

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA**  
**PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E**  
**BIOLOGIA MOLECULAR**

**Marcos Daniel Silva Pinheiro**

**Perfil clínico, sociodemográfico e laboratorial dos indivíduos com suspeição diagnóstica de hanseníase atendidos no CREDEN-PES no período de 2017 a 2021.**

Governador Valadares

2022

**Marcos Daniel Silva Pinheiro**

**Perfil clínico, sociodemográfico e laboratorial dos indivíduos com suspeição diagnóstica de hanseníase atendidos no CREDEN-PES no período de 2017 a 2021.**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Juiz de Fora *campus* avançado Governador Valadares como requisito à obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientadora: Proa. Dra. Lucia Alves de Oliveira Fraga

Governador Valadares

2022

MARCOS DANIEL SILVA PINHEIRO

**Título:** Perfil clínico, sociodemográfico e laboratorial dos indivíduos com suspeição diagnóstica de hanseníase atendidos no CREDEN-PES no período de 2017 a 2021.

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular. Área de concentração: Bioquímica e Biologia Molecular.

Aprovada em 6 de maio de 2022.

BANCA EXAMINADORA

**Doutora Lucia Alves de Oliveira Fraga - Orientadora**  
Universidade Federal de Juiz de Fora - campus Governador Valadares

**Doutora Ida Maria Foschiani Dias Baptista**  
Instituto Lauro de Souza Lima - Faculdade de Medicina - UNESP

**Doutora Denise da Costa Boamorte Cortela**  
Faculdade de Ciências da Saúde - UNEMAT

Juiz de Fora, 28/04/2022.



Documento assinado eletronicamente por Lucia Alves de Oliveira Fraga, Professor(a), em 06/05/2022, às 17:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Ida Maria Foschiani Dias Baptista, Usuário Externo, em 10/05/2022, às 14:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Denise C. B. Cortela, Usuário Externo, em 17/05/2022, às 16:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufff ([www2.ufff.br/SEI](http://www2.ufff.br/SEI)) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador 0756546 e o código CRC DEA325BC.

Silva Pinheiro, Marcos Daniel.

Perfil clínico, sociodemográfico e laboratorial dos indivíduos com suspeição diagnóstica de hanseníase atendidos no CREDEN-PES no período de 2017 a 2021. / Marcos Daniel Silva Pinheiro. -- 2022.

75 p.

Orientadora: Lúcia Alves de Oliveira Fraga

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Avançado de Governador Valadares, Instituto de Ciências da Vida - ICV. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, 2022.

1. Hanseníase. 2. qPCR. 3. Georreferenciamento. 4. Diagnóstico precoce. I. Alves de Oliveira Fraga, Lúcia, orient. II. Título.

Dedico esse trabalho a minha família pilar da minha formação pessoal e profissional e a minha orientadora, que inspira seguir em frente.

## **AGRADECIMENTOS**

A DEUS, por cumprir suas promessas em minha vida, e por suprir todas as minhas necessidades físicas, emocionais, financeiras e o mais importante, me abençoando com relacionamentos.

A minha família, esposa Weissa Gomes da Silva Pinheiro e filhas Ana Laura Gomes Silva Pinheiro e Ana Beatriz Gomes Silva Pinheiro, por entenderem minhas ausências e ansiedades em alguns momentos, assim como ser base e foco para os meus objetivos. Minha mãe Valdênia e meus irmão Fábio, Paola e Raquel, por sempre acreditarem no meu potencial, as vezes até mais do que eu.

Minha orientadora, Profa. Dra. Lúcia Alves de Oliveira Fraga, pessoa na qual me inspiro a ser não só o melhor pesquisador, mas, ser a melhor pessoa que puder, a não desistir nunca da ciência e do conhecimento. Pessoa que sempre incentiva a buscar mais e construir parcerias e principalmente, por acreditar que eu pudesse voltar a estudar e dar mais alguns passos para a realização de um sonho que é me tornar Mestre e depois Doutor.

Ao grupo de pesquisa NUPQHANS-GV, grupo comprometido, dedicado e de pessoas fantásticas, agradeço em especial Thais Daiane de Moraes Souza e Daisy Cristina Monteiro dos Santos, que me deram maior suporte na coleta de dados, e não mediram esforços para que esse trabalho fosse concluído.

A equipe do CREDEN-PES, local onde trabalho com pessoas que sempre nos incentivam a sonhar e buscar a realização dos nossos objetivos e sonhos, e aos nossos pacientes por confiar no nosso trabalho e na pesquisa.

Ao Instituto Lauro de Souza Lima, especialmente a Profa. Dra. Ida Maria Baptista Foschiane, Amanda Juliane Finardi e Nathan Guilherme de Oliveira, que não mediram esforços para meu aperfeiçoamento e desenvolvimento desse trabalho e estendo meus agradecimentos a toda equipe do ILSL. São pessoas fantásticas, receptivas, de um conhecimento ímpar. No ILSL pude aprender e colocar em prática alguns conhecimentos, parceria que levarei para o resto da vida na prática e no coração.

O temor do Senhor, é o princípio do conhecimento, mas, os insensatos desprezam a sabedoria e a disciplina (Provérbios 1:7 Bíblia)

## RESUMO

O diagnóstico precoce da hanseníase é uma importante estratégia para interromper a cadeia de transmissão do *M. leprae* e prevenir a incapacidade física. No entanto, o diagnóstico é essencialmente clínico e, em muitos casos, os sintomas são sutis e às vezes passam despercebidos até mesmo pelos especialistas. Os exames de baciloscopia e histopatologia auxiliam no diagnóstico clínico, na categorização espectral e no tratamento da doença. Nas regiões onde a endemicidade é maior, métodos sorológicos e moleculares devem ser utilizados, principalmente entre os contatos domiciliares, para identificar contatos de pacientes com possibilidades de adoecimento. Nesse sentido, propusemos traçar o perfil clínico, sociodemográfico e laboratorial dos indivíduos com suspeição de hanseníase atendidos no CREDEN-PES.

Amostras de raspado dérmico auricular dos participantes do estudo foram coletadas e conservadas em álcool a 70%. Posteriormente, extraiu-se e quantificou-se o material genético. Em seguida realizou-se a qPCR tendo como alvo o gene RLEP (Elementos repetitivos) para identificação da presença de DNA do *M. leprae* nas referidas amostras.

Foram analisadas amostras de 411 indivíduos. Desse total, 158 foram classificados como casos e 253 como indivíduos com suspeição para hanseníase. Verificou-se um número significativo de casos com idade entre 40 a 69 anos (n=85), sendo que 58,86% foram do sexo masculino e 83,87% apresentaram qPCR positiva, indicando a presença de DNA de *M. leprae* nas amostras de raspado dérmico coletadas. Quanto à escolaridade, entre os que tinham 1ª a 4ª série incompleta, a reação qPCR foi positiva em 89,66%. A maioria dos casos notificados foi classificada como multibacilar (63,92%). Entretanto, o teste qPCR foi positivo em 75,44% dos casos classificados como paucibacilares e 86,14% dos casos multibacilares.

