquimioterapia única

Pro - Prolina

qPCR – PCR quantitativa em tempo real

RLEP – *M. leprae*-specific repetitive element

rpoB - β subunit of bacterial RNA polymerase

Ser - Serina

SIRH - Sistema de Informação de Investigação da Resistência Antimicrobiana na Hanseníase

SROCs – do inglês *Receiver Operating Characteristic Curves*

SUS - Sistema Único de Saúde

TCLE - Termo de consentimento livre e esclarecido

TGF- β - Fator de Crescimento Transformador Beta

Th1 - T Helper 1

Th2 - T Helper 2

UnB – Universidade de Brasília

X² – Qui-quadrado

LISTA DE SÍMBOLOS

® - marca registrada

β – Beta

U/μl – Unidade/microlitros

+ - Cruzes

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1	HANSENÍASE	21
2.2	EPIDEMIOLOGIA	25
2.3	TRATAMENTO	28
2.4	RESISTÊNCIA MEDICAMENTOSA	30
2.5	DIAGNÓSTICO DA HANSENÍASE.....	36
2.5.1	Teste Molecular GenoType LepraeDR® - Hain	41
2.6	ACURÁCIA DIAGNÓSTICA.....	46
3	JUSTIFICATIVA	50
4	OBJETIVOS	50
4.1	Objetivo geral	50
4.2	Objetivos específicos.....	50
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	51
5.1	ASPECTOS ÉTICOS.....	51
5.2	POPULAÇÃO ESTUDADA	51
5.3	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO, DEFINIÇÃO DE CASOS E CONTROLES – DIAGNÓSTICO CLÍNICO (EXAME REFERÊNCIA).....	51
5.4	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	53
5.5	TAMANHO AMOSTRAL	53
5.6	TIPO DE ESTUDO	53
5.7	ENSAIOS LABORATÓRIAS (EXAMES REFERÊNCIA).....	54
5.7.1	Baciloscopia	54
5.7.2	Biópsia.....	55
5.8	ENSAIOS MOLECULARES.....	55
5.8.1	Extração de DNA.....	55
5.8.2	PCR quantitativa em tempo real (qPCR).....	56
5.8.3	Teste Molecular GenoType LepraeDR® – Amplificação e Hibridização reversa.....	58
5.8.4	Sequenciamento de Sanger	62
5.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	63
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	65

6.1	ANÁLISE DEMOGRÁFICA.....	65
6.2	DIAGNÓSTICO DA HANSENÍASE.....	66
6.3	MONITORAMENTO DE RESISTÊNCIAS MEDICAMENTOSAS	75
7	CONCLUSÕES	80
	REFERÊNCIAS.....	81
	ANEXO 1 – TÍTULO DO ANEXO	90

1 INTRODUÇÃO

Considerado problema de saúde pública em países em desenvolvimento, a hanseníase é uma doença infecciosa debilitante, que leva a danos na pele e nos nervos, muitas vezes resultando em deficiências para a vida toda. A transmissão contínua do *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) é responsável por aproximadamente 200.000 novos casos a cada ano, conferindo caráter atual e desafiador ao tratamento dessa doença (VAN HOOIJ *et al.*, 2018). A Organização Mundial da Saúde (OMS) desenvolveu estratégias visando erradicação da transmissão e de casos de crianças que atinjam grau de incapacidade física (GIF) 2 originada pela doença. Entretanto, devido não só à falta de profissionais com experiência no diagnóstico, mas também às questões inerentes à doença, o Brasil ainda ocupa o segundo lugar mundial em número de novos casos de hanseníase (WHO, 2021).

O diagnóstico de hanseníase em sua maior parte é feito com base nos sinais e sintomas clínicos, sendo este o padrão ouro investigativo. A avaliação clínica testa as lesões pelo toque, sensação de calor e frio ou pela diminuição da sudorese por meio de um teste de iodeto ou de histamina na área afetada e o compara com o mesmo teste na pele ao redor. Todos esses testes avaliam danos aos nervos dérmicos (STEINMANN *et al.*, 2020). Esta avaliação requer médicos bem treinados, pois algumas formas paucibacilares (PB) e neurais, nas quais os pacientes apresentam poucas lesões, podem ser facilmente confundidas com outras dermatoses comuns e, ainda, cerca de 30% dos pacientes, muitos deles multibacilares (MB), não apresentam sintomas cardinais, como a perda de sensibilidade (LETURIONDO *et al.*, 2019). Quando há dúvidas, solicita-se baciloscopia e histologia. Entretanto, a baciloscopia costuma também ser negativa para os paucibacilares. Sem diagnóstico preciso, aumenta a probabilidade de transmissão posterior e de incapacidade relacionada à doença (STEINMANN *et al.*, 2020).

Dentro deste contexto, os testes moleculares podem ser auxiliares valorosos, sendo que o desenvolvimento, padronização e implantação de testes de diagnóstico precisos para a detecção precoce da hanseníase em infecções subclínicas, mostram-se essenciais para a rápida interrupção da cadeia de transmissão da doença e para prevenir o desenvolvimento de sequelas da

hanseníase por meio do tratamento imediato (STEINMANN *et al.*, 2020; TATIPALLY; SRIKANTAM; KASETTY, 2018).

A implementação de testes moleculares capazes de detectar o *M. leprae*, bem como suas resistências medicamentosas, é de interesse dos principais órgãos envolvidos com o controle desta doença no Brasil. Sendo assim, o presente trabalho avaliou a acurácia diagnóstica do teste molecular comercial GenoType LepraeDR® - HAIN, registro Anvisa nº 80502070067, em amostras de biópsia de pacientes de população brasileira, já que este mostra-se uma ferramenta potencial no diagnóstico e já é usado em outros países.

O teste GenoType LepraeDR® é baseado em reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional e hibridização reversa de DNA e teve sua acurácia comparada com PCR quantitativa em tempo real (qPCR). Além disso, o teste teve seu potencial de rastreio comparado ao sequenciamento, método utilizado hoje pelo ministério da saúde como padrão ouro para o monitoramento de resistências medicamentosas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HANSENÍASE

Considerada como uma das doenças mais antigas da humanidade, a hanseníase é uma doença infecciosa crônica, com alta infectividade e baixa patogenicidade, causada pelo *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) ou *Mycobacterium lepromatosis* (*M. lepromatosis*), um bacilo gram-positivo, álcool-ácido-resistente, intracelular obrigatório, não cultivável *in vitro*, de crescimento lento, com tropismo por macrófagos da pele e células de Schwann. O bacilo é diferenciado de outras bactérias gram-positivas e gram-negativas por sua parede celular rica em lipídios, principalmente ácidos micólicos e glicolípido fenólico-1 (PGL-1). O PGL-1 permite a penetração do bacilo nos macrófagos via fração C3 do sistema complemento por meio dos receptores CR1, CR3 e CR4, induzindo sua fagocitose. Este glicolípido é um componente chave para a patogênese da doença e está envolvido no mecanismo de escape lisossomal, desempenhando um papel imunossupressor que facilita a sobrevivência do *M. leprae* dentro da célula hospedeira, o macrófago (BRASIL, 2021; FROES; TRINDADE; SOTTO, 2022).

Dos indivíduos expostos ao *M. leprae*, 95% não desenvolverão a doença, sugerindo que a imunidade do hospedeiro desempenha um papel importante na sua progressão e controle (WHO, 2018). Neste cenário, verifica-se que a variabilidade interindividual nas manifestações clínicas depende de fatores genéticos, imunológicos e ambientais que definem a capacidade do hospedeiro de estabelecer imunidade efetiva ao *M. leprae*. Foi identificada associação da doença com alelos dos genes HLA (Antígenos Leucocitários Humanos), células reguladoras humanas e o conceito Th1/Th2 para células T humanas, no qual o perfil de citocina encontrado na pele difere em cada extremo da doença, com maior expressão de citocinas Th1 (como IL-7 e IL-15) em pessoas com hanseníase tuberculóide e maior expressão de citocinas Th2 (como IL-4, IL-5, IL-10 TGF- β) em indivíduos com hanseníase lepromatosa (CORSTJENS *et al.*, 2016; FROES; TRINDADE; SOTTO, 2022). Ainda assim, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares e os efeitos das variantes genéticas do hospedeiro nas respostas imunes da hanseníase e sua patogênese (MI *et al.*, 2020).

O período de incubação do *M. leprae* varia de 2 a 20 anos ou mais e seu mecanismo exato de transmissão é pouco conhecido, porém, a via respiratória é a mais aceita e é necessário convívio próximo e prolongado com indivíduos portadores da forma multibacilar da doença. Este patógeno afeta a pele, o sistema nervoso periférico e alguns outros tecidos, como o sistema retículo-endotelial, olhos, ossos, músculos, articulações, membranas mucosas, testículos e suprarrenais (SARTORI *et al.*, 2020; WHO, 2018; TALHARI; TALHARI; PENNA, 2015).

As primeiras classificações da hanseníase foram baseadas apenas em parâmetros clínicos e, em 1953, durante o VI Congresso Internacional de Lepra, Madrid, foi proposta a classificação baseada em quatro grupos principais de doenças: hanseníase indeterminada (PB), tuberculóide (PB), dimorfa (MB) e virchowiana (MB) (RIDLEY *et al.*, 1962, OLIVEIRA, 2012) (Quadro 1).

QUADRO 1 – Classificação Madrid - 1953

Classificação	Características
Indeterminada (Paucibacilar)	A lesão de pele geralmente é única, mais clara do que a pele ao redor, não é elevada, apresenta bordas mal delimitadas, e é seca.
Tuberculóide (Paucibacilar)	Forma da doença em que o sistema imune consegue destruir os bacilos. Manifesta-se por uma placa totalmente anestésica ou por placa com bordas elevadas, bem delimitadas e centro claro. Necessário correlacionar os resultados com a clínica do paciente.
Dimorfa (Multibacilar)	Várias manchas de pele avermelhadas ou esbranquiçadas, com bordas elevadas, mal delimitadas na periferia, ou por múltiplas lesões bem delimitadas. Há perda parcial a total da sensibilidade e o diagnóstico pode ser confirmado facilmente pela baciloscopia dos lóbulos das orelhas e cotovelos.
Virchowiana (Multibacilar)	É a forma mais contagiosa da doença. É comum aparecerem caroços escuros, endurecidos e assintomáticos. Pele apresenta-se avermelhada, seca e infiltrada.

FONTE: BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE (2017).

Em 1966, Ridley & Jopling propuseram uma classificação baseando-se no espectro imunológico da doença, suas características clínicas e histopatológicas. Nos polos deste espectro estão as formas tuberculóide e lepromatosa (virchowiana), e no centro encontram-se três formas intermediárias: borderline-tuberculóide, borderline-borderline e borderline-virchowiana. À medida que a apresentação clínica progride do polo tuberculóide para o lepromatoso, ocorre uma transição gradual da resposta imune Th1 para Th2 (PAVANI; TONOLLI; DAVILA, 2008; FROES; TRINDADE; SOTTO, 2022). Devido às dificuldades operacionais para seu uso e

visto a necessidade de apoio da anatomia patológica, passou a ser considerada como uma classificação destinada a centros especializados e para trabalhos de pesquisa (FLEURY, 2005).

Em 1982, a OMS estabeleceu uma classificação operacional e simplificada para acesso à assistência médica de campo, em regiões onde os recursos médicos são insuficientes e cujo critério básico são aspectos clínicos e laboratoriais (índice baciloscópico (IB) - densidade dos bacilos da hanseníase no exame de pele):

a. Paucibacilar: presença de 1 a 5 lesões cutâneas, ausência demonstrada de bacilos em baciloscopia.

b. Multibacilar: presença de mais de cinco lesões de pele, ou com envolvimento dos nervos ou com a presença demonstrada de bacilos em esfregaço de pele, independentemente do número de lesões cutâneas (BRITO, 2004; WHO, 2018; CHEN *et al.*, 2022).

A doença pode evoluir como uma infecção localizada ou sistêmica, levando a danos nos nervos periféricos (neuropatias) que podem causar diferentes graus de comprometimento e incapacidade, sendo também associada ao estigma quando há deformidades (RIDLEY *et al.*, 1962). O Grau de Incapacidade Física (GIF) é uma medida que indica a existência de perda da sensibilidade protetora e/ou deformidade visível em consequência de lesão neural e/ou cegueira. É um indicador epidemiológico que pode ser utilizado na avaliação do programa de vigilância de hanseníase, determinando a precocidade do diagnóstico e o sucesso das atividades que visam a interrupção da cadeia de transmissão (QUADRO 2) (BRASIL, 2017).

QUADRO 2 – CRITÉRIOS PARA AVALIAÇÃO DO GRAU DE INCAPACIDADE FÍSICA (GIF)

Grau	Características
0	Olhos: Força muscular das pálpebras e sensibilidade da córnea preservadas. Mãos e Pés: Força muscular das mãos preservada e sensibilidade palmar: sente o monofilamento 2 g (lilás) ou o toque da ponta de caneta esferográfica.
1	Olhos: Diminuição da força muscular das pálpebras sem deficiências visíveis e/ou diminuição ou perda da sensibilidade da córnea. Mãos e Pés: Diminuição da força muscular das mãos e pés sem deficiências visíveis e/ou alteração da sensibilidade palmar e plantar: não sente o monofilamento 2 g (lilás) ou o toque da ponta de caneta esferográfica.
2	Olhos: Deficiência(s) visível(eis) causadas pela hanseníase. Mãos e Pés: Deficiência(s) visível(eis) causadas pela hanseníase, como: garras, reabsorção óssea, atrofia muscular, mão e/ou pés caídos, contratura, feridas.

FONTE: BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE (2017).

A evolução crônica da doença pode ser sobreposta por fenômenos inflamatórios agudos, as reações hansênicas. As reações hansênicas são fenômenos de aumento da atividade da doença, com piora clínica que podem ocorrer antes, durante ou após o final do tratamento com a poliquimioterapia. Os episódios reacionais podem incidir em qualquer uma das formas clínicas, sendo rara sua detecção na hanseníase indeterminada. Há dois tipos de reações, a denominada de reação tipo 1 que ocorre em pacientes com predomínio da preservação da imunidade celular específica contra o *M. leprae*, e a reação tipo 2 ou Eritema Nodoso Hansênico que ocorre em pacientes multibacilares com imunidade pouco preservada ou ausente (BRASIL, 2017; FOSS, 2003) (QUADRO 3). É de imprescindível importância o rápido diagnóstico e manejo das reações, pois constituem a maior causa de lesão no nervo periférico e aumento das incapacidades (BRASIL, 2017).

QUADRO 3 – SÍNTESE DAS REAÇÕES HANSÊNICAS (TIPOS 1 E 2) EM RELAÇÃO A CLASSIFICAÇÃO OPERACIONAL DA HANSENÍASE: CASOS PAUCILARES E MULTIBACILARES

Episódios reacionais	Reação Reversa (Reação Tipo 1)	Eritema nodoso Hansênico (Reação Tipo 2)
Formas clínicas	Paucibacilar	Multibacilar
Início	Antes do tratamento com PQT ou nos primeiros 6 meses do tratamento. Pode ser a primeira manifestação da doença.	Pode ocorrer durante ou após o tratamento com PQT. Pode ser a primeira manifestação da doença.
Causa	Processo de hiper-reatividade imunológica celular, em resposta ao antígeno (bacilo ou fragmento bacilar)	Processo de hiper-reatividade imunológica humoral, em resposta ao antígeno (bacilo ou fragmento bacilar)
Manifestações clínicas	Aparecimento de novas lesões que podem ser eritemato-infiltradas. Reagudização de lesões antigas. Dor espontânea nos nervos periféricos. Aumento ou aparecimento de áreas hipo ou anestésicas.	As lesões preexistentes permanecem inalteradas. Há aparecimento brusco de nódulos eritematosos, dolorosos à palpação ou até mesmo espontaneamente, que podem evoluir para vesículas, pústulas, bolhas ou ulcerações.
Comprometimento sistêmico	Não é frequente.	É frequente: apresenta febre, astenia, mialgias, náuseas e dor articular.
Fatores associados	Edema de mãos e pés, aparecimento brusco de mão em garra e “pé caído”.	Edema de extremidades: irite, epistaxes, orquite, linfadenite, neurite. Comprometimento gradual dos troncos nervosos.
Evolução	Lenta, podem ocorrer sequelas neurológicas e complicações, como abscesso de nervo	Rápida, o aspecto necrótico pode ser contínuo, durar meses e apresentar complicações graves.

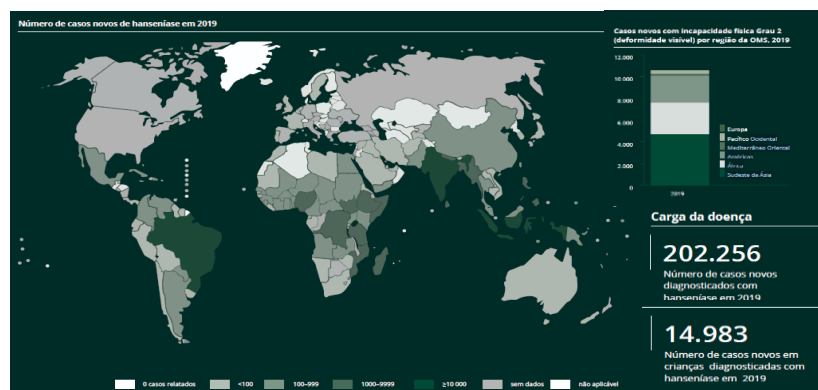
FONTE: ADAPTADO BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE (2019).

LEGENDA: PQT – poliquimioterapia: esquema terapêutico utilizado para o tratamento de hanseníase.

2.2 EPIDEMIOLOGIA

Na 44ª Assembleia Mundial da Saúde de 1991, a estratégia adotada pelos países membros da OMS estabeleceu a “eliminação da hanseníase até o ano 2000 como um problema de saúde pública”, visando atingir o coeficiente de prevalência igual ou inferior a um caso em cada 10 mil habitantes (WHO, 1991). Em 1982, preconizou-se o uso de dois regimes diferentes de poliquimioterapia (PQT) para o tratamento da hanseníase, os quais são distribuídos gratuitamente em países endêmicos desde 1995 e consistem em rifampicina, dapsona e clofazimina administradas em uma dose mensal por seis doses para pacientes paucibacilares e uma dose mensal por 12 meses para pacientes multibacilares (TALHARI; TALHARI; PENNA, 2015; SARTORI *et al.*, 2020). Após a introdução da PQT, as taxas globais de novos casos de hanseníase diminuíram, no entanto, apesar da ampla aplicação dessa terapia, são registrados aproximadamente 200.000 novos casos anualmente desde 2005 e a doença permanece endêmica em 13 países de baixa e média renda, estando associada à pobreza e ao acesso precário à moradia, alimentação, cuidados de saúde e educação (PLOEMACHER *et al.*, 2020; PESCARINI *et al.*, 2018; NERY *et al.*, 2019; BRASIL, 2021). Em 2019, a hanseníase foi reportada em 118 países, estando 79% dos casos na Índia, Brasil e Indonésia. Dos 202.256 novos casos registrados, 14.983 correspondem a crianças (FIGURA 1) (WHO, 2020).

FIGURA 1 – NÚMERO DE NOVOS CASOS DE HANSENÍASE EM 2019.



FONTE: ADAPTADO DE WORLD HEALTH ORGANIZATION (2020).

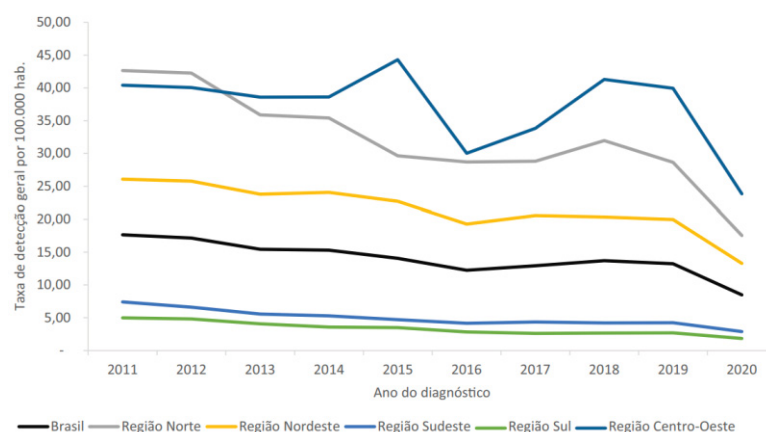
A estratégia global para hanseníase 2021-2030 redefiniu como meta para a eliminação da doença a interrupção da transmissão, o alcance de zero

incapacidade, zero estigma e zero discriminação. Entretanto, as últimas décadas mostram lenta redução mundial do número de casos de hanseníase, o que ressalta quão desafiadora é a eliminação da doença (WHO, 2020). No Brasil, a hanseníase ainda é considerada um importante desafio em saúde pública e faz parte da Lista Nacional de Notificação Compulsória de Doenças, Agravos e Eventos de Saúde Pública (Portaria de Consolidação MS/GM nº 4, de 28 de setembro de 2017) e, portanto, é obrigatório que os profissionais de saúde reportem os casos do agravo no Sinan (BRASIL, 2022).

Entre os anos de 2016 e 2020, foram diagnosticados no Brasil 155.359 casos novos de hanseníase. Desses, 86.225 ocorreram em indivíduos do sexo masculino (55,5%) (BRASIL, 2022).

Entre os anos de 2011 e 2020 a taxa de detecção geral de novos casos apresentou uma redução de 51,9%, passando de 17,65 em 2011 para 8,49 casos por 100.000 habitantes em 2020. O parâmetro de endemicidade do país mudou de alto para médio, sendo 2020 o ano que apresentou maior redução da taxa de detecção geral, o que pode estar relacionado aos efeitos do menor número de diagnósticos causado pela sobrecarga dos serviços de saúde e pelas restrições durante a pandemia da covid-19 (FIGURA 2). O segundo ano da pandemia continuou exigindo estratégias direcionadas ao fortalecimento das ações de controle da hanseníase, principalmente no que tange à vigilância, diagnóstico, acompanhamento e tratamento dos casos (BRASIL, 2022).