Em relação aos indivíduos com suspeição de hanseníase, das 253 amostras coletadas, 100% apresentaram índice bacilar negativo (IB=0). Entretanto, os resultados do teste qPCR indicaram que 120 amostras (47,43%) eram positivas para o gene RLEP. Esses resultados reforçam a necessidade da implementação de métodos laboratoriais mais sensíveis para o diagnóstico da hanseníase. Além disso, vale destacar a identificação de dois casos de pacientes (forma clínica virchowiana e



dimorfa) com IB zero e resultados de qPCR positivos. Os dados obtidos em nosso estudo indicam a possibilidade de adoecimento daqueles indivíduos encaminhados ao CREDENPES, com suspeição de hanseníase, que apresentaram resultados positivos para DNA de *M. leprae* na qPCR, embora com IB zero.

Palavras chaves: hanseníase, qPCR, georeferenciamento, diagnóstico precoce.

## Abstract

Early diagnosis of leprosy is a vital strategy to interrupt the chain of transmission of *M. leprae* and prevent physical disability. However, the diagnosis is essentially clinical, and, in many cases, the symptoms are subtle and sometimes go unnoticed even by specialists. Bacilloscopy and histopathology exams help in the clinical diagnosis, spectral categorization, and treatment of the disease. In regions where endemicity is higher, serological and molecular methods should be used, especially among household contacts, to identify contacts of patients with the possibility of becoming ill. In this sense, we proposed to trace the clinical, sociodemographic, and laboratory profiles of individuals with suspected leprosy treated at CREDEN-PES.

Ear dermal scraping samples from study participants were collected and preserved in 70% alcohol. Subsequently, the genetic material was extracted and quantified. Then, the qPCR assay was performed targeting the RLEP gene (Repetitive Elements) to identify the presence of *M. leprae* DNA in said samples.

Samples from 411 individuals were analyzed. Of this total, 158 samples were classified as cases and 253 as individuals with suspected leprosy. A significant number of patients aged between 40 and 69 years ( $n=85$ ), with 58.86% being male and 83.87% presenting positive qPCR, indicating the presence of *M. leprae* DNA in the dermal scraping samples collected. As for education, among those who had incomplete 1st to 4th grade, the qPCR reaction was positive at 89.66%. Most of the reported cases were classified as multibacillary (63.92%). However, the qPCR test was positive in 75.44% of the patients classified as paucibacillary and 86.14% of the multibacillary cases.

Regarding individuals with suspected leprosy, of the 253 samples collected, 100% had a negative bacillary index (BI=0). However, the results of the qPCR test indicated that 120 samples (47.43%) were positive for the RLEP gene. Our results reinforce the need to implement more sensitive laboratory methods to diagnose leprosy. In addition, it is worth highlighting the identification of two cases of patients (lepromatous and borderline clinical form) with zero BI and positive qPCR results. The study indicates the possibility of illness in those individuals referred to CREDENPES with suspected leprosy, who presented positive results for *M. leprae* DNA in the qPCR, although with BI zero.

Keywords: leprosy, qPCR, georeferencing, early diagnosis

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Modelo esquemático do envelope celular de <i>Mycobacterium leprae</i> .....	19
Figura 2 - Espectro de formas clínicas da hanseníase segundo a classificação de Ridley & Jopling, 1966.....	21
Figura 3 - Linha do tempo descoberta e evolução da PCR.....	27
Figura 4 - Distribuição de novos casos de hanseníase no mundo.....	31
Figura 5 - Localização e caracterização dos cenários dos municípios que compõem o SRS de Governador Valadares.....	34
Figura 6 - Número de amostras de raspados dérmicos realizados no CREDENS-PES. Número de indivíduos notificados com hanseníase e número de raspado intradérmico avaliado na qPCR, no período de 2017 a meados de 2021.....	46
Figura 7 - Distribuição do número de indivíduos notificados com hanseníase segundo a classificação operacional e clínica.....	50
Figura 8 - Análise dos parâmetros: Ct na qPCR, índice baciloscópico e forma clínica dos indivíduos notificados com hanseníase.....	51
Figura 9 - Concentração de indivíduos notificados (A) e suspeitos para hanseníase (B) de acordo com o município de residência na GRS-Governador Valadares.....	52
Figura 10 - Setorização da cidade de Governador Valadares.....	53
Figura 11 - Concentração dos indivíduos notificados com hanseníase do estudo no período de 2017 a 2021 nos setores do Governador Valadares e distribuição espacial das unidades básicas de saúde do perímetro urbano.....	54
Figura 12 - Análise temporal da concentração de casos e suspeitos de hanseníase/positivos para qPCR.....	55

## LISTA DE TABELA

Tabela 01 - Sequência dos primers e sonda utilizados na qPCR.....	41
Tabela 2 - Amplificação da reação qPCR em relação as variáveis sociodemográficas e classificação operacional dos indivíduos notificados com hanseníase.....	47
Tabela 3 - Frequência das variáveis sexo, faixa etária, baciloscopia e qPCR entre os indivíduos notificados e suspeitos de hanseníase.....	49

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b>	<b>18</b>
2.1	ASPECTOS GERAIS DO AGENTE ETIOLÓGICO	18
2.2	ASPECTOS CLÍNICOS DA CLASSIFICAÇÃO	20
2.3	TRATAMENTO DA HANSENÍASE	22
2.4	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA HANSENÍASE	23
<b>2.4.1</b>	<b>Testes sorológicos</b>	<b>23</b>
<b>2.4.2</b>	<b>Testes Moleculares de Reação da Cadeia da Polimerase (PCR)</b>	<b>25</b>
2.4.2.1	Breve história da PCR	25
2.4.2.2	qPCR na hanseníase	27
2.5	TRANSMISSÃO E EPIDEMIOLOGIA DA HANSENÍASE	30
<b>2.5.1</b>	<b>Mundo e Brasil</b>	<b>30</b>
<b>2.5.2</b>	<b>Hanseníase em Minas Gerais</b>	<b>32</b>
<b>2.5.3</b>	<b>Governador Valadares</b>	<b>34</b>
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>36</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVO</b>	<b>37</b>
4.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
<b>5</b>	<b>CAUSUÍSTICA</b>	<b>38</b>
5.1	ÁREA DE ESTUDO	38
5.2	DESENHO DO ESTUDO	38
<b>5.2.1</b>	<b>Organização do grupo de estudo</b>	<b>38</b>
<b>5.2.2</b>	<b>Avaliação do índice baciloscópico (IB)</b>	<b>39</b>
<b>5.2.3</b>	<b>Técnica de coleta, armazenamento e extração de DNA</b>	<b>39</b>
<b>5.2.4</b>	<b>Ensaio de PCR em tempo Real (qPCR) para amplificação do DNA de <i>M. leprae</i></b>	<b>40</b>
5.3	ORGANIZAÇÃO DOS DADOS	42
<b>5.3.1</b>	<b>Análise georreferenciamento</b>	<b>42</b>
<b>5.3.2</b>	<b>Análise estatística</b>	<b>42</b>
5.4	COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	43
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>44</b>
6.1	ANÁLISE DOS DADOS SOCIODEMOGRÁFICOS, CLÍNICOS E LABORATORIAIS	44
<b>6.1.1</b>	<b>Grupo de estudo</b>	<b>44</b>
<b>6.1.2</b>	<b>Análise dos dados da qPCR</b>	<b>44</b>
<b>6.1.3</b>	<b>Frequência da amplificação da qPCR em relação as variáveis sociodemográficas e classificação operacional dos indivíduos notificados</b>	<b>46</b>
<b>6.1.4</b>	<b>Proporção de casos e suspeitos de hanseníase, segundo as variáveis sexo, faixa etária, baciloscopia e qPCR</b>	<b>48</b>
<b>6.1.5</b>	<b>Distribuição do número de indivíduos notificados com hanseníase de acordo com a classificação operacional e a forma clínica</b>	<b>49</b>
<b>6.1.6</b>	<b>Análise dos parâmetros: Ct da qPCR, baciloscopia e forma clínica</b>	<b>50</b>