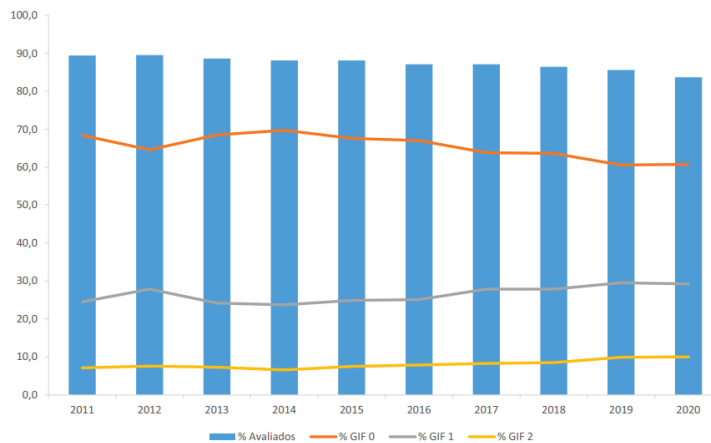
FIGURA 2 – TAXA DE DETECÇÃO GERAL DE CASOS NOVOS DE HANSENÍASE POR 100.000 HABITANTES SEGUNDO REGIÃO DE RESIDÊNCIA. BRASIL, 2011 A 2020



FONTE: BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE (2022).

Embora as terapias multidrogas eficazes e acessíveis tenham o potencial de curar infecções, as falhas na detecção e no tratamento podem levar ao desenvolvimento de deficiências estigmatizantes de grau 2 associadas à hanseníase. De acordo com Pescarini *et al.* (2018), estimativas recentes indicam que 7% dos mais de 200.000 novos casos de hanseníase detectados a cada ano ocorrem em indivíduos que já desenvolveram incapacidades de grau 2 no momento do diagnóstico (FIGURA 3).

FIGURA 3 – PROPORÇÃO DE CASOS NOVOS DE HANSENÍASE AVALIADOS QUANTO AO GRAU DE INCAPACIDADE FÍSICA (GRAU 0, 1 E 2) NO MOMENTO DO DIAGNÓSTICO.



FONTE: BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE (2022).

Em relação a avaliação do controle da doença, o parâmetro prevalência, de grande relevância epidemiológica, não é considerado ideal, pois pode ser afetado por aspectos operacionais do programa. Já a taxa de detecção mostra-se um parâmetro mais fiel por refletir a capacidade de detecção da doença. Neste contexto, torna-se imperativo investir em ações voltadas para o diagnóstico precoce e para o tratamento adequado, com interrupção da cadeia de transmissão e ações planejadas direcionadas às populações em risco (BRASIL, 2021d).

2.3 TRATAMENTO

Antes da era dos antibióticos, o óleo de chaulmoogra era usado para tratar a hanseníase com pouco sucesso (MAYMONE *et al.*, 2020). A partir da década de 1940, a intensificação das técnicas de produção sintética de substâncias químicas e de moléculas permitiu que a dapsona, antibiótico da classe das sulfonas, fosse utilizada pela primeira vez em 1941 como monoterapia no tratamento da hanseníase (MAYMONE *et al.*, 2020; SANTOS; SOUZA; SIANI, 2008; FISCHER, 2017). Apesar de seu sucesso terapêutico, a partir de 1964 foram constatadas resistências do bacilo ao medicamento, resultando em altas taxas de recaída, principalmente devido à monoterapia inadequada (resistência secundária) (CAMBAU; WILLIAMS 2019; DIÓRIO, 2005). Quando a hanseníase resistente era transmitida, resultava em novos casos de resistência à dapsona (resistência primária). Novos medicamentos foram identificados como eficazes contra a hanseníase, porém, também demonstraram resistência adquirida quando usados como monoterapia (CAMBAU; WILLIAMS, 2019).

Os relatos de resistência primária e secundária a dapsona e a rifampicina, introduzida na terapia da hanseníase no início da década de 1970, fizeram com que a OMS preconizasse, em 1981, um novo esquema terapêutico para o tratamento da hanseníase, no qual múltiplos antibióticos eficazes foram combinados para evitar a seleção de cepas resistentes, a PQT (CARVALHO, 2007; DIÓRIO *et al.*, 2005; CAMBAU; WILLIAMS, 2019), o qual foi adotado pelo Brasil em 1986 (ANDRADE, 2006).

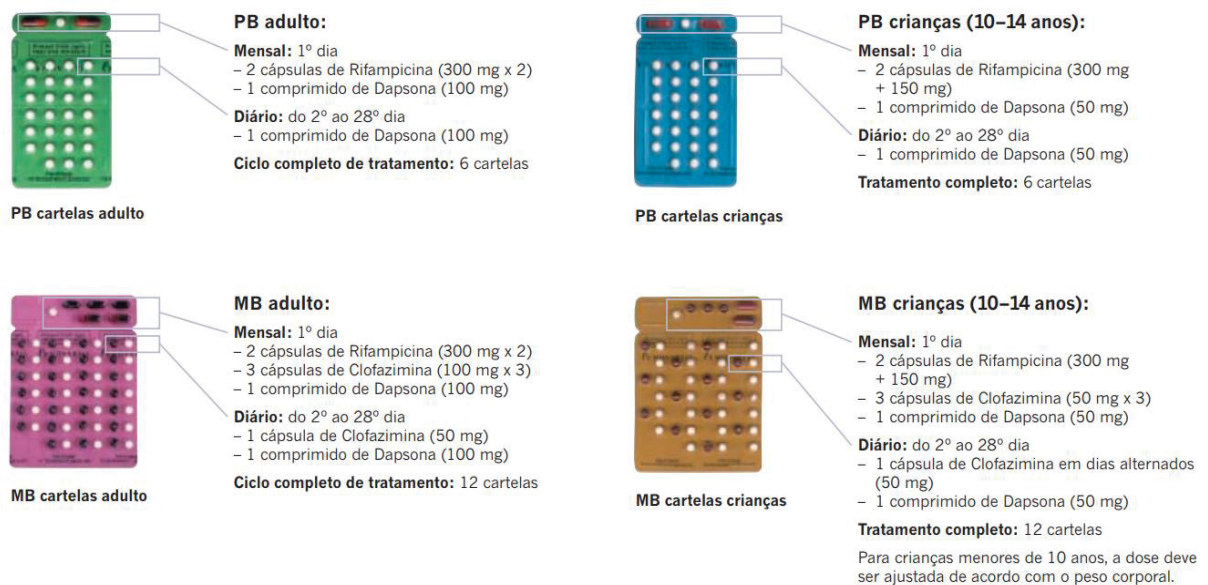
A poliquimioterapia é realizada através da associação dos medicamentos de primeira linha Rifampicina, Dapsona e Clofazimina e o tratamento do paciente deve ser iniciado logo após a definição do diagnóstico, levando à cura em até 98% dos casos (BRASIL, 2017; BRASIL, 2021). A dapsona e a clofazimina são drogas bacteriostáticas, enquanto a rifampicina é bactericida (OPROMOLLA, 1997).

A rifampicina é um potente bactericida e o único incluído no regime de poliquimioterapia. Esta droga é bem absorvida por via oral e deve sempre ser administrada em combinação com outros hansenostáticos, para prevenir que o *M. leprae* desenvolva resistência ao fármaco. O alvo da rifampicina em bactérias é a subunidade β da RNA polimerase dependente de DNA, interrompendo a ligação da subunidade β com o DNA, interferindo assim na síntese de RNA bacteriano. A

dapsona é um antagonista competitivo do ácido para-aminobenzóico (PABA) e impede a utilização bacteriana normal de PABA para a síntese do ácido fólico, de modo que é fracamente bactericida. A clofazimina é um corante de fenazina com atividade antimicrobacteriana e anti-inflamatória. Seu mecanismo de ação contra as micobactérias não está totalmente elucidado, mas acredita-se que exerce efeito antimicrobacteriano ligando-se fortemente ao DNA da bactéria, inibindo a replicação e o crescimento. Exerce efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores *in vitro* e *in vivo* (BRASIL, 2021).

Para fins de tratamento, até 2018, a OMS dividia adultos e crianças em paucibacilares (indeterminados e tuberculóide) e multibacilares (dimorfos e virchowianos) (FIGURA 4) (WHO, 2018).

FIGURA 4 – ANTIGO REGIME DA PQT DIRECIONADOS PARA CRIANÇAS E ADULTOS PAUCIBACILARES E MULTIBACILARES



FONTE: OMS (2000).

Em 2018, a OMS sugeriu o uso da poliquimioterapia única (PQT-U), esquema terapêutico de primeira linha composto por três drogas: rifampicina, dapsona e clofazimina para todos os pacientes com hanseníase, tendo duração de tratamento de 6 meses para paucibacilares e 12 meses para multibacilares. As vantagens potenciais desta abordagem são a simplificação do regime de tratamento, impacto reduzido da classificação incorreta de casos de hanseníase e logística simplificada,

pois seriam necessários apenas dois tipos de blisters de medicamentos, o adulto e o infantil (WHO, 2018). Ainda em 2018, a Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sistema Único de Saúde (CONITEC), recomendou ao Ministério da Saúde a ampliação do uso do medicamento clofazimina para tratamento da hanseníase paucibacilar no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS). A decisão teve aceite e publicação no Diário Oficial da União, por meio da Portaria SCTIE N. 71, de 11 de dezembro de 2018. Em NOTA TÉCNICA Nº 16/2021-CGDE/DCCI/SVS/MS, 2021, foram publicadas orientações a estados e municípios brasileiros para a implementação da “ampliação de uso da clofazimina para o tratamento da hanseníase paucibacilar, no âmbito SUS”, visto que a OMS atingiu capacidade técnica para atender a nova demanda brasileira de poliquimioterapia.

Os principais objetivos do tratamento da hanseníase são a cura da infecção e a prevenção de incapacidades físicas por meio da detecção precoce de casos e do tratamento correto das reações hansênicas e do comprometimento da função neurológica. A Atenção Primária à Saúde possui caráter primordial para obtenção de melhores resultados terapêuticos e consequente impacto positivo na diminuição da carga da doença no Brasil, ofertando o diagnóstico precoce e o tratamento farmacológico imediato, assim como o encaminhamento ágil e adequado ao atendimento especializado, quando necessário (BRASIL, 2021).

O estigma e a discriminação associados ao medo e à falta de conhecimento sobre a doença dificultam o diagnóstico precoce, geram sofrimento e podem afetar os relacionamentos sociais do doente, o bem-estar mental, a condição socioeconômica e a qualidade de vida. Além dos indivíduos acometidos pela hanseníase e suas famílias, o estigma e a discriminação também interferem negativamente sobre a qualidade da assistência dos serviços de saúde e sobre a efetividade dos programas de controle de hanseníase (BRASIL, 2021).

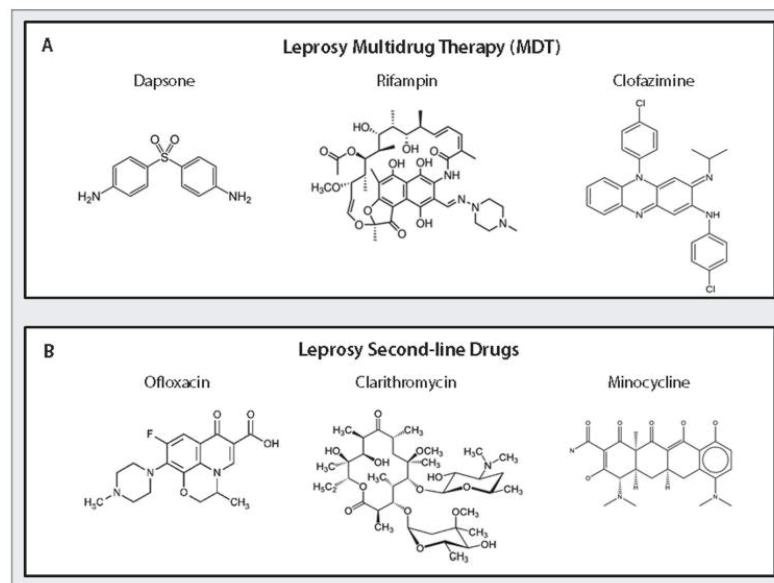
2.4 RESISTÊNCIA MEDICAMENTOSA

A resistência antimicrobiana é importante no manejo da hanseníase, porém a incapacidade de cultivar *in vitro* o *M. leprae* limita os testes eficientes de resistência, sendo preciso realizá-los em laboratórios especializados por meio de técnicas moleculares genotípicas (MAYMONE *et al.*, 2020).

Deve-se suspeitar de resistência quando pacientes que realizaram tratamento adequado apresentam evolução desfavorável e sem sinais de melhora clínica, mesmo após a extensão do tempo de tratamento, resultando em falência terapêutica. Esses casos devem ser encaminhados à referência para avaliação clínica e investigação laboratorial de resistência bacteriana aos medicamentos preconizados (BRASIL, 2019). Pacientes que tiverem confirmação de resistência às drogas de primeira linha (FIGURA 5a) devem iniciar o tratamento farmacológico de segunda linha (FIGURA 5b), conforme relatório de recomendação CONITEC “Proposta de esquema terapêutico para o tratamento da hanseníase” (BRASIL, 2018). A ofloxacina é um dos componentes utilizados no regime de segunda linha. Este fármaco liga-se à subunidade A da DNA girase (*gyrA*) e inibe a replicação do DNA (CAMBAU; WILLIAMS, 2019).

Como demonstração de esquema terapêutico, o quadro 4 aborda o tratamento em caso de resistência a rifampicina.

FIGURA 5 – ESTRUTURA QUÍMICA DAS DROGAS ANTI-HANSENÍASE



FONTE: CAMBAU; WILLIAMS (2019).

QUADRO 4 – ESQUEMA FARMACOLÓGICO 01 E 02 PARA RESISTÊNCIA A RIFAMPICINA

Classificação	Esquema farmacológico 01	Duração
Paucibacilar (PB)	Ofloxacino 400mg + Minociclina 100mg + clofazimina 50mg	Primeiros 6 meses diariamente
	Ofloxacino 400mg ou Minociclina 100mg + Clofazimina 50mg	Próximos 18 meses diariamente
Ou	Esquema farmacológico 02	Duração
Multibacilar (MB)	Ofloxacino 400mg + Claritromicina 500mg + Clofazimina 50mg	Primeiros 6 meses diariamente
	Ofloxacino 400mg + clofazimina 50mg	Próximos 18 meses diariamente

FONTE: BRASIL, Ministério da Saúde (2021).

A vigilância da resistência medicamentosa faz parte das ações estratégicas para a redução da carga da doença no Brasil. Recomenda-se investigação da resistência medicamentosa primária em 10% dos casos novos MB com índice baciloscópico igual ou maior que 2, em pessoas nunca tratadas para hanseníase e antes do início da PQT-U, enquanto vigilância sentinela para a infecção por bacilos resistentes (BRASIL, 2020b). Em 2021, foi desenvolvido e implementado no SUS o Sistema de Informação de Investigação da Resistência Antimicrobiana na Hanseníase (SIRH) e, como estratégia de fortalecimento da rede de resistência, o ensaio GenoType LepraeDR®, destinado à detecção da resistência medicamentosa, está em processo de incorporação pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2022).

Cambau *et al.* (2018), desenvolveu um estudo prospectivo a partir de dados de países endêmicos e descreveu uma taxa de resistência global de 8% entre os anos de 2009 e 2015, sendo quase 2.000 casos relatados. Destes casos, 74 apresentaram resistência à rifampicina, 87 à dapsona e 21 à ofloxacina, além de 20 pacientes multirresistentes para rifampicina e dapsona e 4 pacientes multirresistentes para ofloxacina e dapsona no Brasil, Índia e Indonésia. Não houve relato de casos de resistência a todas as três drogas no período de coleta, no entanto, os autores destacam a necessidade de maior vigilância à resistência antimicrobiana.

A frequência de resistência do *M. leprae* à clofazimina é desconhecida, mas parece ser extremamente baixa. A super expressão da proteína MmpS5-MmpL5 em *Mycobacterium tuberculosis* foi associada a resistência a este fármaco, entretanto essa proteína está ausente no *M. leprae*, o que pode parcialmente explicar a raridade de cepas resistentes à clofazimina. Resistência cruzada entre clofazimina e dapsona ou rifampicina não foram relatadas até o momento. No entanto, existem

raros relatos de *M. leprae* resistente à clofazimina e dapsona, mas suscetível à rifampicina (BRASIL, 2021; LI *et al.*, 2022).

Ao longo do processo de evolução, o *M. leprae* teve seu genoma reduzido e muitos genes e funções associadas foram perdidos. Pseudogenes, acúmulo de elementos de sequência de inserção e conteúdo reduzido de G+C são marcas da evolução reductiva, possivelmente devido a mudança drástica no estilo de vida livre para vida associado ao hospedeiro, como a maioria das micobactérias. Embora todas as principais vias anabólicas estejam relativamente intactas, a extensa redução do repertório genético implicou no restrito crescimento e no catabolismo severamente limitado, fato que pode explicar sua impossibilidade de multiplicação em meios artificiais (SINGH; COLE, 2011; DUO FILHO, 2021).

Como o *M. leprae* não pode ser cultivado *in vitro*, o teste de sensibilidade a drogas baseou-se inicialmente na técnica da pata do camundongo (6 a 12 meses) e no método rádio respirométrico, o qual mede a velocidade e a quantidade de consumo de oxigênio pela bactéria (<2 semanas). Na sequência, a melhor compreensão da base genética, a identificação de mutações envolvidas no desenvolvimento de resistência a drogas em micobactérias e o conhecimento do genoma do *M. leprae*, levaram ao desenvolvimento de métodos moleculares destinados a monitorar a susceptibilidade aos fármacos rifampicina, dapsona e fluoroquinolonas, exceto a clofazimina, devido ao seu mecanismo de resistência permanecer pouco conhecido (SINGH; COLE, 2011).

Todos os métodos moleculares atuais para teste de suscetibilidade a drogas de *M. leprae* são baseados na amplificação por PCR da região determinante de resistência a drogas (*DRDR*), *folP1* (dihidropteroato sintase 1, do inglês, *dihydropteroate synthase 1*), subunidade β da RNA polimerase bacteriana, do inglês, *subunit of bacterial RNA polymerase* (*rpoB*) e subunidade A da DNA girase, do inglês, *DNA gyrase subunit A* (*gyrA*), responsáveis respectivamente pela resistência a dapsona, rifampicina e ofloxacina. A detecção de mutações em códons específicos do *folP1*, *rpoB* e *gyrA* é realizada por meio de sequenciamento, método molecular padrão ouro, o qual reduz o tempo de diagnóstico de meses para horas (QUADRO 5) (CAMBAU; WILLIAMS, 2019; SINGH; COLE, 2011).

Ao receber uma amostra com suspeita de resistência, o laboratório referência deve realizar as seguintes etapas:

1. Amplificação de regiões determinantes de resistência a fármacos dos genes *rpoB*, *folP1* e *gyrA*, utilizando método validado, como sequenciamento do produto de PCR amplificado ou hibridação com sondas específicas.

2. Distinção entre a sequência do alelo selvagem e verificação da presença de mutação que leve à substituição de aminoácido.

Os laboratórios de referência comumente utilizam sequenciadores, porém o método de hibridação mostra-se vantajoso e prático, podendo ser implementado em laboratórios sem sequenciadores (WHO, 2017).

A resistência à rifampicina deve-se principalmente a mutações do gene *rpoB*, codificante da subunidade β da RNA polimerase, na região conservada *rpoB* DRDR. As mutações mais comumente encontradas nesta região são a Ser425Leu (Ser456 na última anotação para *M. leprae*) e His451, tendo sido caracterizadas no ensaio de suscetibilidade a drogas de pata de camundongo. Outras mutações de baixa frequência foram descritas, mas nem todas confirmadas (QUADRO 5). Em relação a dapsona, seu mecanismo de resistência em *M. leprae* ocorre principalmente devido a mutações nos códons 53 e 55 do gene *folP1*, codificador da diidropteroato sintase (DHPS1). Como as mesmas mutações foram observadas repetidamente nos códons 53 e 55 do gene *folP1* em cepas resistentes a dapsona caracterizadas, essa região foi designada como DRDR para resistência à dapsona (QUADRO 5). Mutações nos códons 89 e 91 dentro da região altamente conservada *gyrA* DRDR foram associadas ao desenvolvimento de resistência à ofloxacina. A substituição Ala91Val é a mutação mais frequente associada ao fenótipo de resistência à ofloxacina no *M. leprae* e tem sido sugerido que mutações em *gyrB* também podem causar resistência às quinolonas (CAMBAU; WILLIAMS, 2019).

QUADRO 5 – PRINCIPAIS MUTAÇÕES EM GENES ALVO DE DROGAS ANTI-HANSENÍASE QUE CONFEREM RESISTÊNCIA AO *M. LEPRAE*

Ensaio de suscetibilidade medicamentosa ¹ (Pata de camundongo)	Mutação de Aminoácidos ²	Número de Isolados Resistentes
Dapsona - <i>folP1</i>		
R	Thr53Ala	14
NC	Thr53Ala, Pro55Leu	1
R	Thr53Arg	7
R	Thr53Ile	15
R	Thr53Val	3
R	Pro55Arg	21
R	Pro55Leu	27
R	Pro55Ser	1
Rifampicina – <i>rpoB</i>		
R	Gln438Val	1
R	Phe439(Lys + Phe insert) Met440	1
NC	Asp441Tyr	2
NC	Asp441Asn	1
NC	Asp441Asn; Leu458Pro	1
R	His451Asp	2
R	His451Asp; Gly432Ser	1
R	His451Tyr	20
R	Ser456Leu	70
R	Ser456Met	1
R	Ser456Met; Leu458Val	1
R	Ser456Phe	2
NC	Ser456Trp	1
Ofloxacina – <i>gyrA</i>		
NC	Gly89Cys	1
R	Ala91Val	12

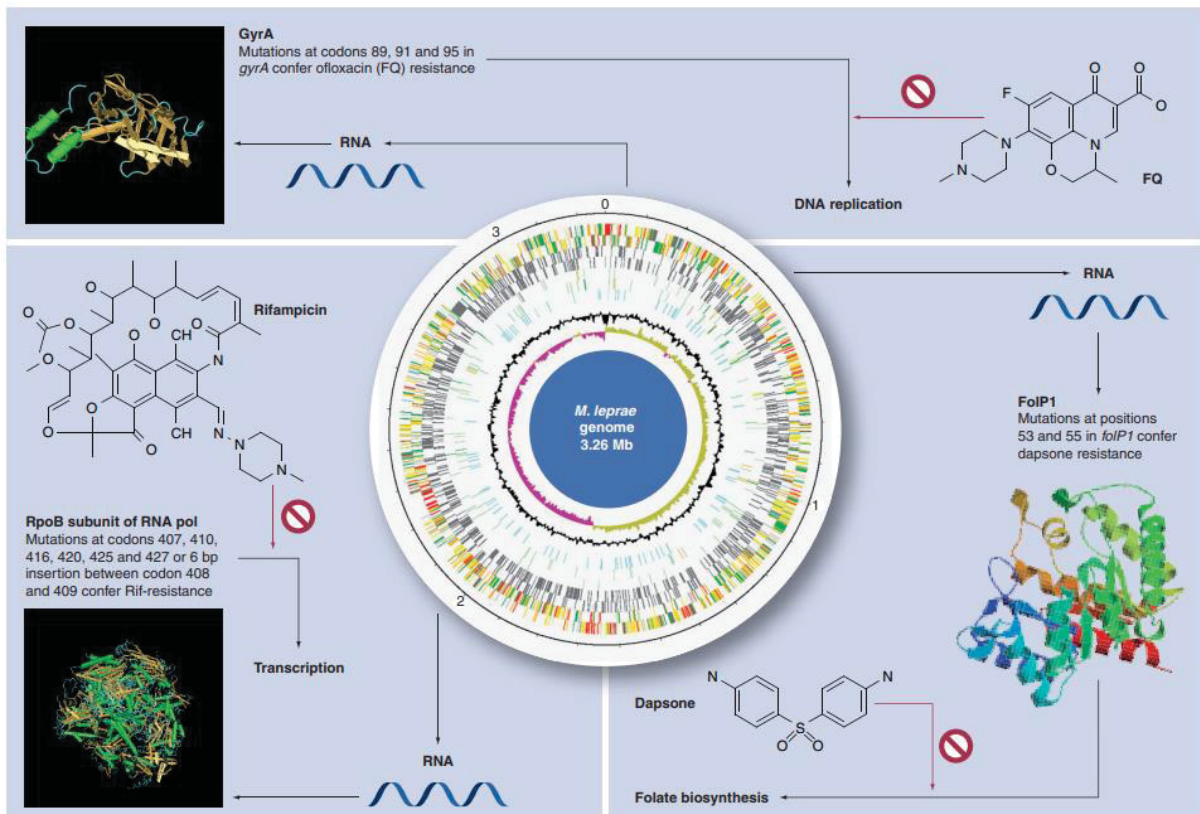
FONTE: CAMBAU; WILLIAMS (2019)

1. R = resistente no ensaio da pata de camundongo / NC = não confirmado no ensaio da pata do camundongo.
2. Substituição de aminoácidos na proteína alvo do fármaco. Aminoácidos mutantes em negrito são mutações de alta frequência para resistência a medicamentos por *M. leprae*.

De acordo com a meta-análise realizada por Li *et al.* (2022), baseada em 382 cepas resistentes a drogas, observou-se que o gene *rpoB* envolveu a maior variedade de mutações e o *gyrA* a menor. Na região DRDR de *rpoB* (códon: 439 - 459), a taxa de mutação no códon que codifica Serina (Ser) foi de 54,17% (IC 95%: 53,02 – 69,40), sendo a maior probabilidade de mutação. Para o *folP1* (códon 44 - 64), o códon que codifica Prolina (Pro) teve a maior taxa de mutação, 83,97% (IC 95%: 77,58 – 90,37) e para *gyrA* (códon: 81 – 101), o *loci* de mutação mais comum foi Alanina (Ala), com probabilidade de 75,18% (IC 95%: 68,54 - 88,62).

A seguir, a figura 6 mostra a localização genômica de mutações nos alvos associados à resistência a drogas que combatem a hanseníase e seu mecanismo de ação.

FIGURA 6 – MUTAÇÕES DE RESISTÊNCIA A MEDICAMENTOS NOS *LOCi* DOS GENES ALVOS NO GENOMA DE *M. LEPRAE*



FONTE: SINGH; COLE (2011).

LEGENDA: Mapa do genoma e as posições de três genes conhecidos por estarem associados à resistência a drogas, seu RNA e produtos proteicos, juntamente com os antibióticos responsáveis pela inibição das funções enzimáticas correspondentes. *rpoB*: subunidade β da RNA polimerase bacteriana, *folP1*: diidropteroato sintase 1, *gyrA*: subunidade A da DNA girase.

2.5 DIAGNÓSTICO DA HANSENÍASE

Apesar do sucesso da poliquimioterapia, o número de novos casos de hanseníase permanece estável em cerca de 250.000 em todo o mundo (ALEMU BELACHEW; NAAFS, 2019). Além disso, a alta taxa de incidência em menores de 15 anos indica que há exposição precoce da população ao bacilo, o que está associado a elevada prevalência na população em geral e é um bom indicador de alta transmissão. Na ausência de uma vacina eficaz, o diagnóstico precoce e o tratamento da doença são importantes para interromper a transmissão do *M. leprae*,

reduzir o risco de incapacidade física e deformidade, bem como a carga física, psicossocial e econômica da doença (CHEN *et al.*, 2022).

A hanseníase afeta os nervos periféricos, pele e mucosa, particularmente do trato respiratório superior. As lesões cutâneas costumam ser o primeiro sintoma, e se não tratada, pode progredir causando danos permanentes aos nervos, pele, membros e olhos. Danos teciduais são causados em sua maioria por reações imunológicas secundárias e por traumas após perda sensorial, levando ao encurtamento e deformidades no nariz ou em dedos das mãos e pés. Pode haver perda de sensibilidade nas lesões cutâneas, nas mãos ou nos pés, dores no rosto ou nos membros, sensação de dormência, sonolência, formigamento ou morte nas áreas afetadas. As lesões cutâneas são geralmente máculas, placas infiltradas, úlceras ou nódulos, de diferentes tamanhos e colorações, hipercrômicas, hipocrômicas, acobreadas, violáceas, avermelhadas (ALEMU BELACHEW; NAAFS, 2019; RIO DE JANEIRO, 2020).

O diagnóstico dos casos de hanseníase é de responsabilidade médica. Dessa forma, todos os casos identificados como suspeitos por profissionais da saúde devem ser encaminhados ao médico da unidade básica para confirmação diagnóstica e início do tratamento. Nesses pacientes, deve-se coletar a história clínica e epidemiológica, assim como proceder o exame de toda a superfície cutânea e troncos nervosos em busca dos sinais sugestivos de hanseníase por meio de testes de sensibilidade e avaliação neurológica simplificada. O acometimento das fibras finas do sistema nervoso pela doença manifesta-se clinicamente pela alteração da sensibilidade térmica, dolorosa e tátil, nesta ordem. Assim, os testes devem ser realizados para verificação destes três tipos de sensibilidade. A avaliação neurológica simplificada consiste num mapeamento sensitivo e motor de olhos, mãos, pés e palpação de nervos periféricos, permitindo a identificação de alterações associadas a determinado tronco neural. Estes são procedimentos inerentes ao diagnóstico e acompanhamento dos casos de hanseníase. Em caso de dúvida diagnóstica, o paciente deverá ser encaminhado para a referência de dermatologia geral mais próxima do domicílio, retornando à unidade básica de origem para continuidade do acompanhamento (RIO DE JANEIRO, 2020).

De acordo com Chen *et al.* (2022), estudos mostram que profissionais de saúde não treinados podem não ser eficientes em reconhecer os primeiros sinais da doença, levando ao atraso ou perda do diagnóstico clínico, especialmente em

regiões geográficas onde a hanseníase é controlada. O desconhecimento é uma das principais razões para a falta de diagnóstico, com a redução da experiência clínica, devido a pouca atenção dada à hanseníase no currículo médico, onde até mesmo dermatologistas, neurologistas e reumatologistas são mal treinados, torna-se mais desafiador identificar a doença nos estágios iniciais e na forma PB, caracterizada pela ausência de bacilos em esfregaços de pele em fenda. Além disso, as máculas ou placas cutâneas frequentemente encontradas na hanseníase PB, são comuns a muitas outras dermatoses, como pitiríase alba, rosácea granulomatosa, granuloma anular, tuberculose cutânea e sarcoidose (CHEN *et al.*, 2018; BARBIERI *et al.*, 2019). Ainda, é difícil realizar o teste de sensibilidade térmica em crianças menores, o qual é necessário para o diagnóstico diferencial de outras lesões cutâneas da infância. Estes desafios demonstram a necessidade de ensaios que possam auxiliar os médicos no diagnóstico precoce da hanseníase mesmo antes que seus sinais clínicos mais claros se manifestarem.

Clinicamente, a hanseníase é diagnosticada quando o paciente apresenta dois dos três sinais cardinais abaixo, exceto em países endêmicos, nos quais a OMS considera um sinal cardinal suficiente (não necessitando do alargamento do nervo) (ALEMU BELACHEW; NAAFS, 2019):

1. Perda de sensibilidade em uma lesão cutânea.
2. Nervo periférico dilatado.
3. Esfregaços cutâneos positivos.

O exame baciloscópico (esfregaço cutâneo para detectar bacilos álcool-ácido resistentes) avalia a carga bacilar e a morfologia. No Brasil, o Ministério da Saúde recomenda a realização de esfregaço cutâneo em fenda em quatro locais que contemplem lesões ativas ou lesões com sensibilidade alterada, bem como os lóbulos das orelhas e o cotovelo contralateral. Na ausência de lesão, a fenda intradérmica deve ser realizada nos lóbulos das orelhas e cotovelos (FIGURA 7). Essas orientações devem-se ao predomínio do bacilo nas áreas mais frias do corpo, por volta de 30°C, faixa de temperatura em que melhor ocorre seu crescimento (JAMBEIRO, *et al.*, 2008).

FIGURA 7 – PREGUEAMENTO DO SÍTIO DE COLETA (ISQUEMIA) E INCISÃO PARA COLETA DO MATERIAL.



FONTE: BRASIL (2010).

Para interpretação de resultados da baciloscopia, utiliza-se o índice baciloscópico proposto por Ridley, método quantitativo que se baseia em uma escala logarítmica com variação entre 0 e 6 cruces (BRASIL, 2010):

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

Embora a baciloscopia se caracterize por alta especificidade, baixo custo e execução relativamente simples quando realizada por profissionais capacitados, o exame tem baixa sensibilidade, resultando em negativo nos casos paucibacilares, o que não exclui o diagnóstico da hanseníase (BRASIL, 2021(b)).

Além do esfregaço cutâneo em fenda, o exame histopatológico é empregado nos casos em que o diagnóstico persiste indefinido mesmo após a avaliação clínica e baciloscópica. Na biópsia de lesões cutâneas, amostras da pele são coletadas, preferencialmente das bordas das lesões mais ativas e mais recentes. Seguindo as orientações do ministério da saúde, o tecido biopsiado deve ser corado por meio da técnica hematoxilina-eosina para a visualização do infiltrado inflamatório e pela coloração de Fite-Faraco ou Wade para a identificação dos bacilos álcool-ácido resistentes. Para classificação positiva ou negativa, as lesões são examinadas quanto ao tipo, extensão e características do infiltrado, bem como quanto à presença

do *M. leprae*. Os resultados do exame histopatológico na hanseníase diferem de acordo com a classificação da doença e sua acurácia depende da seleção apropriada do local para biópsia, do tamanho representativo da amostra e da experiência do patologista no exame de hanseníase (CHEN *et al.*, 2022; BARBIERI *et al.*, 2019; GAMA *et al.*, 2020). No polo tuberculoide, não são identificados bacilos e observa-se granulomas de células epitelioides, células gigantes multinucleadas e linfócitos. Na pele, geralmente o infiltrado inflamatório envolve anexos cutâneos e filetes nervosos, sendo este último um aspecto sugestivo da hanseníase. No polo oposto, casos da forma virchowiana apresentam infiltrado inflamatório com histiócitos desorganizados e difusos, células repletas de BAAR e perda de estruturas anexiais (BRASIL, 2021(b)).

As amplas variações da forma clínica, impactam diretamente na capacidade diagnóstica dos exames, dificultando a detecção da doença. A baciloscopia, técnica ainda muito dependente da habilidade do operador, apresenta baixa sensibilidade na detecção de paucibacilares, e alta especificidade quando preparada adequadamente. A biópsia, exame histopatológico que depende da qualidade da coleta e conservação do material biológico, mostra especificidade diagnóstica entre 70% e 72% e sensibilidade variando de 49% a 70% (BRASIL, 2021d).

Novas metodologias têm sido estudadas para o desenvolvimento de testes mais eficazes, destacando-se os ensaios moleculares, como a reação PCR, os sorológicos como o Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) e os testes rápidos (GAMA *et al.*, 2019; GAMA *et al.*, 2020).

Os testes sorológicos visam detectar anticorpos específicos contra *M. leprae* que indiquem infecção. O descobrimento do PGL-1, antígeno específico do *M. leprae*, possibilitou a realização de testes sorológicos para diagnóstico por meio da técnica de ELISA. O baixo custo e os resultados quantitativos fazem da sorologia anti-PGL-1 um método bastante utilizado. Além do ELISA, foram desenvolvidos ensaios anti-PGL-1 rápidos, estes não requerem estrutura laboratorial, a utilização de equipamentos ou técnicos especializados (GAMA *et al.*, 2020). Em revisão sistemática realizada por Gurung *et al.* (2019) de diversos trabalhos que utilizam o ELISA, foi obtida sensibilidade média de 63,8% e especificidade de 91,0%. De acordo com Van Hooij *et al.* (2018), a maioria dos pacientes PB não apresenta títulos detectáveis de anti-PGL-1. Consequentemente, os testes de detecção de anticorpos não cobrem todo o espectro da doença, sendo estes mais efetivos na

identificação de pacientes MB com alto índice bacilar. Embora resultados positivos indiquem maior risco de desenvolver a doença, o método apresenta baixa sensibilidade e não é adequado como teste independente para detecção precoce (MANTA *et al.*, 2019).

Nos últimos vinte anos, estudos demonstraram o potencial da tecnologia de PCR para a rápida detecção e identificação do bacilo em amostras clínicas. Mais recentemente, a qPCR melhorou a taxa de detecção de doenças, facilitando a quantificação direta do conteúdo de DNA bacteriano em amostras clínicas e aumentando assim a confiabilidade dos resultados (BARBIERI *et al.*, 2019). Vários estudos usaram a qPCR para amplificar sequências específicas e genes-alvo no DNA do *M. leprae*, incluindo *M. leprae*-specific repetitive element (*RLEP*) e o gene que codifica a subunidade 16S do RNA ribossômico (GAMA *et al.*, 2019). Essa ferramenta tornou-se particularmente importante no diagnóstico diferencial de casos com baciloscopia negativa e histopatologia inconclusiva. Na ausência de um padrão ouro, estudos anteriores usaram diagnósticos clínicos ou análises histopatológicas como padrões de referência para avaliar a sensibilidade e especificidade da PCR. No entanto, a subjetividade inerente a esses métodos ressalta a necessidade de critérios mais confiáveis para definir padrões de referência (BARBIERI *et al.*, 2019).

Foi demonstrado que o ensaio de qPCR para a sequência *RLEP* poderia ser usado para melhorar a detecção de infecção em pacientes multibacilares, devido à sua sensibilidade de até 100% e especificidade de 84,6% (MARTINEZ *et al.*, 2011). No entanto, o *RLEP* é altamente conservado em bactérias do mesmo gênero, o que levanta algumas dúvidas sobre seu uso efetivo como marcador diagnóstico. Outra prioridade para implementação como teste diagnóstico é a validação do produto de maneira a garantir a qualidade, procedimentos de execução padronizados, interpretação correta e, portanto, alta confiança nos resultados dos testes (STEINMANN *et al.*, 2020). Assim, para implementação como ensaio diagnóstico, faz-se necessário atender todas as exigências para registro e aprovação por parte da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

2.5.1 Teste Molecular GenoType LepraeDR® - Hain

A introdução de um novo exame complementar com acurácia adequada, irá contribuir para a formação de uma nova definição dos casos. Novos testes também

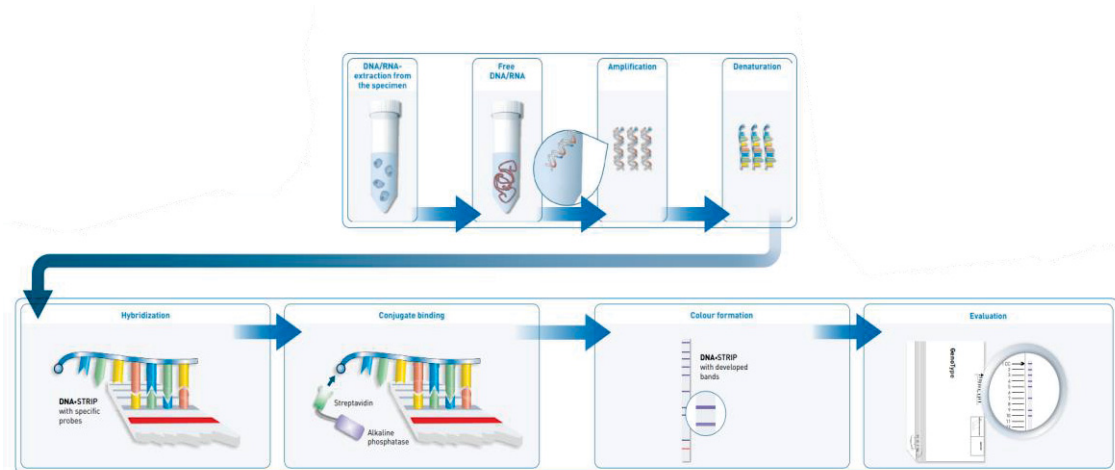
podem ser úteis para a triagem de pacientes assintomáticos, aumentando a detecção e permitindo que o tratamento seja iniciado sem atrasos e incapacidades possam ser prevenidas. Tratar os pacientes o mais cedo possível também significa quebrar a cadeia de transmissão (GURUNG *et al.*, 2019).

O teste molecular GenoType LepraeDR® - HAIN, tem origem alemã e registro Anvisa nº 80502070067. De acordo com o uso pretendido do produto, este é um teste *in vitro* qualitativo para a identificação por genética molecular do *M. leprae* e das principais mutações que resultam em resistências medicamentosas a rifampicina, ofloxacina e dapsona de bactérias álcool-ácido-resistentes em biópsias de pele positivas. Este ensaio baseia-se na tecnologia DNA STRIP de alta sensibilidade e máxima especificidade e tem seu procedimento dividido em três etapas (FIGURA 8):

1. Extração de DNA: a partir de amostras de biópsias de pele positivas.
2. Amplificação multiplex com primers biotinilados: amplificação de regiões específicas do genoma bacteriano.
3. Hibridização reversa em fita de nitrocelulose: as membranas de nitrocelulose presentes no ensaio são revestidas com sondas específicas complementares às sequências amplificadas dos genes investigados pelo ensaio.

Após as etapas 1 e 2 o produto da PCR é desnaturado quimicamente para que esteja em fita única e possa se ligar às sondas presentes na membrana (hibridação). A ligação específica das cadeias de DNA complementares é assegurada por condições rigorosas de temperatura e pela composição dos tampões. A fosfatase alcalina conjugada à estreptavidina se liga à biotina presente no produto amplificado e transforma o substrato adicionado em um corante que se torna visível na membrana como um precipitado colorido. Os padrões de banda formados são então interpretados visualmente ou por meio do software GenoScan (WHO, 2017; GENOTYPE LEPRaedR, HAIN LIFESCIENCE, 2018).

FIGURA 8 – ETAPAS DO ENSAIO MOLECULAR GENOTYPE LEPRAEDR®



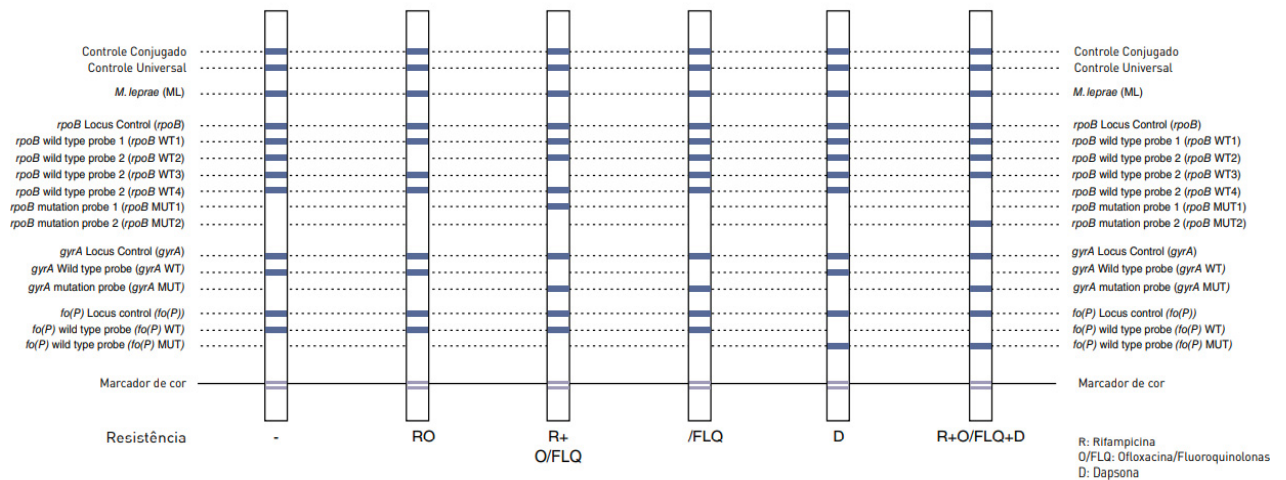
FONTE: HAIN LIFESCIENCE (2022a)

Cada fita inclui cinco zonas/bandas de controle e uma zona para confirmação da presença de estirpe *M. leprae* (FIGURA 9):

- Controle conjugado (CC): verifica a ligação do conjugado na fita e reação cromogênica correta.
- Controle universal (UC): detecta, todas as micobactérias e membros do grupo de bactérias gram-positivas com alto conteúdo de G+C avaliados na fabricação do produto. Apenas devem ser consideradas as bandas cujas intensidades são equivalentes ou maiores que a intensidade da banda da zona do controle universal.
- Três controles de lócus (*rpoB*, *gyrA* e *folP1*): verifica a sensibilidade ideal da reação para cada um dos lócus gênicos testados.
- *Mycobacterium leprae* (ML): banda que documenta a presença da estirpe de *M. leprae*. A variação da intensidade desta banda depende da concentração de DNA inicial. Se esta banda estiver ausente (negativa), a espécie bacteriana testada não é o *M. leprae* e a amostra não pode ser avaliada com este ensaio.