6.2 ANÁLISE GEOESPACIAL.....	52
6.2.1 Concentração de indivíduos notificados e suspeitos para hanseníase residentes nos municípios da GRS-Governador Valadares.....	52
6.2.2 Setorização da cidade de Governador Valadares.....	53
6.2.3 Concentração de indivíduos notificados por setor na cidade de Governador Valadares.....	53
6.2.4 Análise temporal da concentração de casos notificados e de suspeitos para hanseníase por meio do teste qPCR positivo.....	54
7 DISCUSSÃO.....	56
8 CONCLUSÃO.....	62
9 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	63
REFERÊNCIAS.....	64
ANEXOS.....	75

## 1. INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma infecção granulomatosa crônica ocasionada pelo *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) que acomete primariamente os nervos periféricos. As manifestações clínicas da doença decorrem do padrão de resposta imunológica estabelecida frente à infecção pelo *M. leprae*. Portanto, as pessoas atingidas pela hanseníase podem apresentar diversas manifestações clínicas (SCOLLARD *et al.*, 2006). No geral, a infecção dos macrófagos pelo *M. leprae*, gera lesões na pele com aspecto de placa, pápula, infiltração difusa e mais raramente nódulos. As lesões podem ser hipopigmentadas ou infiltradas com bordas elevadas, ambas com perda de sensibilidade tátil, térmica e dolorosa (AZULAY; AZULAY, 1997).

Quando o diagnóstico ocorre de forma tardia, os pacientes podem apresentar incapacidades físicas (IF). Estima-se que no mundo existam entre 1 a 2 milhões de pessoas com algum grau de deformidade e incapacidade resultantes da hanseníase, contribuindo para repercussões psicológicas e sociais negativas, fortalecem o estigma da doença e geram ônus para o sistema de saúde (YADAV, *et al.*, 2014). Assim, a hanseníase permanece como um importante problema de saúde pública, requerendo dos países endêmicos como o Brasil, fortalecimento dos serviços de saúde nas ações de combate e controle da doença (SILVEIRA, *et al.*, 2014).

No entanto, mesmo em decréscimo do número de casos novos, no estado de Minas Gerais, grande parte dos municípios ainda não atingiram a eliminação da doença como problema de saúde pública (menos de 5,22 casos por 100.000 mil habitantes em 2018) e outros permanecem silenciosos, ou seja, não registram casos. A transmissão continua ativa considerando a incidência de casos em menores de 15 anos, fato que pressupõe a presença de adultos doentes sem diagnóstico e/ou sem tratamento, convivendo e transmitindo a hanseníase para crianças e adolescentes. (LEITE, *et al.*, 2019; MINAS GERAIS, 2020)

O desenvolvimento de técnicas moleculares e o conhecimento prévio da sequência genômica do *M. leprae*, tornaram possível a realização do método de amplificação de DNA para identificação do bacilo em amostras clínicas. Ao contrário da baciloscopia, que requer cerca de  $10^4$  organismos por grama de tecido para detecção real, a PCR é uma técnica de alta especificidade e sensibilidade, capaz de



detectar 25 fentograma (fg) de DNA de *M. leprae*. Além disso, a possibilidade de sua utilização em quase todos os tipos de amostras clínicas confere a este método um alto potencial para o diagnóstico diferencial. Assim, a técnica da reação da polimerase em cadeia (PCR) pode vir a ser utilizada como um método de suporte alternativo aos métodos tradicionais de diagnóstico da doença (KANG *et al.*, 2003; GOULART; GOULART, 2008).

Dados georreferenciados sobre a hanseníase também ajudam a compreender fatores que favorecem a transmissão, como o comportamento de indivíduos não tratados em disseminar a doença nas comunidades em que vivem e por meio de rotas migratórias para outras unidades federativas (TRAVASSOS, *et. al.*; 1997; GARCIA, *et. al.*; 2013).

Portanto, os estudos moleculares e geoepidemiológicos na hanseníase são essenciais para a compreensão do comportamento da doença, auxiliando na elaboração de novas estratégias para o diagnóstico e melhorando as respostas das ações de combate, contribuindo para a consolidação de um saber técnico-científico-social efetivo nas ações de eliminação no país.

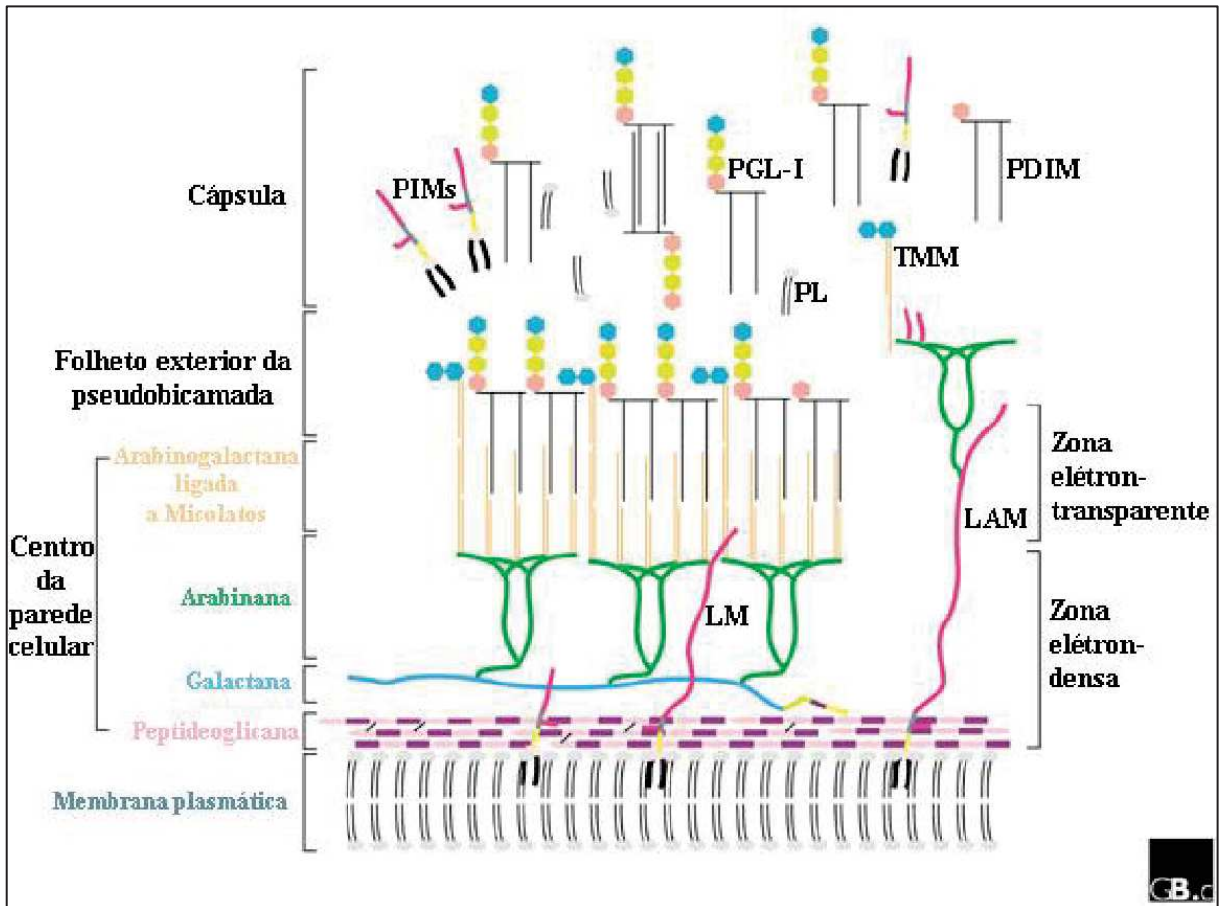
Diante disso, o objetivo deste estudo foi verificar através de qPCR (quantitativo Reação da Cadeia da Polimerase), a presença do *M. leprae* em raspados dérmicos de indivíduos atendidos no centro referência de saúde (CREDEN-PES) do município de Governador Valadares. Além disso, averiguamos o perfil clínico-epidemiológico e laboratorial dos participantes, bem como a indicação de regiões prioritárias para o combate e controle da doença no município. Sabe-se, que poucos estudos desta natureza têm sido desenvolvidos no município, e, portanto, carece, de maiores investigações.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Aspectos gerais do agente etiológico

O *Mycobacterium leprae*, foi descrito em 1873 por Gerhard Henrik Armauer Hansen, como um bacilo reto ou ligeiramente encurvado que se cora em vermelho pela fucsina e não se descora pela lavagem em solução álcool-ácido, sendo, portanto, classificado como um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR). Como bactéria intracelular, possui tropismo pelas células de Schwann nos nervos periféricos (SCOLLARD *et. al.*, 2006), especialmente nos locais em que a temperatura corporal é menor que 37°C favorecendo o seu metabolismo. Nos tecidos infectados, aparecem isolados ou em feixes paralelos, dispendo-se em “globias” (HASTINGS *et. al.*, 1988; SAMPAIO & RIVITTI, 1998).

A parede celular do *M. leprae* tem cerca de 20 nm de espessura e possui uma estrutura química semelhante à de outras micobactérias, sendo composta por peptidoglicana entrelaçada e ligada a cadeias polissacarídicas que servem de suporte para os ácidos micólicos que abrangem cerca da metade do peso da parede celular e conferem característica hidrofóbica ao bacilo. A lipoarabinomanana (LAM) é um importante componente da parede celular micobacteriana (Figura 1). O bacilo apresenta uma cápsula contendo grande quantidade de componentes lipídicos, onde é encontrado um lipídeo quimicamente distinto dos encontrados em outras espécies de micobactérias, o glicolipídeo fenólico 1 (PGL-1), que contém um trissacarídeo característico e único do *M. leprae*. Este lipídeo pode ser detectado em tecidos infectados, persistindo por um longo tempo mesmo após o bacilo ter sido degradado e eliminado (OPROMOLLA, 2000; VISSA E BRENNAN, 2001).



**Figura 1. Modelo esquemático do envelope celular de *Mycobacterium leprae*.** *Mycobacterium leprae* apresenta uma parede celular sobreposta à membrana plasmática. Esta parede é constituída por uma região eletrônica densa, composta por peptidoglicana, galactana, arabinomana, lipomanana, lipoarabinomana, uma região eletrônica transparente, constituída por arabinogalactana ligada a micolatos, lipomanana, lipoarabinomana, e uma cápsula formada por fosfatidilinositol manosídeos, glicolípido fenólico 1, fosfolípídeos, monomicolato de trealose e ftiocerol dimicocerosato. Abreviaturas: LM, lipomanana; LAM, lipoarabinomana; PL, fosfolípídeo; TMM, monomicolato de trealose; PIMs, fosfatidilinositol manosídeos; PGL-1, glicolípido fenólico I; PDIM, ftiocerol dimicocerosato. Fonte: Adaptado de Vissa & Brennan, 2001.

O genoma de *M. leprae* apresenta uma extensiva redução evolutiva, apresentando uma perda funcional de cerca de 2.000 genes comparado ao *M. tuberculosis*, o que resulta na perda de quase metade de suas funções metabólicas e ausência de vias metabólicas inteiras presentes no *M. tuberculosis*. Menos de 50% do genoma do *M. leprae*, que consiste de 3.268.203 pares de base, codifica proteínas. O bacilo apresenta um total de 2.770 genes, um número excepcionalmente grande de pseudogenes, 1.116, e 1.604 sequências codificadoras de proteínas (COLE, *et. al.*, 2001).

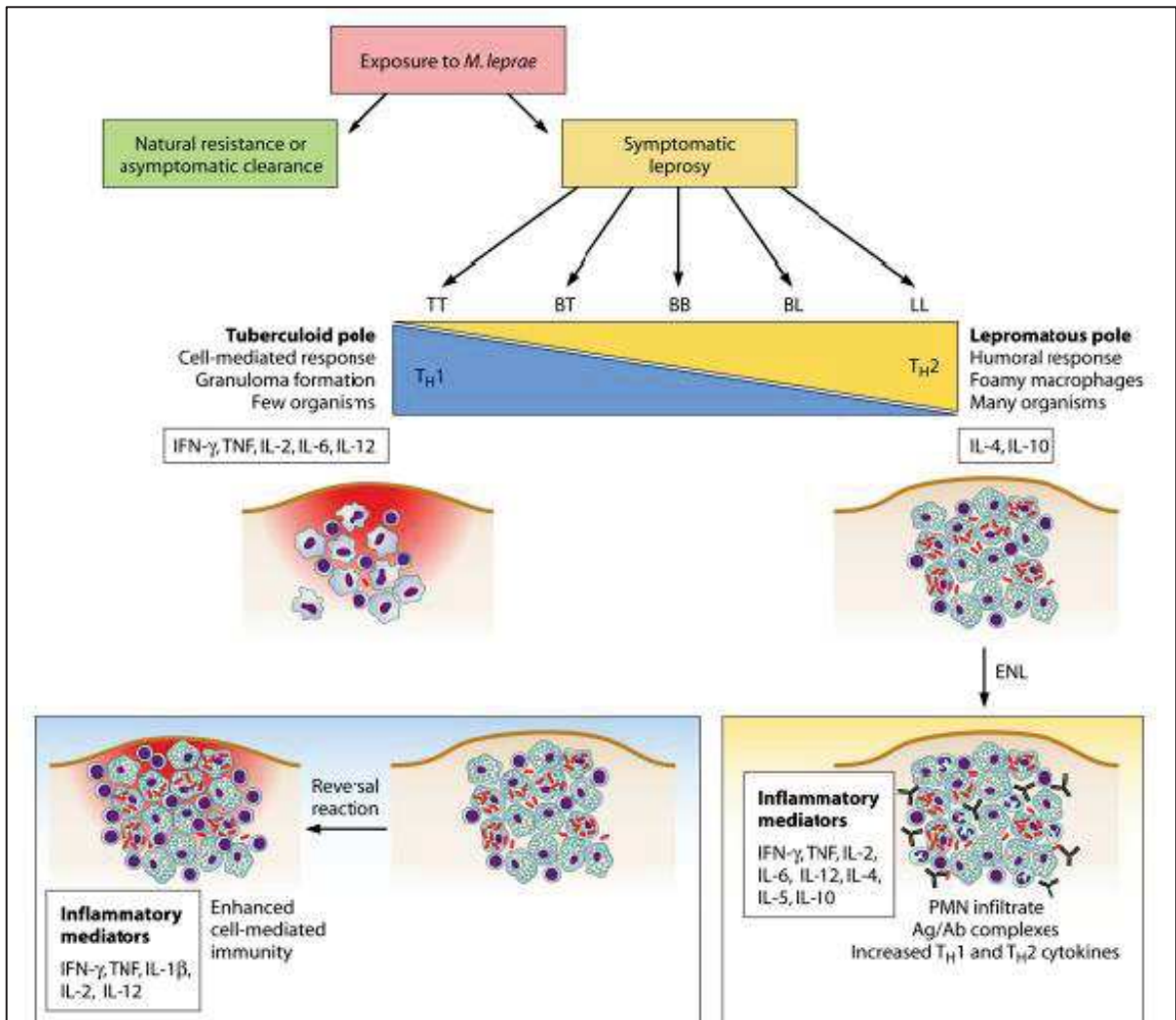
## 2.2 Aspectos clínicos e classificação