A banda *M. leprae* (ML) e bandas para os alvos de resistência selvagem (WT) e/ou mutante (MUT) estarão presentes quando houver detecção de *M. leprae*, conforme figura 9.

FIGURA 9. ENSAIO MOLECULAR GENÉTICO PARA A DETECÇÃO DE *M. LEPRAE* E SUA RESISTÊNCIA À RIFAMPICINA, OFLOXACINA E DAPSONA.



FONTE: HAIN LIFESCIENCE (2022).

LEGENDA: Ilustração das fitas de nitrocelulose contendo bandas controle e bandas alvo para *M. leprae* e suas principais resistências antimicrobianas. Cada fita apresenta uma condição de resultado possível para o ensaio GenoType LepraeDR®. Da esquerda para direita: (-): Presença de *M. leprae* e ausência de resistência. (RO): Presença de *M. leprae* e ausência de banda selvagem *rpoB* WT2: infere presença de mutação distinta daquelas detectadas pelo produto. (R+, O/FLQ): Presença de *M. leprae* e resistência a rifampicina e ofloxacina/fluoroquinolonas: ausência das bandas selvagens *rpoB* WT3 e *gyrA* WT e presença das bandas mutantes *rpoB* MUT1 e *gyrA* MUT. (/FLQ): Presença de *M. leprae* e resistência a ofloxacina/fluoroquinolonas: ausência da banda selvagem *gyrA* WT e presença da banda mutante *gyrA* MUT. (D): Presença de *M. leprae* e resistência a dapsona: ausência da banda selvagem *foi(P)* WT e presença da banda mutante *foi(P)* MUT. (R+O/FLQ+D): Presença de *M. leprae* e resistência a rifampicina, ofloxacina/fluoroquinolonas e dapsona: ausência das bandas selvagens *rpoB* WT4, *gyrA* WT e *foi(P)* WT, presença das bandas mutantes *rpoB* MUT2, *gyrA* MUT e *foi(P)* MUT.

A identificação da resistência a rifampicina é realizada pela detecção das mutações mais frequentes do gene *rpoB* (TABELA 1) (FIGURA 10), para a detecção de resistência a ofloxacina ou outras fluoroquinolonas, são examinadas as mutações mais frequentes do gene *gyrA* (TABELA 2) e para testar a resistência a dapsona é examinada a região do gene *foiP1* (TABELA 3). O teste é indicado como um apoio no diagnóstico com aplicação em laboratórios médicos (GENOTYPE LEPRAE DR, 2018).

FIGURA 10. REGIÃO DE RESISTÊNCIA À RIFAMPICINA DO GENE *RPOB*

FONTE: GENOTYPE LEPRÆDR, HAIN LIFESCIENCE (2018).

LEGENDA: *rpoB*: *rpoB* Controle de Loci; *rpoB* WT1-4: sondas *rpoB* tipo selvagem; *rpoB* MUT1-2: sondas de mutação *rpoB*. Os números (numeração de acordo com o genoma do *M. leprae*) especificam as posições dos aminoácidos (códon) para todas as mutações listadas na tabela. Os códon para os quais as sondas foram desenhadas estão sublinhados.

TABELA 1 – MUTAÇÕES NO GENE *RPOB* E AS BANDAS CORRESPONDENTES TIPO SELVAGEM E DE MUTAÇÃO (NUMERAÇÃO DE ACORDO COM O GENOMA DO *M. LEPRÆ*)

Ausência da banda tipo selvagem	Códon analisado	Desenvolvimento da banda de mutação	Mutação
<i>rpoB</i> WT1	<u>429-434</u>		G432S
<i>rpoB</i> WT2	<u>437-442</u>		Q438V F439/M440 KF insertion* D441N* D441Y*
<i>rpoB</i> WT3	<u>449-455</u>	<i>rpoB</i> MUT1	H451Y H451D H451V*
<i>rpoB</i> WT4	<u>455-459</u>	<i>rpoB</i> MUT2	S456L S456M S456F S456W* L458V* L458P*

FONTE: GENOTYPE LEPRÆDR, HAIN LIFESCIENCE (2018).

* Mutações raras foram detectadas apenas *in silico*.

TABELA 2 – MUTAÇÕES NO GENE *GYRA* E AS BANDAS CORRESPONDENTES TIPO SELVAGEM E DE MUTAÇÃO (NUMERAÇÃO DE ACORDO COM O GENOMA DO *M. LEPRÆ*)

Ausência da banda tipo selvagem	Códon analisado	Desenvolvimento da banda de mutação	Mutação
<i>gyrA</i> WT	<u>89</u>		G89C*
	<u>91</u>	<i>gyrA</i> MUT	A91V

FONTE: GENOTYPE LEPRÆDR, HAIN LIFESCIENCE (2018).

* Mutações raras foram detectadas apenas *in silico*.

TABELA 3 – MUTAÇÕES NO GENE *FOLP1* E AS BANDAS CORRESPONDENTES TIPO SELVAGEM E DE MUTAÇÃO (NUMERAÇÃO DE ACORDO COM O GENOMA DO *M. LEPRAE*)

Ausência da banda tipo selvagem	Códon analisado	Desenvolvimento da banda de mutação	Mutação
<i>folP1</i> WT	53		T53A T53R T53I
	55	<i>folP1</i> MUT	P55L P55R

FONTE: GENOTYPE LEPRAE DR, HAIN LIFESCIENCE (2018).

O teste comercial GenoType LepraeDR® é apresentado como uma das técnicas para realização do monitoramento de resistências no “Guia para vigilância da resistência antimicrobiana na hanseníase: atualização 2017”, que tem por objetivo orientar os países sobre como testar a resistência a drogas na hanseníase (WHO, 2017). No Brasil, os principais centros de referência nacional em hanseníase utilizam técnicas de biologia molecular, em especial o sequenciamento, para o monitoramento de resistências, entretanto a capacidade de testagem não atinge a preconizada pelo Ministério da Saúde visto a necessidade de equipamentos especializados, estrutura laboratorial e o custo desta técnica.

2.6 ACURÁCIA DIAGNÓSTICA

Frequentemente enfrenta-se o desafio de diagnosticar uma doença com base nos resultados de testes diagnósticos. Entretanto, a maioria dos testes diagnósticos usados na prática clínica são imperfeitos e produzem resultados falso-positivos (o teste é positivo, mas o paciente não tem a doença) e resultados falso negativos (o teste é negativo, mas o paciente tem a doença) (FERREIRA e PATINO, 2017).

De acordo com Moreira *et al.* (2016), são cinco as principais características de performance dos testes diagnósticos com resultados numéricos: sensibilidade, especificidade, valor preditivo (positivo e negativo), acurácia e razão de verossimilhança (positiva e negativa) (QUADRO 6).

- Sensibilidade: é a probabilidade de resultado positivo na presença da doença, isto é, avalia a capacidade do teste detectar a doença quando ela está presente (verdadeiro positivo) e é calculado como: $a/(a+c)$.

- Especificidade: é a probabilidade de resultado negativo na ausência da doença, isto é, avalia a proporção de indivíduos que não têm a doença e apresenta teste negativo (verdadeiro negativo) e é calculado como: $d/b+d$.
- Valor preditivo positivo: é a probabilidade da presença da doença quando o teste é positivo e é calculado como: $a/a+b$
- Valor preditivo negativo: é a probabilidade da ausência de doença quando o teste é negativo: $d/c+d$.
- Acurácia: é a probabilidade de o teste fornecer resultados corretos, ou seja, ser positivo nos doentes e negativo nos não doentes. É calculado como: $(a+d)/(a+b+c+d)$, também expresso como $(a+d)/N$.
- A razão de verossimilhança (RV): é a probabilidade de um determinado resultado em um indivíduo doente dividida pela probabilidade do mesmo resultado em um indivíduo sem a doença, podendo ser positiva ou negativa.

A sensibilidade e a especificidade são medidas importantes para avaliação do desempenho de um novo teste diagnóstico em comparação com o desempenho de um teste padrão ouro existente (FERREIRA e PATINO, 2017). Como são valores não influenciados pela prevalência da doença, podem ser utilizados em diferentes populações e, também, para comparar o potencial diagnóstico de testes diferentes. Valores preditivos positivos e negativos contêm informações sobre o poder do teste (sensibilidade e especificidade) e da população a ser examinada (prevalência da doença), sendo uma medida de maior utilidade clínica (MOREIRA *et al.*, 2016).

QUADRO 6. PERFORMANCE TESTE DIAGNÓSTICO – TABELA DE CONTINGÊNCIA

	Doença (D+)	Não-Doença (D-)	Total
Teste índice positivo (T+)	Verdadeiros positivos (a)	Falsos positivos (b)	Testes positivos (a+b)
Teste índice negativo (T-)	Falsos negativos (c)	Verdadeiros negativos (d)	Testes negativos (c+d)
Total	Com doença (a+c)	Sem doença (b+d)	N (a+b+c+d)

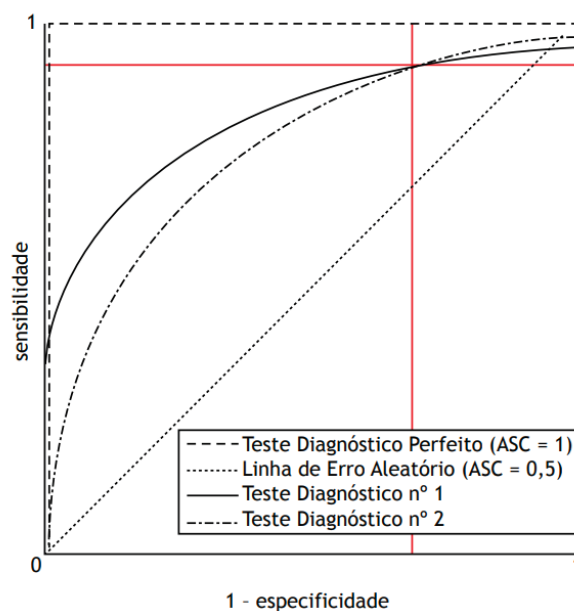
FONTE: BRASIL, 2014.

Quando um novo teste diagnóstico é avaliado, define-se um ponto de corte que estabelece se o teste é positivo ou negativo, e há sempre uma troca entre sensibilidade e especificidade ao alterar este ponto (o aumento de sensibilidade está para a redução de especificidade, assim como a redução da sensibilidade está para

o aumento de especificidade). Essa troca entre sensibilidade e especificidade em diversos pontos de corte possíveis permite traçar uma curva ROC (receiver operator characteristic curve) e descrever o desempenho geral do teste de discriminar entre presença e ausência da doença (MOREIRA *et al.*, 2016; FERREIRA e PATINO, 2017).

As curvas ROC são representações gráficas que permitem exibir, comparar e avaliar a acurácia de testes diagnósticos atuais e novos. Para tanto, as curvas ROC relacionam três medidas de precisão: sensibilidade (verdadeiro-positivo), especificidade (verdadeiro-negativo) e ASC (probabilidade de um indivíduo aleatório com a doença ter um valor mais alto no teste do que outro sem a doença). Um teste de diagnóstico perfeito ($ASC=1,0$) identifica corretamente todos os resultados positivos e negativos como doentes e não doentes, respectivamente, e alcançaria o canto superior esquerdo (FIGURA 11). Essas medidas são calculadas para qualquer teste de diagnóstico, comparando o resultado do teste (positivo ou negativo) contra um padrão ouro bem conhecido que determina o verdadeiro estado da doença. (MOREIRA *et al.*, 2016; BRASIL, 2014; FERREIRA e PATINO, 2017).

FIGURA 11 - EXEMPLOS COMPARATIVOS DE CURVAS ROC



LEGENDA: Curva ROC: diagnóstico perfeito ($ASC=1$), linha de erro aleatório ($ASC=0,5$) e dois testes diagnósticos hipotéticos. As linhas vermelhas representam um limite clinicamente relevante da faixa de alta sensibilidade em que a ASC do Teste Diagnóstico nº 2 supera a do Teste Diagnóstico nº 1.

FONTE: FERREIRA e PATINO, 2017.

Dessa forma, por meio das curvas ROC os estudos podem derivar uma medida de acurácia do teste baseado no cálculo da área sob a curva ROC, ou podem definir um valor de corte para a positividade do teste baseado em algum critério, como um ponto da curva que maximize seus valores de sensibilidade e especificidade ou basear o limiar de positividade de acordo com um objetivo, como triagem, diagnóstico ou prognóstico. Se um mesmo teste índice (teste que está sendo avaliado) apresentar diferentes valores para positividade em diferentes estudos, pode-se utilizar esses diferentes valores (pontos de corte) e correspondentes pares de sensibilidade e especificidade para estimar uma nova curva ROC, esse método de cálculo é chamado de curva ROC sumária ou SROC.

3 JUSTIFICATIVA

A dificuldade e falhas no diagnóstico clínico e laboratorial inerentes à biologia da hanseníase resultam na alta disseminação e geração de novos casos da doença, além do que a falta de tratamento pode levar ao agravamento do quadro resultando em deformidades e incapacitações físicas. Ainda, a falta de conscientização da comunidade e o estigma associado a doença favorecem o atraso na sua identificação. Dessa forma, avaliar a performance e acurácia do teste molecular GenoType LepraeDR® visa contribuir com o levantamento de ferramentas que auxiliem no diagnóstico precoce da hanseníase, bem como no monitoramento de suas resistências medicamentosas.

4 OBJETIVOS

4.1.1 Objetivo geral

Avaliar a acurácia do teste GenoType LepraeDR® como ferramenta para o diagnóstico molecular de *M. leprae* associado ao diagnóstico clínico e no rastreamento de mutações que levam à resistência medicamentosa em indivíduos brasileiros com suspeita diagnóstica de hanseníase

4.1.2 Objetivos específicos

- Testar a sensibilidade, especificidade e acurácia de detecção do teste GenoType LepraeDR® em biópsias de pele de brasileiros participantes do estudo em comparação à metodologia de qPCR de genes alvo para detecção do *M. leprae*.
- Verificar se há concordância na detecção de mutações bacterianas nos genes *rpoB*, *gyrA* e *folP1* que causam resistência aos medicamentos rifampicina, ofloxacina e dapsona, comparando-se o GenoType LepraeDR® com o sequenciamento de Sanger destes mesmos genes.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina - UnB (CAAE 93119018.7.0000.5558) (ANEXO 1). Todos os participantes foram incluídos após a assinatura do termo de consentimento informado e recebem retorno de resultados do estudo realizado.

5.2 POPULAÇÃO ESTUDADA

Foram incluídos em amostragem consecutiva, pacientes internados no Ambulatório de Hanseníase do Serviço de Dermatologia do Hospital Universitário de Brasília, localizado na UnB (Brasília, Distrito Federal, Brasil) no período de agosto de 2018 a agosto de 2020. Trata-se de um serviço de referência terciária e distrital, onde os pacientes são encaminhados de unidades básicas de saúde para confirmação diagnóstica, após suspeita clínica de hanseníase. Todos os participantes incluídos foram examinados por um dermatologista certificado e receberam o mesmo conjunto de testes clínicos para definição de caso, bem como baciloscopia e biópsia cutânea com punch de 4 mm após anestesia local com lidocaína a 2%. Nos participantes com lesões ativas, a biópsia foi realizada na borda da lesão e nos participantes sem lesões ativas, a biópsia foi realizada na face posterior do lóbulo da orelha direita e cotovelo. Após identificação dos casos, todos foram incluídos por meio do termo de consentimento livre e esclarecido. Os exames de biologia molecular foram realizados no Laboratório de Dermatologia da Faculdade de Medicina da UnB, e o sequenciamento no Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal (LACEN-DF).

5.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO, DEFINIÇÃO DE CASOS E CONTROLES - DIAGNÓSTICO CLÍNICO (EXAME REFERÊNCIA)

Os casos de hanseníase foram definidos de acordo com as recomendações da OMS. Os colaboradores envolvidos na classificação clínica dos casos incluídos não tinham informações sobre o resultado dos testes de índice (testes sob avaliação

de desempenho). Como critério de inclusão, foram incluídos participantes encaminhados ao ambulatório de hanseníase para diagnóstico diferencial.

Casos de hanseníase foram diagnosticados clinicamente (Gold Standard) pelo achado de pelo menos um dos seguintes sinais cardinais: (1) perda definitiva de sensibilidade em uma mancha de pele pálida (hipopigmentada) ou avermelhada; (2) nervo periférico espessado ou aumentado, com perda de sensibilidade e/ou fraqueza dos músculos supridos por esse nervo; (3) presença de bacilos álcool-ácido resistentes em esfregaço cutâneo e exclusão de qualquer outro diagnóstico diferencial (ALEMU BELACHEW; NAAFS, 2019). Os participantes que não preencheram os critérios foram classificados como controles, grupo composto por indivíduos com doenças que podem ser confundidas com hanseníase, especialmente em unidades básicas de saúde, como: micose fungoide, micobacteriose, carcinoma espinocelular, dermatite de contato alérgica, farmacodermia, entre outros.

A classificação da hanseníase foi baseada em critérios operacionais e na classificação Madrid 1953.

- Critérios operacionais: Segundo a OMS, os indivíduos acometidos pela hanseníase foram divididos em casos paucibacilares (1 a 5 lesões cutâneas, sem presença demonstrada de bacilos em esfregaço cutâneo) e em casos multibacilares (mais de cinco lesões cutâneas ou com envolvimento do nervo (neurite pura, ou qualquer número de lesões de pele e neurite), ou com a presença comprovada de bacilos em esfregaço cutâneo), independentemente do número de lesões cutâneas.
- Classificação Madrid e forma neural pura: Os indivíduos acometidos pela hanseníase foram classificados em indeterminado, tuberculóide, limítrofe, lepromatoso e em hanseníase neural pura (forma de hanseníase caracterizada por envolvimento neural sem lesões cutâneas que afeta cerca de 3% a 10% dos pacientes e pode ocorrer em qualquer espectro, sendo mais frequente no tipo tuberculóide) (TRAVE *et al.*, 2021).

5.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

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

5.5 TAMANHO AMOSTRAL

Para o cálculo do tamanho da amostra consideramos dados assistenciais do Hospital Universitário de Brasília e procedimentos já validados em publicações anteriores, como por Bujang e Adnan (2016), em que a partir do H0 e H1 para os parâmetros de sensibilidade e especificidade, prevalência da doença na população analisada, poder estatístico mínimo de 80% e $p < 0,05$ pode-se estabelecer a amostragem mínima a ser utilizada.

Primeiramente, consideramos um valor de sensibilidade de 78,5% (IC 95% 61,9-89,2) e um valor de especificidade de 89,3% (IC 95% 61,4-97,8) para qPCR de acordo com uma metanálise anterior que avaliou testes que visavam a detecção de resistência em indivíduos acometidos pela hanseníase (ANDRADE *et al.*, 2022). Consideramos uma sensibilidade e especificidade inicial de 60% (H0), compatível com o limite inferior de ambos os intervalos de confiança descritos na revisão citada acima. A prevalência de indivíduos com diagnóstico de hanseníase no serviço de dermatologia, segundo dados internos, é de aproximadamente 50%. Assumimos que poderíamos atingir 80% de sensibilidade (H1) com o alvo de qPCR *RLEP* e com os alvos *folP1*, *rpoB* e *gyrA* em série e com o ensaio comercial GenoType LepraeDR®. Considerando um poder estatístico de 0,80 e um valor de $p < 0,05$, estimou-se como tamanho amostral mínimo 45 casos de hanseníase. Considerou-se um acréscimo de 10% neste cálculo para suprir perdas decorrentes de falhas técnicas ou de processamento. O total de 80 participantes foram incluídos no estudo.