Em 1982, a Organização Mundial da Saúde (OMS), instituiu as normas para operacionalização do tratamento da doença. Com isso, estabeleceu-se a classificação operacional consistindo dos seguintes parâmetros: pacientes apresentando menos de 05 (cinco) lesões de pele é classificado como Paucibacilar (PB) e tendo 05 (cinco) ou mais lesões de pele como Multibacilar (MB), o intuito da classificação operacional é nortear o tratamento com a Poliquimioterapia (PQT). A baciloscopia auxilia no processo desta classificação, onde um resultado positivo indica paciente MB, no entanto baciloscopia negativa não descarta a possibilidade de hanseníase (BRASIL, 2016).

A classificação de Ridley & Joplin (1966) envolve dois polos, Tuberculóide e Lepromatoso, entre os dois polos há três formas intermediárias e dinâmicas, quanto mais próximo da forma Tuberculóide é chamada *Borderline tuberculoide* (BT), a mais centralizada é conhecida como *Borderline borderline* (BB), assemelhando-se à forma Lepromatosa é classificada de *Borderline lepromatous* (BL). O diagnóstico é feito por meio da sintomatologia clínica, com exames complementares de raspado intradérmico e/ou biópsia, para auxiliar na classificação da doença. Outra forma que pode ser observada é a hanseníase neural pura, que pode não acometer a pele e com raros bacilos, mesmo em biópsia de nervo (CUNHA, *et. al.*, 2006; HUNGRIA *et. al.*, 2016; TIWARI, *et. al.*, 2017).

O espectro de formas clínicas da hanseníase segundo a classificação de Ridley & Joplin está ilustrado na Figura 2. No polo tuberculóide, o hospedeiro apresenta uma boa resposta imune celular ao *M. leprae*, formando granulomas epitelióides e secretando citocinas pró inflamatórias, combatendo eficientemente a infecção. Neste polo há um pequeno número de bacilos presentes nas lesões. Já os pacientes do polo lepromatoso, apresentam uma resposta imune do tipo humoral e secreção de citocinas anti-inflamatórias. Neste polo há intensa proliferação bacilar e múltiplas lesões com a presença de macrófagos espumosos repletos de bacilos no seu interior. Os pacientes “borderline” apresentam características intermediárias, se aproximando mais de um polo ou outro de acordo com seu perfil de resposta imunológica ao *M. leprae*.

Existem ainda os episódios reacionais, que são responsáveis por grande destruição de ramos nervosos e consequentes incapacidades. Há dois tipos principais: a reação reversa (RR) ou reação do tipo 1, que ocorre principalmente nas formas “borderline”, e o eritema nodoso hansênico (ENH) ou reação do tipo 2, que ocorre principalmente no polo lepromatoso (MISCH, *et. al.*, 2010).



**Figura 2.** Espectro de formas clínicas da hanseníase segundo a classificação de Ridley & Jopling, 1966. Fonte: Adaptado de Misch *et. al.*, 2010.

Vale ressaltar que cerca de 95% dos indivíduos expostos ao *M. leprae* são resistentes à infecção ou a eliminam sem sintomas. Entretanto, 5% restantes irão desenvolver a doença em uma das formas clínicas dependendo da capacidade de resposta imune mediada por células aos antígenos do *M. leprae*.

## 2.3 Tratamento da hanseníase

Devido a relatos de resistência a monoterapia dos fármacos usados para tratamento da hanseníase, a OMS implantou em 1981 a PQT com Dapsona (DDS) e Rifampicina (RFP), que diminuiu drasticamente a prevalência da hanseníase, bem como reduziu o número de cepas resistentes a esses medicamentos (DIÓRIO *et. al.*, 2009; dos SANTOS *et. al.*, 2018; ROSA *et. al.*, 2019).

No Brasil, de acordo com o MS (2016), o acompanhamento do paciente com hanseníase é ambulatorial independente da classificação operacional (PB ou MB), e deverá ser assegurado ao paciente tratamento adequado e completo. O tratamento é padrão de acordo com a classificação operacional, para os casos PB usa-se 06 cartelas contendo Rifampicina e Dapsona, por período de 6 a 9 meses, com dose supervisionada de Rifampicina na unidade de saúde no mínimo uma vez por mês. Para os casos MB serão 12 cartelas contendo Rifampicina, Dapsona e acréscimo de Clofazimina, com duração de 12 a 18 meses. Ao final do tratamento é realizada nova avaliação dermatoneurológica e grau de incapacidade física (GIF). Não havendo nenhuma alteração o paciente receberá alta por cura.

A partir de sete de Julho de 2021, a nota técnica 16/2021 da Coordenação Geral de Vigilância das Doenças em Eliminação, Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis, Secretária de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, regulamentou a Poliquimioterapia única (PQT-U) que associa os fármacos Dapsona + Rifampicina + Clofazimina na apresentação de blísteres para o tratamento da hanseníase, mantendo-se os protocolos de tratamento de 06 (seis) meses para Paucibacilares e 12 (doze) meses para Multibacilares (BRASIL, 2021).

Segundo Cortela *et. al.* (2020), o Brasil implantou um programa piloto para a avaliação da operacionalidade da quimioprofilaxia com rifampicina em dose única. O programa foi denominado “Profilaxia Pós Exposição” (PEP) e implementado na rotina de programas de hanseníase no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS), nos Estados do Mato Grosso, Tocantins e Pernambuco. Entretanto, de acordo com os autores, a viabilidade, implementação e o funcionamento adequado do PEP Hans-Brasil, exige articulação em todos os níveis de atenção à saúde e algumas condições



devem ser consideradas. Há necessidade de um planejamento operacional, de fatores técnicos, disponibilidades de recursos, conhecimento do estigma, da percepção, do impacto da distribuição do PEP e da aceitabilidade da intervenção.

## **2.4 Diagnóstico laboratorial da hanseníase**

A baciloscopia do raspado intradérmico é o exame complementar mais útil no diagnóstico, considerado padrão-ouro; é de fácil execução e baixo custo. Colhe-se o material a ser examinado (raspado de tecido dérmico) nos lóbulos das orelhas direita e esquerda, cotovelo direito e cotovelo esquerdo e/ou lesão suspeita. A coloração é feita pelo método de Ziehl-Neelsen e apresenta-se o resultado sob a forma de índice baciloscópico (IB), numa escala que vai de 0 a 6+, dependendo do número de bacilos observados por campo à microscopia. É utilizada como exame complementar para a identificação dos casos PB e MB de difícil classificação clínica. Baciloscopia positiva classifica o caso como MB, independentemente do número de lesões, no entanto o resultando negativo, não descarta a hanseníase (BRASIL; 2010).

Uma das dificuldades para o diagnóstico da hanseníase se deve ao não cultivo do *M. leprae*, *in vitro*. Existem investigações como infecção em camundongos e tatus que auxiliam a obtenção do bacilo além de dar suporte às técnicas para o sequenciamento genético do *M. leprae* (MARTINEZ *et. al.*, 2011; TURANKAR *et. al.*, 2015; ROSA *et al.*, 2019).

A busca por técnicas mais sensíveis para detecção e diagnóstico da doença é essencial para iniciar o tratamento e controlar a transmissão, principalmente entre os contatos domiciliares (AZEVEDO *et. al.*, 2016). Assim, novos métodos de diagnóstico, tanto sorológicos quanto moleculares têm sido propostos (TURANKAR *et.al.*, 2015; RICHARDUS *et. al.*, 2017; MONTOYA *et. al.*, 2017).

### **2.4.1 Testes Sorológicos**

Uma diversidade de ensaios sorológicos foi proposta para o diagnóstico da hanseníase, dentre eles destaca-se: Teste de Hemoaglutinação Passiva (PHA), Teste de Aglutinação com Partículas de Gelatina (MLPA), *Dispstick* e o Teste de Fluxo Lateral, que possuem vantagens e limitações dependendo do tipo de pesquisa.

Segundo Andrade *et. al.*, (2008) a positividade do teste ML flow correlaciona-se à carga bacilar, indicando que a sorologia é mais sensível que a baciloscopia. E,

sugere que pode ser utilizada na classificação dos casos de hanseníase em PB e MB, bem como identificar entre os contatos aqueles com maior risco de desenvolver hanseníase. Esses autores verificaram também que o ML Flow foi positivo em todos os pacientes com IB  $\geq$  2 e ainda que a chance de soropositividade aumentou à medida que o paciente apresentava maior número de nervos comprometidos e/ou maior número de lesões cutâneas (Grossi *et. al.* 2008a). Houve uma tentativa de empregar o teste ML Flow como instrumento adicional para a correta classificação de casos novos de hanseníase em PB ou MB e identificação de contatos de pacientes de hanseníase com maior risco de desenvolver a doença no futuro. De acordo com os autores existe uma forte tendência dos profissionais de saúde classificarem os pacientes como MB. Entretanto, esta tendência parece estar relacionada à ausência de exames laboratoriais como a baciloscopia e histopatologia que dão segurança ao profissional na tomada de decisão (Grossi *et. al.* 2008b).

Dentre os antígenos mais estudados e aplicados no diagnóstico da hanseníase destacam-se o *Natural Disaccharide linked to Human Serum Albumin via Octyl* (NDO-HSA), que é uma forma sintética do glicolípido fenólico conjugado com soro albumina bovina (Lobato *et. al.* 2011; DUTHIE *et. al.*, 2014a), o Leprosy IDR1 diagnostic 1 (LID-1), que é uma combinação das proteínas recombinantes do *M. leprae* ML0405 e ML2331 (DUTHIE *et. al.*, 2007; 2011; 2014a; SOUZA *et. al.*, 2014), e o conjugado NDO-LID (CARDOSO *et. al.*, 2013; DUTHIE *et. al.* 2014a, DUTHIE *et. al.* 2014b; FABRI *et. al.*. 2015). Estes antígenos passaram a ser utilizados em testes auxiliares no diagnóstico da hanseníase, embora nenhum deles seja considerado padrão ouro para o diagnóstico da doença.

Posteriormente, Fabri *et. al.*, (2015), sugeriram que testes baseados na detecção de anticorpos contra PGL-1 e/ou LID-1 são eficazes para a identificação de pacientes MB, enquanto que o NDO-LID pode ser útil no diagnóstico de pacientes PB, bem como de contatos domiciliares com maior risco de adoecimento.

De acordo com Frade *et. al.*, (2017), o teste rápido comercial NDO-LID (Orange Life, Rio de Janeiro, Brasil) apresentou resultados positivos para 62,8% dos pacientes clinicamente diagnosticados com hanseníase. No entanto, este teste apresentou menor especificidade do que o ELISA anti-PGL-1 e anti-LID-1. Os autores concluíram que o teste rápido NDO-LID, apresenta as mesmas limitações que outros testes para



diagnóstico, realçando a dificuldade de monitorar pacientes em fase inicial da doença MB e/ou PB.

Marçal *et. al.* (2018), avaliaram a reatividade de anticorpos IgM e IgG frente aos antígenos LID-1, NDO-LID e NDO-HSA. Os autores utilizaram soros de pacientes com hanseníase e grupos de contatos intradomiciliares assintomáticos. Os níveis séricos de anticorpos IgM e IgG contra os antígenos LID-1, NDO-LID e NDO-HSA estavam aumentados em pacientes MB, comparados com os grupos de contatos. Os anticorpos IgM apresentaram maior reatividade contra o antígeno NDO-LID, ao passo que os anticorpos IgG apresentaram reatividade aumentada contra o antígeno LID-1. Os pacientes MB apresentaram níveis mais elevados de anticorpos IgM e IgG do que os pacientes PB.

Os dados de Vidal *et. al.* (2019), mostraram maior positividade aos testes para antígenos NDO-HSA, NDO-LID e LID-1 em contatos domiciliares de casos MB. Houve correlação positiva entre os três antígenos, entretanto entre LID-1 e NDO-HSA não houve significância estatística. Os autores sugerem que os teste sorológicos avaliados em conjunto com as características do caso índice associadas às questões sociodemográficas, tem potencial para atuar como auxiliares na detecção de indivíduos infectados pelo *M. leprae*, contribuindo para vigilância dos contatos.

## **2.4.2 Testes Moleculares de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**

### **2.4.2.1 Breve Histórico da PCR**

A PCR (*Polymerase Chain Reaction* ou Reação em Cadeia da Polimerase) é uma técnica pela qual moléculas de DNA são amplificadas milhares ou milhões de vezes de uma forma bastante rápida. Todo o procedimento é realizado *in vitro*, gerando DNA em quantidades suficientes para análises posteriores (ZAHA; 2014).