5.6 TIPO DE ESTUDO

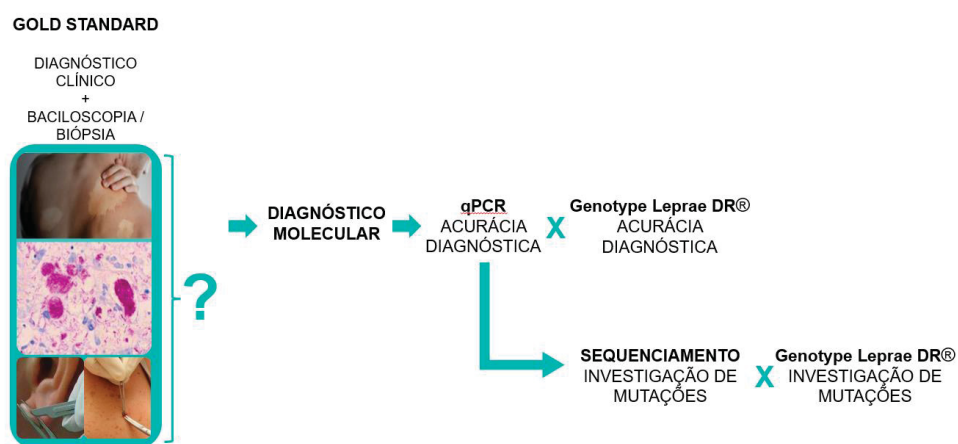
Com o objetivo de testar a acurácia do teste molecular GenoType LepraeDR® para o diagnóstico da hanseníase e de suas principais resistências antimicrobianas utilizou-se uma estratégia transversal para simular condições

práticas, na qual a definição de indivíduos acometidos pela hanseníase (casos) e indivíduos com outras condições (controles) foi feita por meio de diagnóstico clínico médico e a coleta de amostra ocorreu simultaneamente. Dessa forma, o médico ainda não contava com as informações dos testes laboratoriais de referência. A classificação clínica dos participantes do estudo também foi desconhecida durante a realização dos procedimentos técnicos e os dados foram correlacionados apenas na análise de resultados.

5.7 ENSAIOS LABORATÓRIAS (EXAMES REFERÊNCIA)

O fluxograma de diagnóstico realizado neste estudo é apresentado abaixo, sendo cada etapa detalhada sequencialmente (FIGURA 12).

FIGURA 12. DIAGNÓSTICO REFERÊNCIA (CLÍNICO E LABORATORIAL) E A VERIFICAÇÃO DA ACURÁCIA DO TESTE GENOTYPE LEPRÆDR® NO DIAGNÓSTICO MOLECULAR E NA IDENTIFICAÇÃO DE RESISTÊNCIAS



FONTE: De autoria própria.

5.7.1 Baciloscopia

O raspado intradérmico (baciloscopia) foi coletado conforme orientações prestadas pelo Guia de Procedimentos Técnicos Baciloscopia em Hanseníase do Ministério da Saúde (BRASIL, 2010). Realizou-se antissepsia com álcool a 70% dos sítios indicados na solicitação médica e com o auxílio de uma pinça Kelly, foi feita uma prega no sítio de coleta, pressionando a pele o suficiente para obter a isquemia, evitando o sangramento. A pressão foi mantida até o final da coleta sem travar a

pinça. Após, foi feito um corte na pele de aproximadamente 5mm de extensão por 3mm de profundidade e o esfregaço foi adequadamente inserido na lâmina e fixado para posterior análise. Em participantes com lesões cutâneas visíveis ou áreas com alteração de sensibilidade, a coleta foi feita em lóbulo auricular direito (LD), lóbulo auricular esquerdo (LE), cotovelo direito (CD) e lesão (L). Nas lesões planas, a amostra foi coletada no limite interno. Nos nódulos, tubérculos e placas eritematosas marginadas por micro tubérculos, as amostras foram coletadas no centro. Em participantes sem lesões ativas visíveis, o material foi colhido no lóbulo auricular direito (LD), lóbulo auricular esquerdo (LE), cotovelo direito (CD) e cotovelo esquerdo (CE). A escala logarítmica foi utilizada para estratificação dos grupos. Os dados obtidos a partir das baciloscopias foram utilizados como apoio na definição dos casos.

5.7.2 Biópsia

Biópsia incisional circular com diâmetro de 4mm foi realizada nos participantes incluídos no estudo após assepsia, antissepsia e anestesia local com solução de lidocaína a 2%. O local escolhido para obtenção da amostra foi a área suspeita ou periferia da lesão suspeita de hanseníase e em casos de ausência de lesão, a coleta foi realizada na área do cotovelo. A biópsia foi utilizada para extração de DNA conforme descrito no item 5.8.1.

5.8 ENSAIOS MOLECULARES

5.8.1 Extração de DNA

As amostras de pele foram coletadas e armazenadas em freezer -80°C para posterior extração. A extração de DNA foi realizada usando o PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) seguindo as instruções do fabricante. Este conjunto comercial tem protocolos previamente definidos para a extração de amostras de tecido. As amostras de DNA foram armazenadas a -80°C por até 120h até a reação de qPCR (SEVILHA; CERQUEIRA; GOMES, 2021).

5.8.2 PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

O par de iniciadores específicos para o elemento de repetição *RLEP* de *M. leprae*, foi projetado de acordo com Sevilha, Cerqueira e Gomes (2021), por meio da ferramenta de *Design Primer* (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland, EUA), *RLEP-F*: 5' – TGCGCTAGAAGGTTGCCGTA – 3' e *RLEP-R*: 5' – ATTTCTGCCGCTGGTATCGGT – 3', resultando em um fragmento de 148bp. Estes pares de primers têm temperaturas de melting semelhantes, 2°C graus acima de 60°C (para usar uma única temperatura de anelamento e extensão) e um teor de GC próximo a 50%. Como controle interno de reação, o alvo endógeno escolhido foi a beta globulina humana. O conjunto de primers específico e utilizado para amplificação deste alvo foi BGF 5' – GGCAGGTTGGTATCAAGGTTAC – 3' e BGR 5' – CCTAAGGGTGGGAAAATAGACC – 3' (SEVILHA; CERQUEIRA; GOMES, 2021).

De acordo com Sevilha *et al.* (2022), baseando-se nos primers recomendados pela OMS e por meio da mesma ferramenta *Design Primer*, foram projetados primers para amplificação de um fragmento dos genes *folP1*, *rpoB* e *gyrA*, além de *primers* adicionais capazes de amplificar uma sequência interna (Nested-qPCR) do produto da primeira reação de qPCR. Dessa forma, as reações de Nested-qPCR foram realizadas em duas etapas: a primeira reação de qPCR usando como molde o DNA extraído da biópsia, e uma segunda reação utilizando *primers* capazes de amplificar um fragmento interno do produto da primeira qPCR. O objetivo de uso da Nested-PCR é aumentar a concentração do fragmento de interesse e, conseqüentemente aumentar a sensibilidade e a especificidade da amplificação do DNA quando comparada com as reações da PCR convencionais. Os *primers* usados para as reações descritas acima são apresentados na Tabela 4.

TABELA 4 – PARES DE PRIMERS USADOS PARA AS REAÇÕES DE qPCR.

Alvo	Primers	Sequências	Produto (pb)	CG%	Tm
<i>RLEP</i>	RLEP-F	5'-TGCGCTAGAAGGTTGCCGTAT-3'	148	52,3	62,1
	RLEP-R	5'-ATTTCTGCCGCTGGTATCGGT-3'		52,3	62,1
<i>folP1</i>	folP1-F1	5' - CTTGATCCTGACGATGCTGT - 3'	254	50,0	57,6
	folP1-R1	5' - CCACCAGACACATCGTTGAC - 3'		50,0	58,8
<i>*folP1</i>	folP1-F2	5' - GATCCTGACGATGCTGTCCAG - 3'	242	57,1	60,5
	folP1-R2	5' - ACATCGTTGACGATCCGTG - 3'		52,6	57,9
<i>rpoB</i>	rpoB-F1	5' - ACGCTGATCAATTATCCGTCC - 3'	345	47,6	58,2
	rpoB-R1	5' - GTATTCGATCTCGTCGCTGA - 3'		50,0	57,3
<i>*rpoB</i>	rpoB-F2	5' - CTGATCAATATCCGTCCGGT - 3'	255	50,0	56,8
	rpoB-R2	5' - CGACAATGAACCGATCAGAC - 3'		50,0	56,6
<i>gyrA</i>	gyrA-F1	5' - ATGACTGATATCACGCTGCCA - 3'	390	47,6	59,5
	gyrA-R1	5' - ATAACGCATCGCTGCCGGTGG - 3'		61,9	65,9
<i>*gyrA</i>	gyrA-F2	5' - GATGGTCTCAAACCGGTACATC - 3'	225	50,0	58,8
	gyrA-R2	5' - ACCCGGCCGAATTGAAATTG - 3'		47,3	56,8

LEGENDA: Pb = Pares de bases, CG% = % de citosina e guanina, Tm = temperatura de melting, *RLEP* = elemento repetitivo, *folP1* = alvo associado à resistência à dapsona, *rpoB* = alvo associado à resistência à rifampicina, *gyrA* = alvo associado à resistência às quinolonas; * = as reações Nested foram realizadas em 2 etapas compreendendo uma primeira reação idêntica às reações de amplificação simples e uma segunda etapa usando um segundo par de primers visando amplificar uma sequência interna produto da primeira reação.

As reações foram realizadas em um termociclador QuantStudio 1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos) usando PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos) em um volume final de 15 µl, contendo 1X Universal SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos), 10 µM de cada iniciador (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos), 3 µl de DNA (20 a 100 ng) e água ultrapura para o volume final. A concentração de DNA não foi padronizada pois, ao quantificar o DNA, esse é correspondente ao DNA humano + DNA de *M. leprae* (quando presente). O DNA de *M. leprae* na amostra é escasso, assim, coloca-se a concentração máxima recuperada na coluna de extração. Como controle interno de inibição de qPCR e da presença de DNA na amostra, utilizou-se a beta globulina humana na reação. A amplificação foi realizada de acordo com o *standard cycling mode* (primer Tm ≥ 60°C) sugerido pelo fabricante da PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix, sendo: etapa inicial de 50°C por 2 minutos (ativação da UDG) e 95°C por 2 minutos (ativação Dual-Lock™ DNA polimerase), seguida de 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. A curva de melting foi processada de 60°C a 95°C, tendo velocidade de rampa de aumento de temperatura de 0,05°C/s. O threshold foi alocado na inflexão da curva e os resultados foram obtidos de acordo com a primeira detecção de sinal fluorescente do Cycle Threshold (Ct), ou seja, o

ciclo de quantificação (Cq) e a amostra foi considerada positiva quando mostrou Cq menor que 40, adotado como ponto corte, enquanto amostras com Cq's superiores foram consideradas negativas.

5.8.3 Teste Molecular GenoType LepraeDR® - Amplificação e Hibridização reversa

Após extração de DNA das biópsias, o mesmo eluido utilizado para qPCR foi também usado para realização da reação de PCR convencional e hibridização reversa por meio do teste Molecular GenoType LepraeDR® (Hain Lifescience, Germany). Como princípio do ensaio, o reagente mistura de primer / nucleotídeo (PNM) contém *primers* biotinilados para a amplificação de regiões específicas da estirpe de *M. leprae* (*M. leprae*, *rpoB*, *gyrA* e *folP1*). Após amplificação e desnaturação química, os *amplicons* de cadeia única ligam-se (hibridização) às sondas específicas e complementares aos ácidos nucleicos amplificados presentes em tiras de nitrocelulose. Amplificação, hibridização e interpretação foram realizadas de acordo com a instrução de uso do fabricante (GENOTYPE LEPRAE DR, 2018).

Para preparo da reação de PCR seguiu-se as instruções de uso do kit GenoType, o qual orienta o uso da HotStartTaq DNA Polymerase (Qiagen):

- 35 ul de PNM;
- 5 ul de 10x Tampão de PCR Buffer para HotStarTaq DNA Polymerase (contendo 15 mM MgCl₂);
- 2 ul de solução de MgCl₂ 25 mM;
- 3 ul de água DNase e RNase free;
- 0,2 ul (1 U) de Polymerase HotStarTaq (Qiagen);
- 5 ul de DNA total (20 a 100 ng)

A concentração final de MgCl₂ nesta mistura de amplificação foi de 2,5 mM. A ciclagem está exposta na figura 13.

FIGURA 13 – CICLAGEM PARA AMPLIFICAÇÃO DOS ALVOS DO GENOTYPE LEPRÆDR®

15 min 95°C	1 ciclo
30 sec 95°C 2 min 58°C	10 ciclos
25 sec 95°C 40 sec 53°C 40 sec 70°C	30 ciclos
8 min 70°C	1 ciclo
Taxa de aquecimento	≤2,2°C/sec

FONTE: GENOTYPE LEPRÆDR, 2018.

Após amplificação, realizou-se a hibridização no equipamento TwinCubator, equipamento capaz de homogeneizar as amostras, fitas e reagentes, controlando tempo e temperatura em cada etapa do protocolo (FIGURA 14 e FIGURA 15).

FIGURA 14 – TWINCUBATOR – HIBRIDIZAÇÃO DAS FITAS

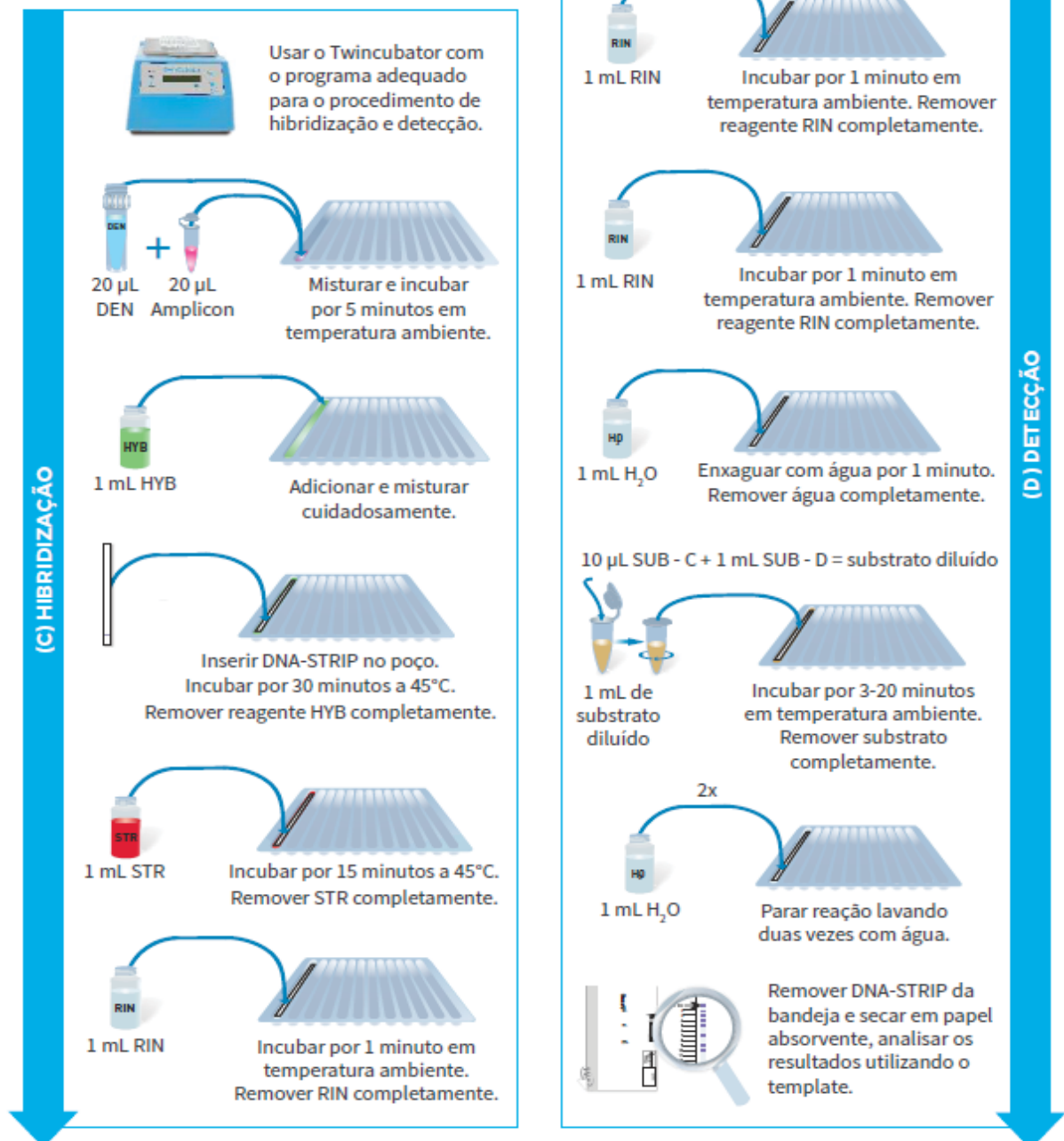


FONTE: A AUTORA, DURANTE EXPERIMENTAÇÃO EM BANCADA.

FIGURA 15 – GUIA ILUSTRADO DE HIBRIDIZAÇÃO – GT45

GUIA DE HIBRIDIZAÇÃO - GT 45**(C-D) Área de Hibridização e Detecção**

- Colocar jaleco e luvas.
- Descontaminar área de trabalho com solução de Hipoclorito de Sódio 1,5% recém diluída.
- Pré-aquecer soluções RIN e água destilada a temperatura ambiente e HYB e STR a 45°C.
- Diluir, de acordo com a quantidade necessária, os reagentes CON-C e CON-D em diluição 1:100 e os reagentes SUB-C e SUB-D em diluição 1:100.

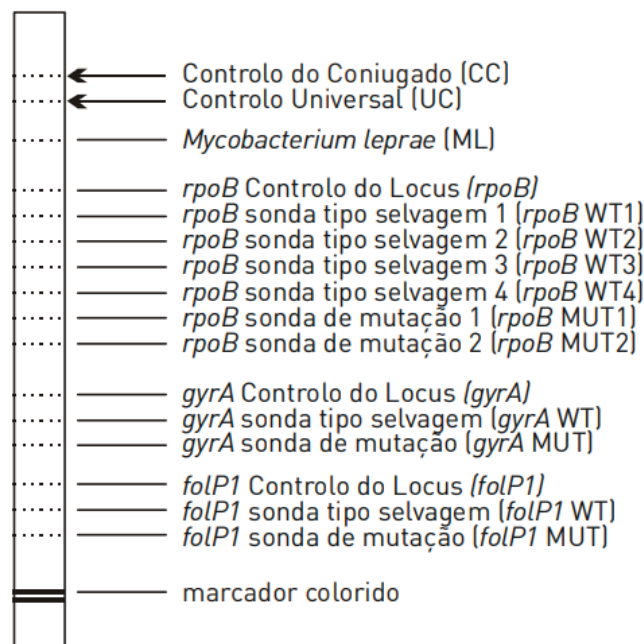


FONTE: HAIN E MOBIUS LIFE SCIENCE.

Após a hibridização, a interpretação das bandas presentes e ausentes para cada tira, foi feita comparando-as com uma ficha modelo fornecida com o ensaio (FIGURA 16). A banda de reação *Mycobacterium leprae* (ML) confirma a presença de uma estirpe de *M. leprae*. Se esta zona é negativa, a espécie bacteriana testada não é o *M. leprae* e a amostra não pode ser avaliada com este teste. Quando todas as bandas WT são detectadas e todas as bandas MUT não são detectadas a amostra é considerada sensível ao fármaco analisado. Por outro lado, quando há hibridização com uma sonda mutante e ausência de hibridização com a sonda selvagem correspondente, a amostra é considerada resistente.

Pode ocorrer também a ausência de hibridação de uma amostra, tanto com as sondas mutantes quanto com as sondas selvagens correspondentes. Isso pode se tratar de uma alteração diferente daquelas mutações detectadas pelo teste. Neste tipo de situação, a mutação é denominada inferida. Caso haja hibridização da amostra com uma sonda mutante e com uma sonda selvagem correspondente, a amostra pode representar uma população heterogênea de bactérias (heterorresistência) ou uma infecção mista por isolados com diferentes perfis de sensibilidade.

FIGURA 16 – FICHA MODELO PARA INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS



FONTE: GENOTYPE LEPRAE DR, 2018.

5.8.4 Sequenciamento de Sanger

Para sequenciamento dos genes *folP1*, *rpoB* e *gyrA* das amostras dos participantes deste estudo, utilizou-se como moldes os produtos de amplificação da nested qPCR de cada alvo, uma vez que se espera uma maior quantidade dos fragmentos de interesse na Nested. Devido a resultados insatisfatórios para o Nested do gene *folP1*, o sequenciamento deste alvo foi feito também a partir da primeira reação de qPCR. O SYBR presente nos produtos de qPCR não interfere significativamente no sequenciamento pois utiliza-se pouco volume deste produto nas reações, além de diluí-lo, resultando em baixa concentração. Ainda, no sequenciamento as fitas estão desnaturadas (a fluorescência emitida pelo SYBR está presente em fitas duplas) e há degradação deste fluoróforo durante as etapas de reação, reduzindo ainda mais possíveis interferências, as quais são reconhecidas como background pelo equipamento. Conforme descrito por Camargo *et al.*, (2022), produtos de qPCR de High Resolution Melting (HRM) também foram usados para sequenciamento Sanger sem interferência significativa do fluoróforo intercalante.

Para a reação, 5 µL do produto de qPCR foram purificados com *ExoSAP-IT PCR Product Cleanup Reagent* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) a 37°C por 5 min. Para cada gene, uma reação de sequenciamento foi preparada usando 3 µL de produto de qPCR purificado, 0,3 µM de cada primer separadamente (unidirecional) e BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, Estados Unidos) seguindo as instruções do fabricante (Tabelas 5 e 6). As análises de sequenciamento foram realizadas em um ABI 3500 Genetic Analyzer, com o polímero POP7, capilar de 50 cm (Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, Estados Unidos).

TABELA 5 – PROTOCOLO DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DOS PRODUTOS DE PCR PURIFICADOS

Composição	Volume
BigDye™ Terminator 3.1 Ready Reaction Mix	4,0 µl
BigDye™ Terminator v1.1 & v3.1 5X Sequencing Buffer	2,0 µl
Forward primer (3.2 pMol)	3,2 µl
Reverse primer (3.2 pMol)	3,2 µl
Água RNase/DNase-free	5,6 µl
DNA Template	2,0 µl
Total	20 ul

FONTE: KIT BIGDYE™ TERMINATOR V3.1 CYCLE SEQUENCING

TABELA 6 – CONDIÇÕES DE CICLAGEM DAS REAÇÕES DE SEQUENCIAMENTO DOS PRODUTOS DE PCR PURIFICADOS

Número de Ciclos	Ciclos	Temperatura	Tempo
25	Incubação	96 °C	1 minuto
	Desnaturação	96 °C	10 segundos
	Anelamento	50 °C	5 segundos
	Alongamento	60 °C	4 minutos

FONTE: KIT BIGDYE™ TERMINATOR V3.1 CYCLE SEQUENCING

Após as reações de sequenciamento, os produtos foram purificados por meio do kit de purificação comercial chamado BigDye Xterminator de acordo com as instruções de uso do fabricante (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA). Este kit conta com 2 reagentes: beads e SAM solution. Foi feito um pré mix contendo 45 uL de SAM e 10 uL de beads. Depois, foi adicionado 55 uL desse Mix em um tubo com 10 uL da reação de sequenciamento (BigDye). Após, a mistura foi mantida em agitação vigorosa por 30 min.