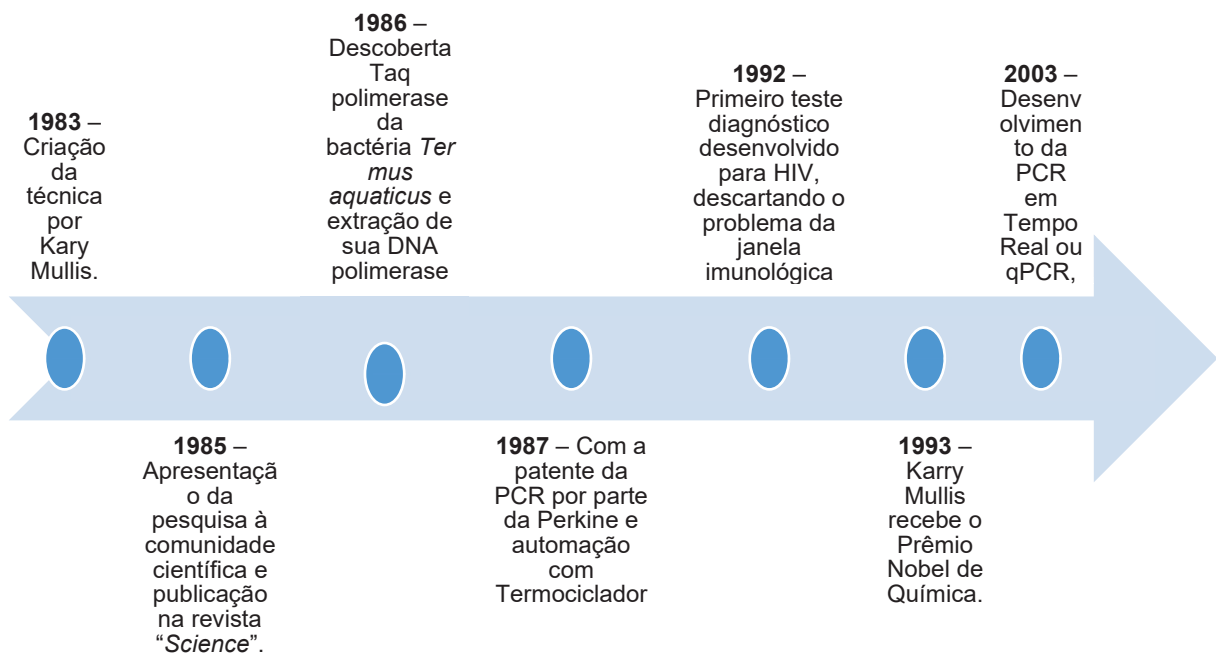
A técnica é muito sensível, possibilitando a amplificação de DNA a partir de uma quantidade mínima de amostra. Essa característica tem proporcionado a aplicação da técnica não apenas na pesquisa básica, mas também na pesquisa aplicada, como nos testes de identificação genética, medicina forense, diagnóstico de doenças infecciosas, controle de qualidade industrial, entre outros (ZAHA; 2014).

O desenvolvimento da técnica de amplificação de segmentos de DNA, utilizando a PCR abriu novas perspectivas em várias áreas do conhecimento. Nos experimentos iniciais de PCR, utilizou-se a enzima DNA polimerase de *Escherichia Coli*, cuja temperatura de polimerização é de 37°C. A enzima era adicionada manualmente a cada ciclo de amplificação, mas, era destruída toda vez que a temperatura era elevada para 95°C para promover a desnaturação do DNA molde (ZAHA; 2014).

O passo decisivo para a expansão da PCR foi a descoberta da enzima taq polimerase, extraída da bactéria *Thermus aquaticus*. Esse organismo vive em fontes termais e muitas de suas enzimas são termoestáveis (resistentes à desnaturação pelo calor). Essa característica especial tornou-a adequada para utilização em metodologias como a PCR que envolve etapas de aquecimento a temperaturas de mais de 90°C (ZAHA; 2014).

Um importante avanço na técnica de PCR foi o desenvolvimento de metodologias que possibilitaram o acompanhamento da amplificação do DNA em todo o processo e não somente em seu final (PCR convencional) (ZAHA; 2014).

A reação de amplificação em tempo real (qPCR), uma variante da reação de PCR convencional, representa grande avanço nos métodos moleculares para auxílio em diagnóstico, particularmente por facilitar sobremaneira as tarefas de quantificação da expressão gênica em determinado tecido ou amostra biológica. O método utiliza um sistema fluorescente em plataforma capaz de detectar a luz oriunda da reação de amplificação (HOLLAND *et. al.*, 1991; HIGUCHI *et. al.*, 1993; WILLIAMS, 2009). A figura 3 ilustra a linha do tempo e evolução da PCR.



**Figura 3:** Linha do tempo descoberta e evolução da PCR

#### 2.4.2.2 qPCR na hanseníase

De acordo com Almeida *et. al.* (2004), vários pesquisadores têm usado o método da PCR para amplificar sequências genômicas do *M. leprae* em diferentes amostras biológicas tais como sangue, raspado dérmico, biópsias e secreções nasais.

A PCR é uma técnica de alta especificidade e sensibilidade, capaz de detectar 25 fg ( $10^{-15}$ g) de DNA de *M. leprae* conferindo a esse método um alto potencial para diagnóstico diferencial (GOULART e GOULART, 2008).

Martinez *et. al.* (2009), confirmaram a especificidade do Primer 16S rRNA e RLEP (Elemento Repetitivo) para o *M. leprae*, utilizando a técnica da qPCR em outras 9 espécies de Mycobacterium incluindo *M. tuberculosis*, *M. marinum*, *M. bovis BCG*, *M. ulcerans*, *M. simiae*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, e *M. smegmatis*; além de bactérias de outros gêneros como *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes* e *Escherichia coli*.

Martinez *et. al.* (2011), realizaram o primeiro estudo para detecção de *M. leprae* em biópsias de pele de pacientes com diferentes formas clínicas da hanseníase e de outras doenças dermatológicas bem como em indivíduos saudáveis, por meio da

qPCR. Os autores identificaram quatro genes marcadores da hanseníase RLEP, 16S rRNA, sodA e Ag 85B. Posteriormente, Martinez *et. al.* (2014), compararam a sensibilidade e especificidade da qPCR para amplificação dos genes sodA, 16S rRNA, RLEP e Ag 85B para o diagnóstico diferencial da hanseníase. Esses autores demonstraram que o gene RLEP conferia maior sensibilidade à técnica. No entanto, o ensaio com o RLEP foi positivo para 4 pacientes com outras doenças dermatológicas. O ensaio com 16S rRNA, embora menos sensível, foi específico para o *M. leprae*.

Várias tentativas para o uso da qPCR no diagnóstico da hanseníase tem sido implementadas para identificar alvos genéticos do bacilo. Entretanto, até o momento, não se sabe qual seria o mais adequado para o diagnóstico na fase inicial da doença (TURANKAR *et. al.*, 2015; BENJAK *et. al.*, 2018).

Gama *et. al.* (2018), avaliaram o desempenho da qPCR para diagnóstico da hanseníase, em grupos de pacientes PB e MB e seus respectivos contatos domiciliares. Os resultados mostraram que 25% dos pacientes no grupo PB apresentaram DNA de *M. leprae* considerando qualquer amostra (sangue e/ou raspado dérmico). Entretanto, todos os pacientes do grupo PB foram negativos para a baciloscopia. No grupo MB, verificou-se que 69,6% dos pacientes foram positivos na qPCR considerando as duas amostras. Por outro lado, a baciloscopia foi positiva em apenas 56,5% dos pacientes no grupo MB. Esses autores avaliaram 113 contatos e encontraram 19,23% dos contatos de PB positivos para *M. leprae* e 27,87% positivos para os contatos de MB. Em termos gerais, entre os 113 contatos assintomáticos avaliados pela qPCR 23,89% apresentaram DNA de *M. leprae*.

Segundo Barbieri, *et. al.*, (2019), uma avaliação extensiva da PCR demonstrou que os ensaios que buscam DNA podem ser 100% específicos com sensibilidade variando de 34% a 80% em pacientes com a forma clínica PB e superior a 90% em pacientes com a forma MB. A detecção de DNA de *M. leprae* nas amostras é crucial para o diagnóstico e início do tratamento principalmente em pacientes PB e em casos de hanseníase neural pura. Sabe-se que nas condições clínicas e histológicas insuficientes para diagnóstico da hanseníase, a qPCR auxiliou no diagnóstico da doença. Nos casos em que houve suspeita de hanseníase da forma clínica PB, o uso

simultâneo de qPCR e exame histopatológico aumentou a sensibilidade do diagnóstico sem perda de especificidade.