Ao produto foi adicionado 12µL de formamida para desnaturação das fitas de DNA no termociclador, a 96°C, durante dois minutos, seguido de choque térmico no freezer -80°C durante 40 segundos, a fim de estabilizar as fitas separadas para seu sequenciamento pela metodologia de Sanger em sequenciador ABI3500 (Applied Biosystems).

As sequências obtidas foram analisadas usando o **Geneious® software** (Version 10.1.3) e comparadas com sequências referência no GenBank (National Center for Biotechnology Information, EUA).

5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise de dados tomou-se como base os procedimentos estatísticos previamente validados em estudos de precisão e abordados na revisão sistemática de Gurung., *et al.* (2019). O teste qui-quadrado (X^2) ou teste exato de Fisher foi usado para comparar variáveis categóricas. O teste t de Student foi utilizado para avaliar as relações das variáveis paramétricas (dados numéricos, como idade e índice bacilos cópico). O teste de McNemar ou Wilcoxon foram usados para dados pareados.

A sensibilidade foi calculada considerando a porcentagem de resultados positivos em indivíduos acometidos pela hanseníase, e a especificidade foi calculada

de acordo com a porcentagem de resultados negativos em indivíduos sem hanseníase. Para o cálculo da sensibilidade, avaliamos adicionalmente os subgrupos de participantes paucibacilares e multibacilares, separadamente. A construção de Forest plots das *Receiver Operating Characteristic Curves* (ROCs) foi realizada no Review Manager (RevMan) versão 5.3. (Copenhague, Nordic Cochrane Centre, Cochrane Collaboration, 2014). As curvas SROC foram ponderadas de acordo com os tamanhos das amostras. A significância estatística foi definida como $p < 0.05$ e pelo intervalo de confiança de 95%. Todos os testes foram realizados no software RStudio (Integrated Development Environment for R. RStudio, PBC, Boston, MA. URL <http://www.rstudio.com/>).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 ANÁLISE DEMOGRÁFICA

Foram incluídos no estudo 80 participantes conforme cálculo amostral, sendo 24 do sexo feminino e 56 do sexo masculino. Todos os dados aqui descritos estão sumarizados na TABELA 7. A média de idade da população foi de 45,56 anos (desvio padrão: 15,45) e sua maior parte reside no DF (49 – 61,25%). Para os demais, observou-se a contribuição dos estados vizinhos Goiás (20 - 25%), Minas Gerais (5 – 6,25%), Bahia (1 – 1,25%) e outros 5 sem domicílio definido (6,25%).

Dos participantes do estudo, 53 tiveram o diagnóstico de hanseníase enquanto os 27 restantes foram classificados como controles. De acordo com a classificação operacional, 47 indivíduos acometidos por hanseníase foram classificados como multibacilares e 6 como paucibacilares, enquanto de acordo com a classificação de Madrid Modificada, 25 indivíduos acometidos por hanseníase foram virchowianos, 27 borderline e 1 com hanseníase neural pura. Em relação a baciloscopia, 7 dos participantes acometidos por hanseníase apresentaram baciloscopia negativa e 16 tiveram índice baciloscópico (IB) abaixo de 2.

Não houve diferença significativa entre a distribuição de indivíduos dentro dos grupos hanseníase e controle tanto para sexo ($p=0,4701$) quanto para idade ($p=0,2016$).

Para o grupo controle, deu-se o seguinte diagnóstico: 11 leishmaniose tegumentar, 3 reações adversas a medicamentos, 2 micobacterioses não tuberculosas, 2 micoses subcutâneas, 2 linfomas cutâneos, 1 tuberculose cutânea, 1 hidradenite supurativa, 1 carcinoma espinocelular, 1 carcinoma basocelular, 1 tumor cutâneo benigno, 1 vasculite cutânea e 1 dermatite atópica.

TABELA 7 – CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E CLÍNICAS DOS PARTICIPANTES INCLUÍDOS NO ESTUDO.

	Hanseníase	Controle	-Valor de P
Sexo			
Feminino	14	10	0,470*
Masculino	39	17	
Média idade (desvio)	43,94 (14,96)	48,84 (16,21)	0,202 #
Classificação Operacional			
Multibacilar	47		
Paucibacilar	6		
Classificação Madrid			
Virchowiana	25		
Borderline	27		
Neural	1		
Índice Baciloscópico (IB)	2,97 (1,72)		
Baciloscopia Negativa	7	27	
Índice Baciloscópico < 2+	16		

Legenda: *valor de significância obtido por meio do teste Fisher; # valor de significância obtido por meio do teste t de Student.

6.2 DIAGNÓSTICO DA HANSENÍASE

A baciloscopia, exame utilizado neste estudo para definição dos casos de hanseníase junto a avaliação clínica dermatológica, apresentou acurácia de 0,87 (IC95% = 0,83 – 0,96), sensibilidade de 0,87 (IC95% = 0,75 – 0,95) e especificidade de 1,00 (IC95% = 0,87 – 1,00) na detecção da hanseníase. A acurácia acima do esperado (geralmente em torno de 50%) para esta técnica deve-se ao Ambulatório de Hanseníase do Serviço de Dermatologia da UNB receber pacientes em estágios avançados, os quais apresentam maior quantidade de bacilos em suas amostras. De acordo com as diretrizes metodológicas de estudos de precisão diagnóstica, a melhor condição de acurácia e sensibilidade obtidos para a baciloscopia, melhora artificialmente as propriedades de precisão desse estudo e não pode ser comparado diretamente aos testes índice (BRASIL, 2014; BRASIL, 2022b).

Teste índice é aquele que tem seu desempenho avaliado, neste trabalho são: ensaio molecular GenoType LepraeDR®, os métodos comparativos qPCR e Nested-qPCR e o sequenciamento para verificação da presença de mutações. Qualquer comparação de testes índice e baciloscopia é meramente informativa.

A proposta de verificação de um teste índice pode incluir diferentes tecnologias ou alguma alternativa menos invasiva ou mais barata que o teste de referência. O teste índice pode auxiliar na triagem da doença, na substituição do padrão de referência ou ser um teste adicional ao padrão ouro (BRASIL, 2014).

Neste contexto, a tecnologia de PCR e qPCR estão em foco, sendo discutidas em estudos como ferramentas potenciais para melhora da acurácia diagnóstica, ainda que apresentem limitações quanto a sensibilidade, principalmente para casos paucibacilares, e especificidade, de acordo com o alvo escolhido para detecção do *M. leprae* (AZEVEDO *et al.*, 2017; BARBIERI *et al.*, 2019; MARTINEZ *et al.*, 2006). O Teste Molecular GenoType LepraeDR® foi proposto neste estudo como ensaio adicional, visando melhora da acurácia do padrão atual de testagem e ampliação de acesso a ferramentas que permitam a verificação de presença do *M. Leprae* e de suas resistências medicamentosas.

Para avaliação da acurácia diagnóstica, os desfechos são limitados aos parâmetros que avaliam esse desempenho, sendo a relação entre os resultados do teste índice e o estado da doença (se presente ou ausente) incluindo o número de verdadeiros positivos (aqueles que têm a doença e o teste foi positivo), falso positivos (aqueles que não têm a doença, mas o teste índice foi positivo), falso negativos (aqueles que têm a doença, mas o teste índice foi negativo) e os verdadeiros negativos (aqueles que não têm a doença e o teste foi negativo). A partir desses dados calculou-se para o teste índice Molecular GenoType LepraeDR®, bem como para os alvos detectados por meio de qPCR e nested qPCR a sensibilidade, a especificidade e a acurácia diagnóstica (TABELA 8).

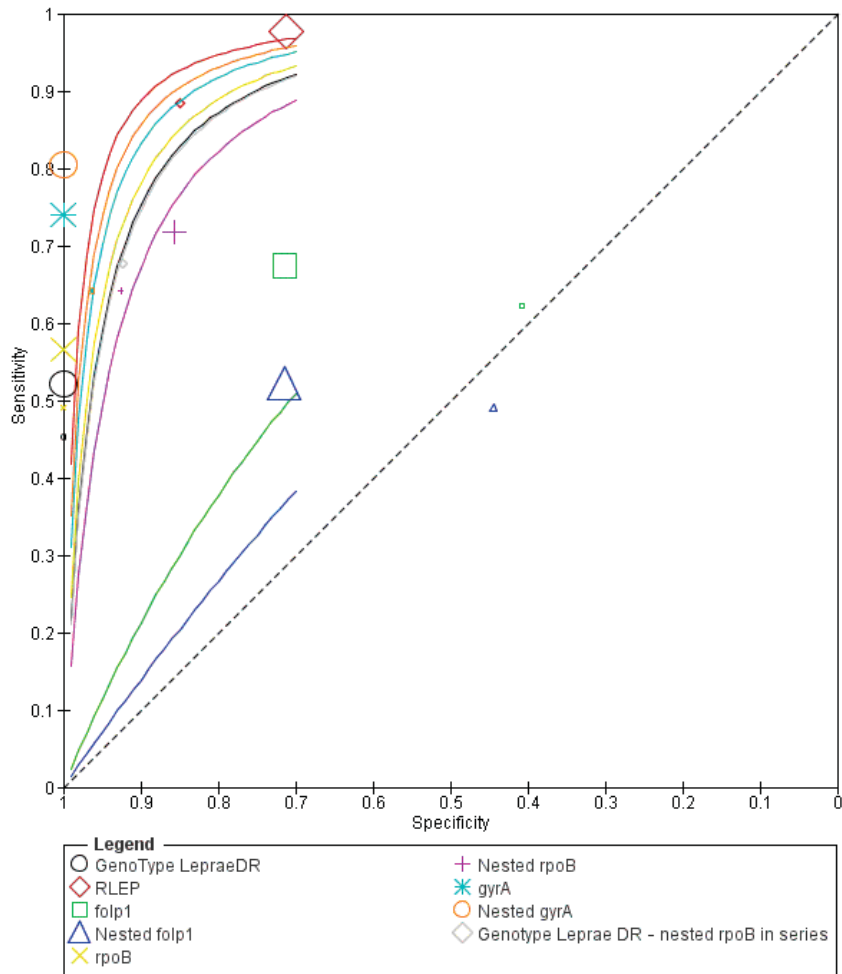
TABELA 8. SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE, ACURÁCIA E SEUS RESPECTIVOS INTERVALOS DE CONFIANÇA (95% IC) PARA CADA TESTE INCLUÍDO NO ESTUDO PARA O DIAGNÓSTICO DE HANSENÍASE

	Sensibilidade n+ / n Casos Hanseníase	Especificidade n- / n Casos Controle	Acurácia (IC 95%)
GenoType LepraeDR®	0,45 24/53 (0,32-0,76)	1,00 27/27 (0,87-1,00)	0,64 (0,52-0,74)
<i>RLEP</i>	0,89 47/53 (0,77-0,96)	0,85 23/27 (0,66-0,96)	0,88 (0,78-0,94)
<i>folP1</i>	0,62 33/53 (0,48-0,75)	0,41 11/27 (0,22-0,61)	0,55 (0,43-0,66)
<i>Nested folP1</i>	0,49 26/53 (0,35-0,63)	0,44 12/27 (0,25-0,65)	0,47 (0,36-0,59)
<i>rpoB</i>	0,49 26/53 (0,35-0,63)	1,00 27/27 (0,87-1,00)	0,66 (0,55-0,76)
<i>Nested rpoB</i>	0,64 34/53 (0,50-0,77)	0,93 25/27 (0,76-0,99)	0,74 (0,63-0,83)
<i>gyrA</i>	0,64 34/53 (0,50-0,77)	0,96 26/27 (0,81-1,00)	0,75 (0,64-0,84)
<i>Nested gyrA</i>	0,64 34/53 (0,50-0,77)	0,96 26/27 (0,81-1,00)	0,75 (0,64-0,84)
GenoType LepraeDR® – nested <i>rpoB</i> in series	0,68 36/53 (0,54-0,80)	0,93 25/27 (0,76-0,99)	0,76 (0,65-0,85)

LEGENDA: n = número de participantes; n+ = número de participantes com teste positivo; IC = intervalo de confiança

A figura 17 apresenta a visualização gráfica por meio de curvas ROC da relação dos dados de especificidade (eixo X) e sensibilidade (eixo Y) para os testes índices avaliados neste estudo.

FIGURA 17. GRÁFICOS ROC MOSTRANDO O DESEMPENHO DE CADA TESTE ÍNDICE.



LEGENDA: Os símbolos menores representam a avaliação da população total (casos de hanseníase e controles) enquanto os símbolos maiores representam a detecção de participantes multibacilares apenas nos casos de hanseníase.

Dentre os ensaios avaliados acima, o teste Molecular GenoType LepraeDR® e a qPCR do alvo *rpoB* foram os únicos capazes de chegar a 100% de especificidade diagnóstica. A maior capacidade de detecção do *M. Leprae* foi obtida por meio de qPCR do alvo de *RLEP* (acurácia = 0,88, IC 95% = 0,78-0,94), porém este teste exibiu uma redução de 15% em especificidade quando comparada ao GenoType LepraeDR® e alvo *rpoB*. Devido a isso, mesmo com alta sensibilidade, o uso do alvo *RLEP* na identificação de indivíduos acometidos por hanseníase poderia levar ao tratamento de indivíduos falso positivos, ou seja, indivíduos sem hanseníase poderiam receber tratamento se apenas esse alvo fosse considerado na definição de caso. O manejo terapêutico incorreto expõe indivíduos saudáveis ao

uso desnecessário da PQT-U e aos seus possíveis efeitos colaterais, como: problemas digestivos, anemia hemolítica, metemoglobinemia, hepatites, neuropatia motora periférica, fotodermatite, cefaleia, insuficiência respiratória, insuficiência renal e ressecamento da pele (SOUZA *et al.*, 2019). Dessa forma, a especificidade no diagnóstico é de grande importância para definição terapêutica assertiva, bem como para o direcionamento de recursos pelo estado.

A sequência *RLEP*, localizada várias vezes ao longo do genoma do *M. leprae*, mostra-se mais sensível quando comparada a outros alvos de cópia única como *Ag85B*, *sodA* e *16S rRNA* (AZEVEDO *et al.*, 2017). Truman *et al.* (2018), Azevedo *et al.* (2017) e Breat *et al.* (2018) indicaram alta especificidade para *RLEP* utilizando SYBR Green ou TaqMan®. No entanto, devido à possível presença de sequências *RLEP* homólogas em micobactérias não identificadas, não cultiváveis ou pouco estudadas intimamente relacionadas ao *M. leprae*, as altas especificidades encontradas para este alvo mostram-se provisórias e por isso a elevada sensibilidade deve ser interpretada com cautela (BRAET *et al.*, 2018; BRASIL, 2021d). Além disso, testes falsos positivos para os alvos de *RLEP* são descritos na literatura e podem ocorrer por amplificação inespecífica, ou pela detecção de fragmentos de DNA em indivíduos infectados pelo *M. leprae*, mas que não desenvolveram a doença (ANDRADE *et al.*, 2021).

Dentre os alvos de qPCR, o nested *rpoB* (acurácia = 0,74; IC 95% = 0,63-0,83), o *gyrA* (acurácia = 0,75; IC 95% = 0,64-0,84) e o nested *gyrA* (acurácia = 0,75; IC 95% = 0,64-0,84) apresentaram acurácias estatisticamente semelhantes e mostraram os melhores valores para os genes avaliados. Porém, assim como o alvo *RLEP*, esses testes não foram 100% específicos, o que gera uma limitação em sua aplicação na definição de casos de hanseníase.

Levando-se em conta as qualidades e limitações de cada teste e a atual necessidade do diagnóstico molecular da hanseníase e da ampla vigilância de resistência à rifampicina, nossa equipe simulou o uso de um protocolo em série com o objetivo de melhorar as propriedades de sensibilidade e especificidade diagnóstica (FRANCO, 2016). Este protocolo compreende a triagem inicial de hanseníase usando o teste Molecular GenoType LepraeDR® em todos os indivíduos com suspeita de hanseníase, seguido pelo uso de qPCR nested *rpoB* apenas em indivíduos que apresentaram resultado negativo para o teste GenoType LepraeDR®. Do ponto de vista técnico, essa estratégia mostra-se interessante devido a

especificidade de 100% do GenoType LepraeDR®, a qual garante assertividade no rastreio daquelas amostras que apresentaram quantidade suficiente de bacilos para atingir o limite de sensibilidade do produto, além disso, o uso do GenoType permite a investigação de resistências já nesta etapa. Como adicional, para melhora da sensibilidade do teste e visando reduzir falsos negativos, sugere-se o uso sequencial de nested qPCR para *rpoB*, obtendo-se melhor performance do ensaio (acurácia = 0,76; IC 95% = 0,65-0,85; sensibilidade = 0,68; IC 95% = 0,54-0,80; especificidade = 0,93; IC 95% = 0,76 -0,99) (TABELA 8) (FIGURA 18).

De acordo com o relatório de recomendação da CONITEC, outra vantagem da implementação do ensaio GenoType LepraeDR® é a possibilidade de execução de um maior número de testes, em maior número de laboratórios, junto da avaliação simultânea de resistência aos três fármacos mencionados acima, além da rápida e fácil interpretação dos resultados (BRASIL, 2021c). Para uso e implementação da estratégia em série no sistema de saúde, seria necessário registro ANVISA da qPCR nested *rpoB*.

A fim de avaliarmos a diferença de performance do ensaio comercial GenoType LepraeDR® e alvos de qPCR e nested qPCR, a figura 18 apresenta os valores de sensibilidade, especificidade e Forest plots para todos os testes considerando o diagnóstico de hanseníase e a detecção de casos multibacilares. Para os esfregaços positivos e negativos dos participantes acometidos com hanseníase, *1-especificidade* representa a sensibilidade de cada teste na detecção de casos paucibacilares.

FIGURA 18. SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE E FOREST PLOT PARA OS ENSAIOS DIAGNÓSTICOS DA HANSENÍASE E DETECÇÃO DOS CASOS MULTIBACILARES

GenoType LepraDR

Study	TP	FP	FN	TN	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)
Positive and negative SSS leprosy patients	24	0	22	7	0.52 [0.37, 0.67]	1.00 [0.59, 1.00]		
Total Population	24	0	29	27	0.45 [0.32, 0.60]	1.00 [0.87, 1.00]		

RLEP

Study	TP	FP	FN	TN	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)
Positive and negative SSS leprosy patients	45	2	1	5	0.98 [0.88, 1.00]	0.71 [0.29, 0.96]		
Total Population	47	4	6	23	0.89 [0.77, 0.96]	0.85 [0.66, 0.96]		

folp1

Study	TP	FP	FN	TN	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)
Positive and negative SSS leprosy patients	31	2	15	5	0.67 [0.52, 0.80]	0.71 [0.29, 0.96]		
Total Population	33	16	20	11	0.62 [0.48, 0.75]	0.41 [0.22, 0.61]		

Nested folp1

Study	TP	FP	FN	TN	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)
Positive and negative SSS leprosy patients	24	2	22	5	0.52 [0.37, 0.67]	0.71 [0.29, 0.96]		
Total Population	26	15	27	12	0.49 [0.35, 0.63]	0.44 [0.25, 0.65]		

rpoB

Study	TP	FP	FN	TN	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)
Positive and negative SSS leprosy patients	26	0	20	7	0.57 [0.41, 0.71]	1.00 [0.59, 1.00]		
Total Population	26	0	27	27	0.49 [0.35, 0.63]	1.00 [0.87, 1.00]		

Nested rpoB

Study	TP	FP	FN	TN	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)
Positive and negative SSS leprosy patients	33	1	13	6	0.72 [0.57, 0.84]	0.86 [0.42, 1.00]		
Total Population	34	2	19	25	0.64 [0.50, 0.77]	0.93 [0.76, 0.99]		

gyrA

Study	TP	FP	FN	TN	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)
Positive and negative SSS leprosy patients	34	0	12	7	0.74 [0.59, 0.86]	1.00 [0.59, 1.00]		
Total Population	34	1	19	26	0.64 [0.50, 0.77]	0.96 [0.81, 1.00]		

Nested gyrA

Study	TP	FP	FN	TN	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)
Positive and negative SSS leprosy patients	37	0	9	7	0.80 [0.66, 0.91]	1.00 [0.59, 1.00]		
Total Population	34	1	19	26	0.64 [0.50, 0.77]	0.96 [0.81, 1.00]		

Genotype Lepra DR - nested rpoB in series

Study	TP	FP	FN	TN	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)
Total Population	36	2	17	25	0.68 [0.54, 0.80]	0.93 [0.76, 0.99]		

LEGENDA: SSS = esfregaços de pele de fenda (baciloscopia); TP = verdadeiro positivo; FP = falso positivo; FN = falso negativo; TN = verdadeiro negativo; CI = intervalo de confiança.

A taxa de prevalência da hanseníase entre os contatos domiciliares é um importante indicador epidemiológico do caráter e tendência da doença, entretanto, o diagnóstico de pacientes paucibacilares continua sendo um desafio devido a

acurácia dos produtos disponíveis no mercado. Em estudo de Swain, Mishra e Jena (2004), famílias de 400 casos primários foram estudadas para detecção de casos de contato (secundários). Em 54 famílias foram detectados 72 casos, sendo 58 destes paucibacilares. Ainda que poucos tenham tido origem de contatos primários paucibacilares, sua ocorrência indica potencial fonte de infecção. De acordo com revisão realizada por Bratschi *et al.* (2015), estudos relatam que o tamanho da casa, caráter socioeconômico, incluindo sanitização, educação e situação nutricional, são fatores de riscos adicionais que favorecem a transmissão do *M. leprae*, além da presença do patógeno no meio ambiente e em animais. Além disso, pacientes paucibacilares contribuem para o sucesso global do patógeno, sendo importante desenvolver um programa de vigilância para contatos de pacientes com hanseníase, pois a detecção precoce e o tratamento de contatos são importantes para reduzir o reservatório de infecção na comunidade (SWAIN, MISHRA E JENA, 2004).

Como esperado, em nossos resultados todos os testes tiveram melhor desempenho em participantes multibacilares (TABELA 9 e FIGURA 19), especialmente naqueles com índice baciloscópico maior ou igual a 2+. Isso vai ao encontro do que vem sendo recomendado em estudos com sequenciamento gênico convencional e na instrução de uso dos produtos comerciais, os quais orientam o uso de material biológico multibacilar devido a difícil detecção em amostras de indivíduos paucibacilares (WHO, 2017; GENOTYPE LEPRADR, 2018).

O teste comercial GenoType LeptraeDR® não foi capaz de detectar as amostras paucibacilares (baciloscopia negativa) deste estudo. Nossos dados mostram que a difícil amplificação do DNA em amostras de indivíduos com baixo índice baciloscópico é uma limitação inerente aos métodos moleculares, levando a resultados falso negativos devido a sensibilidade dos testes não ser capaz de detectar o *M. leprae* presente na amostra destes indivíduos. Ainda assim, estes ensaios são ferramentas úteis de apoio aos profissionais da saúde no diagnóstico da hanseníase, pois ampliam a capacidade de detecção daqueles com IB maior ou igual a 2+. A tabela 9 apresenta a sensibilidade de cada teste de índice considerando-se baciloscopias positivas e negativas.

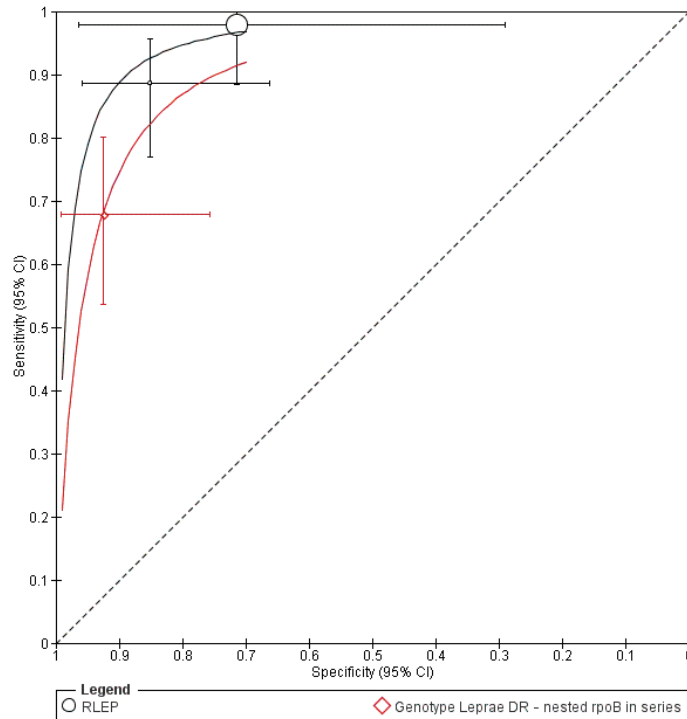
TABELA 9. SENSIBILIDADE DE CADA TESTE DE ÍNDICE NA IDENTIFICAÇÃO DE PARTICIPANTES COM ESFREGAÇOS CUTÂNEOS POSITIVOS E NEGATIVOS.

	IB médio (DP) em exames positivos	IB médio (DP) em exames negativos	Sensibilidade n+ / n SSS positiva (IC)	Sensibilidade n+ / n SSS negativa
GenoType LepraeDR®	3,88 (0,92)	2,22 (1,88)	0,52 24/46 0,37-0,67)	0,00 0/7 (0,00-0,41)
<i>RLEP</i>	3,25 (1,49)	0,75 (1,83)	0,98 45/46 (0,88-1,00)	0,29 2/7 (0,04-0,71)
<i>folP1</i>	3,33 (1,55)	2,37 (1,85)	0,67 31/46 (0,52-0,80)	0,29 2/7 (0,04-0,71)
<i>Nested folP1</i>	3,18 (1,68)	2,77 (1,76)	0,52 24/46 (0,37-0,67)	0,29 2/7 (0,04-0,71)
<i>rpoB</i>	3,42 (1,29)	2,54 (1,98)	0,57 26/46 (0,41-0,71)	0,00 0/7 (0,00-0,41)
<i>Nested rpoB</i>	3,41 (1,46)	2,19 (1,91)	0,72 33/46 (0,57-0,84)	0,14 1/7 (0,00-0,58)
<i>gyrA</i>	3,53 (1,39)	1,98 (1,83)	0,74 34/46 (0,59-0,86)	0,00 0/7 (0,00-0,41)
<i>Nested gyrA</i>	3,47 (1,39)	1,83 (1,89)	0,80 37/46 (0,66-0,91)	0,00 0/7 (0,00-0,41)

LEGENDA: n = número de participantes; n+ = número de participantes com teste positivo; SSS = esfregaços de pele de fenda (baciloscopia); IB = índice baciloscópico; DP = desvio padrão; IC = intervalo de confiança.

Voltando-se para os dados de acurácia encontradas neste estudo, a figura 19 mostra o desempenho das 2 estratégias que alcançaram a melhor acurácia junto com seus respectivos intervalos de confiança (IC). Conforme discutido anteriormente, o *RLEP* foi o alvo de qPCR com maior acurácia diagnóstica, porém com especificidade de 85%, enquanto o protocolo em série com o teste Molecular GenoType LepraeDR® + qPCR nested *rpoB* resultou na maior acurácia diagnóstica por meio da associação de ambos os testes, bem como permite o monitoramento de resistência a rifampicina ao avaliar as amostras no GenoType LepraeDR®.

FIGURA 19. CURVA ROC MOSTRANDO O DESEMPENHO DAS DUAS ESTRATÉGIAS DE MELHOR ACURÁCIA.



LEGENDA: Os símbolos menores representam a avaliação da população total (casos de hanseníase e controles) enquanto os símbolos maiores representam a detecção de participantes multibacilares apenas nos casos de hanseníase.

Apesar de alta sensibilidade para o *RLEP*, a estratégia em série mostra-se vantajosa devido a sua especificidade aumentada e sua contribuição no monitoramento de resistência à rifampicina.

Visando implementação, torna-se necessário registro ANVISA para os ensaios que compõem a estratégia em série. Com isso, estes testes poderiam ser utilizados no apoio ao diagnóstico e no controle epidemiológico da doença.

6.3 MONITORAMENTO DE RESISTÊNCIAS MEDICAMENTOSAS

Para o monitoramento de resistências, as amostras foram avaliadas por meio de sequenciamento Sanger e do teste GenoType LepraeDR®. Devido às limitações financeiras, das amostras de qPCR positivas para *M. leprae*, foram sequenciadas 26 para *gyrA*, 37 para *rpoB* e 38 para *folP1*.

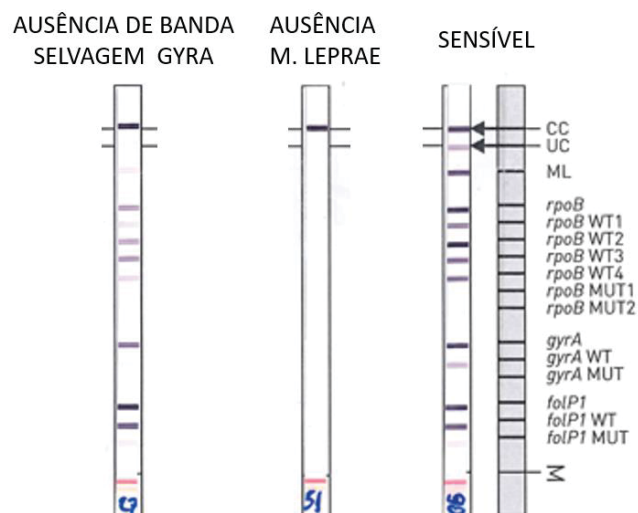
Para as 26 amostras *gyrA* positivas, 19 apresentaram uma mutação silenciosa (297C>T) no sequenciamento. Ao analisar as fitas correspondentes do teste comercial, 5 tiveram o *M. leprae* não detectado e 3 tiveram desaparecimento da banda selvagem e ausência de banda mutante, indicando presença de mutação, entretanto não daquelas detectadas pelo produto e 11 mostraram-se sensíveis (com presença da banda selvagem) (TABELA 10 e FIGURA 20). Estes dados mostram-se concordantes com o resultado de sequenciamento, visto que a mutação contemplada na fita GenoType não foi detectada no Sanger.

TABELA 10 – AMOSTRAS SEQUENCIADAS PARA O GENE *GYRA* E SEUS ACHADOS FRENTE A ANÁLISE NO TESTE MOLECULAR GENOTYPE LEPRAE DR®.

	N	Sanger: Mutações identificadas	GenoType LepraeDR®: mutações identificadas
<i>gyrA</i>	26	19 (297C>T) = silenciosa	5 - Ausência de detecção de <i>M. leprae</i> . 3 - Ausência da banda selvagem e da banda mutante. 11- Sensíveis: presença de banda selvagem.

Legenda: Achados no sequenciamento Sanger frente ao teste molecular GenoType LepraeDR®. Ausência de *M. leprae*: ausência da banda ML. Sensível: Presença da banda selvagem para o alvo de interesse.

FIGURA 20. FITAS GENOTYPE LEPRAE DR® - DEMONSTRAÇÃO DAS TRÊS CONDIÇÕES DESCRITAS PARA AS AMOSTRAS AVALIADAS EM SEQUENCIAMENTO DO ALVO *GYRA*.



FONTES: FITA OBTIDA A PARTIR DO ENSAIO GENOTYPE LEPRAE DR®.

LEGENDA: SENSÍVEL: presença da banda selvagem para o alvo de interesse. AUSÊNCIA DE *M. LEPRAE*: ausência da banda ML. AUSÊNCIA DA BANDA SELVAGEM *gyrA*: ausência da banda *gyrA* WT.

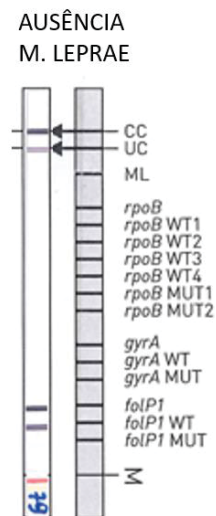
Para as 37 amostras *rpoB*, apenas 1 apresentou mutação silenciosa no sequenciamento (1386T>C), dupla população. Ao analisar sua fita correspondente, não houve detecção de *M. leprae* (ausência - banda ML) (TABELA 11 e FIGURA 21).

TABELA 11 – AMOSTRAS SEQUENCIADAS PARA O GENE *RPOB* E SEUS ACHADOS FRENTE A ANÁLISE NO TESTE MOLECULAR GENOTYPE LEPRADR®

	N	Sanger: Mutações identificadas	GenoType LepraeDR®
<i>rpoB</i>	37	1 (1386T>C) = silenciosa	Ausência de <i>M. leprae</i> nesta amostra

Legenda: Achados no sequenciamento Sanger frente ao teste molecular GenoType LepraeDR®. Ausência de *M. leprae*: ausência da banda ML. Presença de banda no alvo *folP1* devido a este ser comum em micobactérias saprófitas.

FIGURA 21. FITA GENOTYPE LEPRADR® CORRESPONDENTE A AMOSTRA COM MUTAÇÃO SILENCIOSA DE ACORDO COM O SEQUENCIAMENTO DO ALVO *RPOB*.



FONTE: RESULTADO OBTIDO A PARTIR DO ENSAIO GENOTYPE LEPRADR®.

LEGENDA: AUSÊNCIA DE *M. LEPRAE*: ausência da banda ML.

OBS.: Presença de banda no alvo *folP1* devido a este ser comum em micobactérias saprófitas.

Para as 38 amostras *folP1*, 6 apresentaram mutações silenciosas, sendo 5 em 288G>A e 1 em 300C>T. Além destas, 6 apresentaram alteração de aminoácido e dupla população, sendo 2 em p.75E>G, 1 em p.88T>M, 1 em p.94R>Q, 1 em p.97L>M e 1 em p.101T>A. Ao analisar suas fitas correspondentes, 10 destas foram

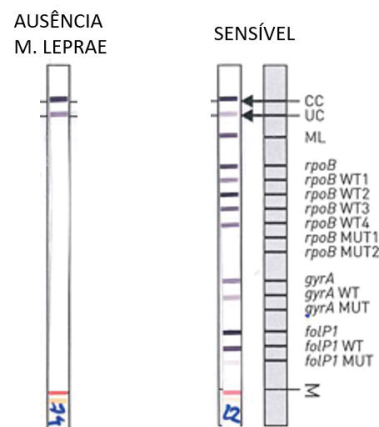
sensíveis e 2 mostraram ausência do *M. leprae* (ausência da banda ML) (TABELA 12 e FIGURA 22).

TABELA 12 – AMOSTRAS SEQUENCIADAS PARA O GENE *FOLP1* E SEUS ACHADOS FRENTE A ANÁLISE NO TESTE MOLECULAR GENOTYPE LEPRÆDR®.

	N	Sanger: Mutações identificadas	Alterações de aminoácidos	GenoType LepræDR®
<i>Folp1</i>	38	5 (288G>A) 1 (300C>T) = silenciosa	2 em p.75E>G 1 em p.88T>M 1 em p.94R>Q 1 em p.97L>M 1 em p.101T>A	2 - Ausência de detecção de <i>M. leprae</i> . 10 - Sensível: presença de banda selvagem.

Legenda: Achados sequenciamento Sanger frente ao teste molecular GenoType LepræDR® (fitas reais obtidas a partir do ensaio). Ausência de *M. leprae*: ausência da banda ML.

FIGURA 22. FITAS GENOTYPE LEPRÆDR® - DEMONSTRAÇÃO DAS DUAS CONDIÇÕES DESCRITAS PARA AS AMOSTRAS AVALIADAS EM SEQUENCIAMENTO DO ALVO *FOLP1*.



FONTE: FITA OBTIDA A PARTIR DO ENSAIO GENOTYPE LEPRÆDR®.

LEGENDA: AUSÊNCIA DE *M. LEPRÆ*: ausência da banda ML. SENSÍVEL: presença da banda selvagem para o alvo de interesse. OBS.: banda *folP1* MUT desconsiderada devido a intensidade ser inferior à intensidade da banda controle universal.

Nenhuma mutação nos genes alvos *folP1*, *rpoB* e *gyrA* relacionados à resistência medicamentosa na hanseníase foi detectada por qualquer uma das duas estratégias testadas (GenoType LepræDR® e sequenciamento gênico dos produtos de qPCR). A principal limitação do presente estudo reside na ausência de cepas resistentes de *M. leprae* para análise direta do desempenho dos testes índices no diagnóstico de resistência medicamentosa na hanseníase. Alternativamente, foram utilizados dados de acurácia diagnóstica para extrapolar a estimativa de desempenho dos testes no diagnóstico de resistências.

Além do exposto acima e de acordo com a literatura, conforme mencionado no relatório de recomendações CONITEC, o teste GenoType LepraeDR® mostra-se promissor na detecção de resistência. No estudo de Cambau *et al.*, (2010), foi obtida concordância total entre os resultados do teste GenoType LepraeDR® frente ao método referência coxim plantar de camundongo (14 amostras classificadas como resistentes a rifampicina e 77 sensíveis a esse fármaco, o que significou sensibilidade de 100% (77% - 100%; IC95%) e especificidade de 100% (95% - 100%; IC95%), bem como, no estudo de Cambau *et al.*, (2012), em que foi obtida concordância total entre os resultados do teste GenoType LepraeDR® frente ao método referência sequenciamento genético (16 amostras resistentes e 104 sensíveis a rifampicina, o que significou sensibilidade de 100% (79% - 100%; IC95%) e especificidade de 100% (97% - 100%; IC95%) (BRASIL, 2021c). Para maior conhecimento da capacidade de detecção de resistências pelo ensaio GenoType LepraeDR® em amostras brasileiras, sugere-se o aumento do número amostral investigado, bem como busca de amostras resistentes que contemplem as mutações investigadas por este produto, pois estas não estiveram presentes na amostra populacional deste estudo.

Em relação a viabilidade econômica, o relatório de recomendações CONITEC elaborou uma profunda análise do impacto orçamentário ao implementar o ensaio GenoType LepraeDR® no SUS, o qual representa um custo-minimização 31,26% menor em relação ao sequenciamento genético atualmente realizado. Já na análise de impacto orçamentário, mantendo-se os critérios atuais para investigação de resistência, estima-se redução de aproximadamente R\$ 3,4 milhões na alocação de recursos (BRASIL, 2021c). Em países onde múltiplos testes internos são inviáveis devido aos custos e devido às regulamentações locais, o protocolo em série proposto aqui mostra-se estrategicamente interessante para o diagnóstico da hanseníase e a detecção simultânea de suas resistências medicamentosas. Recomenda-se continuidade investigativa de sua acurácia na detecção de resistências.

7 CONCLUSÕES

- O teste Molecular GenoType LepraeDR® e a qPCR do alvo *rpoB* foram os únicos capazes de atingir 100% de especificidade diagnóstica.
- A performance do teste Molecular GenoType LepraeDR® foi semelhante ao qPCR do gene *rpoB* e foi mais específico e menos sensível que o *RLEP*, *folP1*, *nested rpoB*, *gyrA* e *nested gyrA*.
- A melhor acurácia foi alcançada com o teste *RLEP*, no entanto sua aplicação na identificação de indivíduos acometidos por hanseníase pode levar ao tratamento de indivíduos falso positivos devido sua especificidade de 85%.
- O protocolo em série, GenoType LepraeDR® seguido da qPCR *nested rpoB*, melhorou a acurácia do ensaio e mostrou-se uma estratégia prática e de possível execução, contribuindo no monitoramento de resistência à rifampicina.
- Corroborando com o descrito em literatura, os testes índice moleculares avaliados neste estudo não foram capazes de detectar de maneira efetiva amostras com índice baciloscópico igual ou inferior a 2+.
- Nenhuma mutação nos genes alvos *folP1*, *rpoB* e *gyrA* relacionados à resistência medicamentosa na hanseníase foi detectada pelas duas estratégias testadas (GenoType LepraeDR® e sequenciamento gênico).
- A principal limitação do presente estudo reside na ausência de cepas resistentes de *M. leprae*.
- Para maior conhecimento da capacidade de detecção de resistências pelo ensaio GenoType LepraeDR® em amostras brasileiras, sugere-se o aumento do número amostras investigado, bem como a busca em bancos por amostras resistentes que contemplem as mutações investigadas por este produto.

REFERÊNCIAS

1. ANDRADE, Vera. Implementação da PQT/OMS no Brasil. **Hansenologia Internationalis: hanseníase e outras doenças infecciosas**, v. 31, n. 1, p. 23-31, 2006.
2. ANDRADE, Elaine Silva Nascimento et al. A systematic review and meta-analysis of studies on the diagnostic accuracy and screening of tests to detect antimicrobial resistance in leprosy. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 100, n. 1, p. 115325, 2021.
3. ANDRADE, Elaine Silva Nascimento et al. Antimicrobial resistance among leprosy patients in Brazil: real-world data based on the National Surveillance Plan. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 66, n. 5, p. e02170-21, 2022.
4. AZEVEDO, Michelle de Campos Soriani et al. qPCR detection of Mycobacterium leprae in biopsies and slit skin smear of different leprosy clinical forms. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 21, p. 71-78, 2017.
5. BARBIERI, Raquel R. et al. Quantitative polymerase chain reaction in paucibacillary leprosy diagnosis: A follow-up study. **PloS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 3, p. e0007147, 2019.
6. BRAET, S. et al. The repetitive element RLEP is a highly specific target for detection of Mycobacterium leprae. **Journal of clinical microbiology**, v. 56, n. 3, p. 10.1128/jcm. 01924-17, 2018.
7. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Guia de Procedimentos Técnicos Baciloscopia em Hanseníase**. 2010. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicações/guia_procedimentos_tecnicos_corti_costeroides_hanseniaze.pdf. Acesso em: 28 JAN 2023.
8. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Diretrizes Metodológicas: elaboração de revisão sistemática e metanálise de estudos de acurácia diagnóstica**. 1ª edição. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2014. 118 p. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes_metodologicas_estudos_acuracia_diagnostica.pdf. Acesso em: 08 JAN 2023.
9. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Diretrizes para vigilância, atenção e eliminação da Hanseníase como problema de saúde pública: manual técnico-operacional**. 2016. Disponível em: <http://biblioteca.cofen.gov.br/wp-content/uploads/2022/01/diretrizes-vigilancia-atencao-eliminacao-hanseniaze.pdf>. Acesso em: 22 JAN 2023.
10. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL. **Guia prático sobre a hanseníase**. 2017. Disponível em:

https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_pratico_hanseniose.pdf.

Acesso em: 20 DEZ 2022.

11. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL. SECRETARIA DE CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INSUMOS ESTRATÉGICOS. CONITEC. **Proposta de esquema terapêutico para o tratamento da hanseniose multidroga terapia única**. 2018. Disponível em: https://www.gov.br/conitec/pt-br/midias/consultas/relatorios/2018/relatorio_esquemamultidroga_terapiaunica_prahanseniose.pdf. Acesso em: 20 JAN 2023.
12. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Guia de vigilância em saúde**. 2019. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_3ed.pdf. Acesso em: 22 JAN 2023.
13. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE DOENÇAS CRÔNICAS E INFECÇÕES SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEIS. **Nota Técnica n.º 8/2020-CGDE/DCCI/SVS/MS**, de 6 de abril de 2020. Vigilância da resistência antimicrobiana em hanseniose. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2020b. Disponível em: <http://antigo.aids.gov.br/pt-br/legislacao/nota-tecnica-no-82020-cgdedccisvsmms>. Acesso em: 24 JAN 2020.
14. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE DOENÇAS DE CONDIÇÕES CRÔNICAS E INFECÇÕES SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEIS. COORDENAÇÃO-GERAL DE VIGILÂNCIA DAS DOENÇAS EM ELIMINAÇÃO. **NOTA TÉCNICA Nº 16/2021-CGDE/DCCI/SVS/MS**. 2021. Disponível em: https://www.conass.org.br/wp-content/uploads/2021/07/SEI_MS-0020845770-Nota-Te%CC%81cnica-16.pdf. Acesso em: 22 JAN 2023.
15. BRASIL. MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA, INOVAÇÃO E INSUMOS ESTRATÉGICOS EM SAÚDE. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Hanseniose**. 2021(b). Disponível em: http://telessaude.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2022/04/4.-Protocolo_Clinico-e-Diretrizes-Terapeuticas-da-Hanseniose.pdf. Acesso em: 22 JAN 2023.
16. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL. SECRETARIA DE CIÊNCIA, TECNOLOGIA INOVAÇÃO E INSUMOS ESTRATÉGICOS EM SAÚDE. CONITEC. **Relatório de recomendação nº 690**. 2021(c). Disponível em: http://antigo-conitec.saude.gov.br/images/Relatorios/2021/Relatorio_690_teste_molecular_hanseniose.pdf. Acesso em: 15 JAN 2023.
17. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. COMISSÃO NACIONAL DE INCORPORAÇÃO DE TECNOLOGIAS DO SUS. **Relatório de Recomendação – Teste de detecção molecular qualitativa do *Mycobacterium leprae* para o diagnóstico de Hanseniose**. Brasília. 2021(d). Disponível em: http://antigo-conitec.saude.gov.br/images/Consultas/Relatorios/2021/20211119_Relatorio_teste_molecular_hanseniose_CP98.pdf. Acesso em: 20 abril. 2023

18. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Boletim Epidemiológico**. 2022. Acesso em: 20 JAN 2023.
19. BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Revisão Sistemática: Acurácia dos testes laboratoriais complementares para o diagnóstico precoce de hanseníase**. Brasília, 2022(b). Disponível em: https://docs.bvsalud.org/biblioref/2022/01/1353068/3-revisaosistemacaacuraciatesteslaboratoriaisdiagnosticohans_DPzMYQO.pdf. Acesso em: 10 MAR 2023.
20. BRATSCHI, Martin W. et al. Current knowledge on *Mycobacterium leprae* transmission: a systematic literature review. **Leprosy review**, v. 86, n. 2, p. 142-155, 2015.
21. BRITO, Maria de Fátima de Medeiros. **O retratamento em hanseníase: identificação de fatores de risco: um estudo caso controle**. 2004. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.
22. BUJANG, Mohamad Adam; ADNAN, Tassha Hilda. Requirements for minimum sample size for sensitivity and specificity analysis. **Journal of clinical and diagnostic research: JCDR**, v. 10, n. 10, p. YE01, 2016.
23. CAMBAU, Emmanuelle et al. Detection of antibiotic resistance in leprosy using GenoType LepraeDR, a novel ready-to-use molecular test. **Neglected Tropical diseases**. 2012.
24. CAMBAU, Emmanuelle et al. Antimicrobial resistance in leprosy: results of the first prospective open survey conducted by a WHO surveillance network for the period 2009–15. **Clinical microbiology and infection**, v. 24, n. 12, p. 1305-1310, 2018.
25. CAMBAU, Emmanuelle; WILLIAMS, Diana L. Anti-leprosy drugs: modes of action and mechanisms of resistance in *Mycobacterium leprae*. In: **International textbook on leprosy**. 2019.
26. CAMARGO, Ricardo et al. A sensitive and inexpensive high-resolution melting-based testing algorithm for diagnosis of transient abnormal myelopoiesis and myeloid leukemia of Down syndrome. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 69, n. 11, p. e29866, 2022.
27. CARVALHO, Wânia da Silva et al. Diagnóstico de resistência do *Mycobacterium tuberculosis* à rifampicina utilizando-se da reação em cadeia da polimerase. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, p. 31-38, 2007.

28. CARVALHO, Rafael Arrabaça de. **Avaliação do método de sequenciamento de nova geração no diagnóstico genético de neoplasia endócrina múltipla tipo 1**. 2016. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
29. CHEN, Xiaohua et al. Evaluation of antigen-specific immune responses for leprosy diagnosis in a hyperendemic area in China. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 9, p. e0006777, 2018.
30. CHEN, Kou-Huang et al. Leprosy: A review of epidemiology, clinical diagnosis, and management. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2022, 2022.
31. CORSTJENS, Paul LAM et al. Field-friendly test for monitoring multiple immune response markers during onset and treatment of exacerbated immunity in leprosy. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 23, n. 6, p. 515-519, 2016.
32. DIÓRIO, Suzana Madeira et al. Resistência a dapsona e rifampicina em *Mycobacterium leprae* isolado de pacientes portadores de hanseníase no Estado de São Paulo. **Hansenologia Internationalis: hanseníase e outras doenças infecciosas**, v. 30, n. 1, p. 9-14, 2005.
33. DUO FILHO, Valter Batista et al. *Mycobacterium leprae*: aspectos da resistência aos fármacos na poliquimioterapia. **Arq. Ciências saúde UNIPAR**, p. 79-85, 2021.
34. FISCHER, Marcellus. Leprosy—an overview of clinical features, diagnosis, and treatment. **JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 15, n. 8, p. 801-827, 2017.
35. FLEURY, Raul Negrão. Critérios para o emprego de classificação de Ridley e Jopling na rotina dos laboratórios de anatomia patológica (Primeira parte). **Hansenologia Internationalis: hanseníase e outras doenças infecciosas**, v. 30, n. 2, 2005.
36. FOSS, Norma Tiraboschi. Episódios reacionais na hanseníase. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 36, n. 2/4, p. 453-459, 2003.
37. FRANCO, Francesco; DI NAPOLI, Anteo. Evaluation of diagnostic tests in parallel and in series. **Giornale di Tecniche Nefrologiche e Dialitiche**, v. 28, n. 3, p. 212-215, 2016.
38. FROES JR, Luis Alberto Ribeiro; TRINDADE, Maria Angela Bianconcini; SOTTO, Mirian Nacagami. Immunology of leprosy. **International Reviews of Immunology**, v. 41, n. 2, p. 72-83, 2022.
39. JAMBEIRO, Jorge Eduardo de Schoucair et al. Avaliação da neurólise ulnar na neuropatia hanseniana. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 16, p. 207-213, 2008.

40. GAMA, Rafael Silva et al. A novel integrated molecular and serological analysis method to predict new cases of leprosy amongst household contacts. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 6, p. e0007400, 2019.
41. GAMA, Rafael Silva et al. Prospects for new leprosy diagnostic tools, a narrative review considering ELISA and PCR assays. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, 2020.
42. GOULART, Isabela Maria Bernardes; GOULART, Luiz Ricardo. Leprosy: diagnostic and control challenges for a worldwide disease. **Archives of dermatological research**, v. 300, p. 269-290, 2008.
43. GURUNG, P. et al. Diagnostic accuracy of tests for leprosy: a systematic review and meta-analysis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 11, p. 1315-1327, 2019.
44. GENOTYPE LEPRAEDR. [Bula]. LOCAL DE FABRICAÇÃO: ALEMANHA. HAIN LIFESCIENCE, 2018. Disponível em: https://mobiuslife.com.br/wp-content/uploads/2018/10/IU_LepraeDR_Rev.00.pdf. Acesso em: 20 JAN 2023.
45. HAIN [Catálogo geral]. LOCAL DE FABRICAÇÃO: ALEMANHA. HAIN LIFESCIENCE. 2022. Disponível em: <https://mobiuslife.com.br/wp-content/uploads/2018/04/hain.pdf#page=12>. Acesso em: 20 JAN 2023.
46. HAIN [Technic-brochure DNA•STRIP technology]. LOCAL DE FABRICAÇÃO: ALEMANHA. HAIN LIFESCIENCE. 2022a. Disponível em: https://www.hain-lifescience.de/uploadfiles/file/technologie/technik_eng.pdf. Acesso em: 05 FEV 2023.
47. HAIN E MOBIUS LIFE SCIENCE. Disponível em: <https://mobiuslife.com.br/wp-content/uploads/2022/09/material-tecnico-hain.pdf>. Acesso em: 11 FEV 2023.
48. LETURIONDO, André Luiz et al. Performance of serological tests PGL1 and NDO-LID in the diagnosis of leprosy in a reference Center in Brazil. **BMC infectious diseases**, v. 19, n. 1, p. 1-6, 2019.
49. LI, Xiang et al. Drug Resistance (Dapsone, Rifampicin, Ofloxacin) and Resistance-Related Gene Mutation Features in Leprosy Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 20, p. 12443, 2022.
50. MANTA, Fernanda SN et al. Quantitative PCR for leprosy diagnosis and monitoring in household contacts: A follow-up study, 2011–2018. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-8, 2019.

51. MARTINEZ, Alejandra 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. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, n. 9, p. 3154-3159, 2006.
52. MARTINEZ, Alejandra Nobrega et al. Evaluation of Qpcr-based assays for leprosy diagnosis directly in clinical specimens. **PloS neglected tropical diseases**, v. 5, n. 10, p. e1354, 2011.
53. MAYMONE, Mayra BC et al. Leprosy: Treatment and management of complications. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 83, n. 1, p. 17-30, 2020.
54. MI, Zihao; LIU, Hong; ZHANG, Furen. Advances in the immunology and genetics of leprosy. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 567, 2020.
55. MOREIRA, Wagner Brant et al. Leitura crítica de artigos científicos. São Paulo: **Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica**, p. 83-90, 2016.
56. NERY, Joilda Silva et al. Socioeconomic determinants of leprosy new case detection in the 100 Million Brazilian Cohort: a population-based linkage study. **The Lancet Global Health**, v. 7, n. 9, p. e1226-e1236, 2019.
57. NOBRE, Mauricio Lisboa et al. Multibacillary leprosy by population groups in Brazil: Lessons from an observational study. **PloS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 2, p. e0005364, 2017.
58. OLIVEIRA, Carolina Pinheiro Mendes Cahu de. **De lepra à hanseníase: mais que um nome, novos discursos sobre a doença e o doente 1950-1970**. 2012. Tese (Doutorado no Programa de Pós-Graduação em História), Universidade Federal de Pernambuco, CFCH., Recife-PE, 2012. Disponível em:
<https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/11000/1/Tese%20%20Carolina%20Pinheiro%20Mendes%20Cahu%20de%20Oliveira.pdf>. Acesso em: 15 JAN. 2023.
59. OPROMOLLA, Diltor Vladmir Araújo. Terapêutica da hanseníase. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 30, n. 3, p. 345-350, 1997.
60. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Guia para eliminação da hanseníase como problema de saúde pública**. 2000. Disponível em:
https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicações/brazil_guide.pdf. Acesso em: 20 DEZ 2022.
61. PAVANI, Rafael AB; TONOLLI, Emanuele R.; DAVILA, Solange CGP. Classificação histopatológica e correlação clínica de 50 casos de hanseníase

- diagnosticados em um hospital-escola, São José do Rio Preto, SP. InCID: **Revista de Ciência da Informação e Documentação**, v. 41, n. 2, p. 188-195, 2008.
62. PESCARINI, Julia Moreira et al. Socioeconomic risk markers of leprosy in high-burden countries: A systematic review and meta-analysis. **PloS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 7, p. e0006622, 2018.
 63. PLOEMACHER, Thomas et al. Reservoirs and transmission routes of leprosy; A systematic review. **PloS neglected tropical diseases**, v. 14, n. 4, p. e0008276, 2020.
 64. RIDLEY, D. S. et al. A classification of leprosy for research purposes. **Leprosy review**, v. 33, n. 2, p. 119-28, 1962.
 65. RIO DE JANEIRO. SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE. SUNIDADE DE ATENÇÃO PRIMÁRIA. SECRETARIA DE ATENÇÃO PRIMÁRIA, VIGILÂNCIA E PROMOÇÃO DA SAÚDE. SUPERINTENDÊNCIA DE ATENÇÃO PRIMÁRIA. **Hanseníase: manejo diagnóstico e terapêutico**. 1. Ed. Rio de Janeiro: SMS, 2020. 68 p. (Série F. Comunicação e Educação em Saúde) (Coleção Guia de Referência Rápida, n. 15) ISBN 978-85-86074-68-4.
 66. ROCHA, Bruno Garcia. **Desenvolvimento de metodologias para identificação molecular do HPV**. 2016. Tese de doutorado. Universidade Federal de São Carlos.
 67. SANTOS, Diogo Fernandes dos et al. Molecular, immunological and neurophysiological evaluations for early diagnosis of neural impairment in seropositive leprosy household contacts. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 5, p. e0006494, 2018.
 68. SANTOS, Fernando Sergio Dumas dos; SOUZA, Letícia Pumar Alves de; SIANI, Antonio Carlos. O óleo de chaulmoogra como conhecimento científico: a construção de uma terapêutica antileprótica. **História, Ciências, Saúde – Manguinhos**, Rio de Janeiro, v.15, n.1, p.29-47, jan.-mar. 2008.
 69. SARTORI, Priscila Verchai Uaska et al. Human genetic susceptibility of leprosy recurrence. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-5, 2020.
 70. SEVILHA-SANTOS, Lais; CERQUEIRA, Selma Regina Penha Silva; GOMES, Ciro Martins. Standardization of SYBR Green-Based Real-Time PCR through the evaluation of different thresholds for different skin layers: an accuracy study and track of the transmission potential of multibacillary and paucibacillary leprosy patients. **Frontiers in Microbiology**, p. 3757, 2021.
 71. SEVILHA-SANTOS, Lais et al. Sensitivity of different DNA extraction methods and PCR to detect resistance in patients with leprosy stratified by the bacilloscopic index. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 26, 2022.

72. SINGH, Pushpendra; COLE, Stewart T. *Mycobacterium leprae*: genes, pseudogenes and genetic diversity. **Future microbiology**, v. 6, n. 1, p. 57-71, 2011.
73. SOUZA, Álvaro Paulo Silva et al. Novas perspectivas do diagnóstico e tratamento da hanseníase. **Referências em Saúde da Faculdade Estácio de Sá de Goiás-RRS-FESGO**, v. 2, n. 2, 2019.
74. STEINMANN, Peter et al. A comprehensive research agenda for zero leprosy. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 9, n. 1, p. 1-7, 2020.
75. SWAIN, J. P.; MISHRA, S.; JENA, S. Prevalence of leprosy among household contacts of leprosy cases in western Orissa. **Indian journal of leprosy**, v. 76, n. 1, p. 19-29, 2004.
76. TALHARI, Carolina; TALHARI, Sinésio; PENNA, Gerson Oliveira. Clinical aspects of leprosy. **Clinics in dermatology**, v. 33, n. 1, p. 26-37, 2015.
77. TATIPALLY, Sushma; SRIKANTAM, Aparna; KASETTY, Sanjay. Polymerase chain reaction (PCR) as a potential point of care laboratory test for leprosy diagnosis—a systematic review. **Tropical medicine and infectious disease**, v. 3, n. 4, p. 107, 2018.
78. TRAVE, Ilaria et al. Novo método diagnóstico na hanseníase neural pura: raspagem da bainha de mielina. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 96, n. 3, p. 380-381, 2021.
79. TRUMAN, Richard W. et al. Enumeration of *Mycobacterium leprae* using real-time PCR. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 2, n. 11, p. e328, 2008.
80. VAN HOOIJ, Anouk et al. Evaluation of immunodiagnostic tests for leprosy in Brazil, China and Ethiopia. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2018.
81. W. Alemu Belachew and B. Naafs, “Position statement: leprosy: diagnosis, treatment and follow-up”. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, vol. 33, no. 7, pp. 1205–1213, 2019.
82. WILLIAMS, Diana L.; GILLIS, Thomas P. Drug-resistant leprosy: monitoring and current status. **Leprosy review**, v. 83, n. 3, p. 269-281, 2012.
83. WORLD HEALTH ORGANIZATION. A guide for surveillance for antimicrobial resistance in leprosy: 2017 update. **Regional Office for South-East Asia**, 2017. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/259357>. Acesso em: 06 JAN 2023.

84. WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **Guidelines for the diagnosis, treatment and prevention of leprosy**. 2018.
85. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO to publish first official guidelines on leprosy diagnosis, treatment and prevention**. 2018b. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/28-06-2018-who-to-publish-first-official-guidelines-on-leprosy-diagnosis-treatment-and-prevention>. Acesso em: 20 JAN 2023.
86. WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **Estratégia Global de Hanseníase 2021–2030– “Rumo à zero hanseníase”**. 2020.
87. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Health Assembly. Elimination of leprosy: resolution of the 44th World Health Assembly. Geneva: 1991.** (Resolution No WHA 44.9.). Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/175244/WHA44_R9_eng.pdf Acesso em: 15 DEZ. 2022.
88. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global leprosy update, 2020: impact of COVID-19 on global leprosy control. **Weekly Epidemiological Record**, Genebra, n. 36, p. 421-444, 10 set. 2021. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/who-wer9636-421-444> Acesso em: 17 MAR. 2023.

ANEXO 1 – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

UNB - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE BRASÍLIA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DETECÇÃO DA RESISTÊNCIA BACTERIANA À RIFAMPICINA, DAPSONA E OFLOXACINA EM PACIENTES HANSÊNICOS COM BAIXO ÍNDICE

Pesquisador: ELAINE FARIA MORELO

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 93119018.7.0000.5558

Instituição Proponente: EMPRESA BRASILEIRA DE SERVICOS HOSPITALARES - EBSERH

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.790.707

Apresentação do Projeto:

Por meio de um estudo transversal analítico de rastreio pretende-se detectar a presença ou não de mutações genéticas de resistência bacteriana à rifampicina, dapsona e ofloxacina em pacientes hansênicos com baixo índice baciloscópico.

Objetivo da Pesquisa:

Monitorar a incidência de alterações moleculares associadas à resistência do *M. Leprae* à rifampicina, dapsona e ofloxacina em pacientes com índice baciloscópico baixo atendidos no Hospital Universitário de Brasília – HUB além, de avaliar a presença de mutações genéticas entre isolados de *Mycobacterium leprae* de pacientes hansenianos; Detectar fatores clínicos que possam influenciar no desenvolvimento de resistência genética ou clínica ao esquema substitutivo contendo ofloxacina; e descrever fatores demográficos desta população.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos inerentes à pesquisa podem resultar do procedimento de biópsia incisional ou baciloscopia como dor, hematoma, sangramento e infecção. Os pesquisadores relatam que minimizarão este risco utilizando apenas amostras já coletadas para realização da identificação do agente etiológico por reação em cadeia da polimerase, exame de rotina no ambulatório de dermatologia e que não serão realizadas biópsias adicionais e sim processamento adicional de biópsia já coletada. Os benefícios do estudo consistem em melhor monitorização (molecular) do

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

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



Continuação do Parecer: 2.790.707

diagnóstico e do tratamento, bem como possível reconhecimento precoce de casos de falência terapêutica.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Considerando que pacientes com menor carga bacilar sejam de suma importância, uma vez que casos secundários de resistência bacteriana apresentarão recidivas ou recorrências com formas de doenças apresentando menor número de bacilos. A pesquisa mostra-se relevante por realizar o monitoramento da resistência bacteriana em pacientes com baixo índice baciloscópico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O projeto encontra-se bem instruído e de acordo com a resolução 466/12 do CNS com TCLE adequado, critérios de exclusão e inclusão e riscos e benefícios bem delineados.

Recomendações:

O parecer, salvo melhor juízo do colegiado, é pela aprovação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto apreciado na 5ª Reunião Ordinária do CEP-FM-UnB-2018. Após apresentação do parecer do (a) Relator (a), aberta a discussão para os membros do Colegiado. O projeto foi Aprovado.

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

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1129755.pdf	28/06/2018 08:42:05		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEElaineMorelo.pdf	28/06/2018 08:41:07	ELAINE FARIA MORELO	Aceito
Outros	CVJorgeth.pdf	28/06/2018	ELAINE FARIA	Aceito

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

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



Continuação do Parecer: 2.790.707

Outros	CVJorgeth.pdf	08:39:40	MORELO	Aceito
Outros	CVClaudiaMariaEscarabel.pdf	28/06/2018 08:39:21	ELAINE FARIA MORELO	Aceito
Outros	CVCiroMartinsGomes.pdf	28/06/2018 08:38:58	ELAINE FARIA MORELO	Aceito
Outros	CVElaineFariaMorelo.pdf	28/06/2018 08:38:31	ELAINE FARIA MORELO	Aceito
Outros	DeclaracaoResponsabilidadeElaineMorelo.pdf	28/06/2018 08:29:27	ELAINE FARIA MORELO	Aceito
Outros	CRONOGRAMA.docx	28/06/2018 08:26:39	ELAINE FARIA MORELO	Aceito
Outros	Planilhaorcamentaria.doc	28/06/2018 08:26:15	ELAINE FARIA MORELO	Aceito
Outros	CARTADEENCAMINHAMENTOElaineMorelo.pdf	28/06/2018 08:22:55	ELAINE FARIA MORELO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	ModeloTCLE.doc	28/06/2018 08:19:08	ELAINE FARIA MORELO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETOELAINE.docx	06/06/2018 21:27:46	ELAINE FARIA MORELO	Aceito
Outros	termodeciencia.pdf	06/06/2018 21:26:33	ELAINE FARIA MORELO	Aceito
Outros	Termodeconcordancia.pdf	06/06/2018 21:25:10	ELAINE FARIA MORELO	Aceito
Folha de Rosto	folhaassinada.pdf	06/06/2018 20:53:15	ELAINE FARIA MORELO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BRASILIA, 30 de Julho de 2018

Assinado por:
Florêncio Figueiredo Cavalcanti Neto
(Coordenador)

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