Oliveira *et. al.*, (2019), selecionaram ao acaso 19 casos novos de hanseníase e realizaram a busca ativa entre os respectivos contatos, totalizando 124 indivíduos. Dentre esses, foram diagnosticados clinicamente com hanseníase 25%. Entretanto, empregando a qPCR e o ensaio de ELISA os autores encontraram um número significativamente maior de casos novos entre os contatos, apresentando uma sensibilidade de 78% e especificidade de 75,2% para a qPCR em comparação com o ELISA que apresentou valores de 76% e 49%, respectivamente.

Recentemente, Manta *et. al.*, (2019), demonstraram que o uso de diferentes amostras e alvos de *M. leprae* podem afetar a variabilidade da positividade da PCR. Esses autores mostraram que utilizando o gene 16S rRNA melhorou a precisão do diagnóstico da hanseníase da forma clínica PB. O emprego da qPCR para triagem de contatos positivos para PGL-1, aumentou a taxa de positividade da qPCR em 40% nesse grupo. Observaram também, uma maior positividade da qPCR para o gene 16S rRNA utilizando raspado intradérmico de contatos de pacientes MB, mas, não detectaram diferença significativa no número de genomas dos contatos de pacientes PB ou MB.

Em seus estudos GAMA *et. al.* (2019), utilizaram amostras de sangue e raspado intradérmico de casos de hanseníase e seus respectivos contatos domiciliares, para análise por qPCR (16S rRNA) e ELISA (anti ND-O-LID e LID-1). A análise integrada dos dados foi realizada por meio do algoritmo denominado *Random Forest* (floresta de decisão) com o objetivo de melhorar o desempenho dos testes para o diagnóstico de hanseníase. Os autores verificaram que isoladamente, a qPCR apresentou sensibilidade de 48,8% e especificidade de 100% no diagnóstico de casos de hanseníase. No ensaio de ELISA anti-NDO-LID a sensibilidade alcançada foi de 57,9% e especificidade de 97,5%, enquanto que no ensaio de anti-LID-1, a sensibilidade e especificidade foram de 63,2% e 92,5%, respectivamente. Entretanto, os autores concluíram que por meio da análise integrada dos dados por *Random Forest*, obtiveram uma taxa de sensibilidade de 81,6% e especificidade de 92,5% na predição de novos casos de hanseníase. Dessa forma, segundo os autores o modelo

foi utilizado para o monitoramento de contatos domiciliares no período de 05 anos e identificaram entre os contatos, 02 doentes mesmo antes do diagnóstico clínico.

O kit NAT hanseníase é o primeiro teste molecular comercial para doença desenvolvido no Brasil e o segundo exame autorizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Esse registro, permite a comercialização do teste e é uma exigência para que o exame possa ser oferecido no SUS. A inovação foi desenvolvida pelo Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz) em parceria com o Instituto Carlos Chagas (Fiocruz Paraná) e o Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP), ligado à Fiocruz e ao governo paranaense. Os pesquisadores ressaltam a importância da aplicação de uma metodologia de ponta contra uma doença negligenciada (FIOCRUZ, 2021).

## **2.5 Transmissão e epidemiologia da hanseníase**

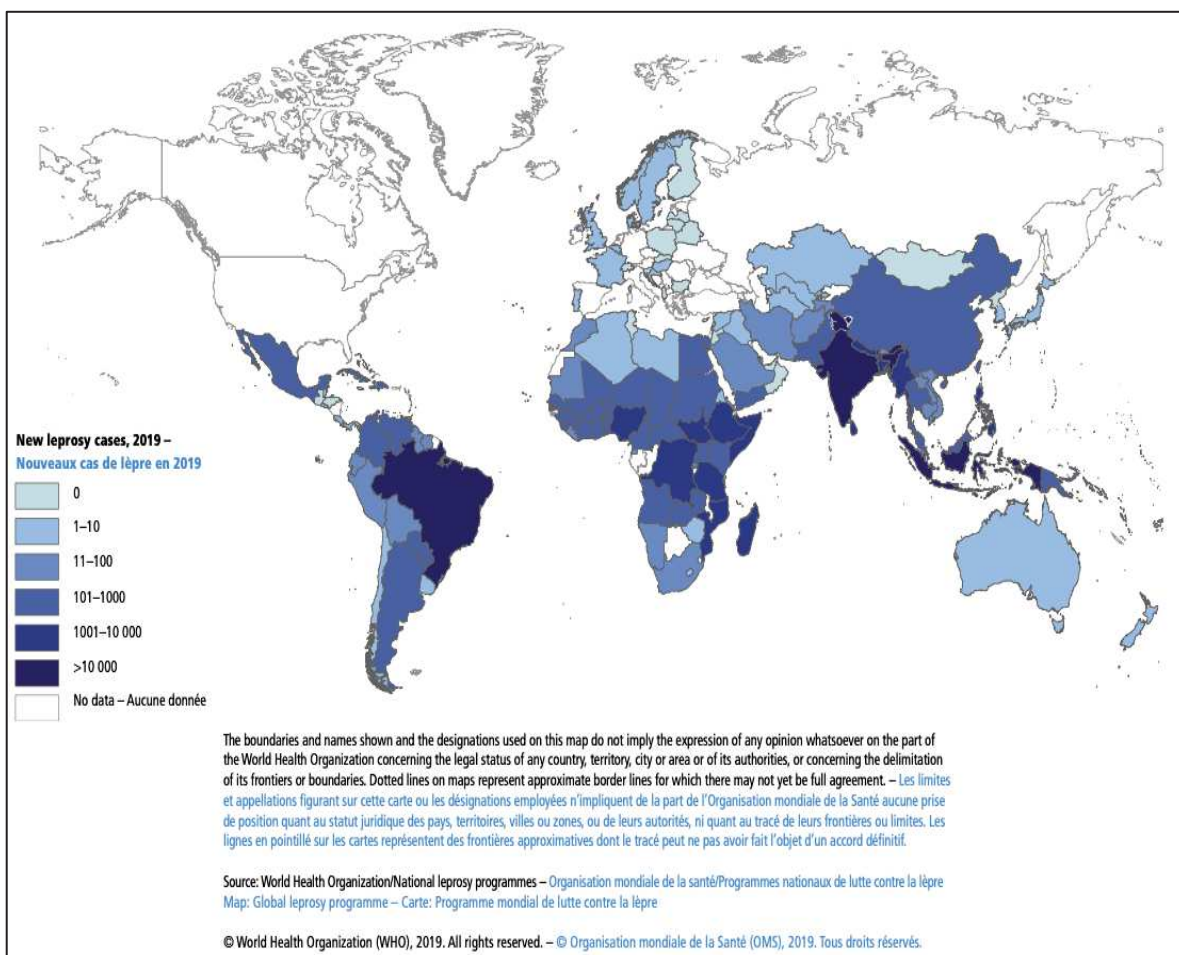
### **2.5.1 Mundo e Brasil**

A hanseníase é uma doença que possui alta prevalência em comunidades com baixo nível de escolaridade, assistência à saúde e saneamento básico deficitários e falta de investimento e informação sobre a doença (VIEIRA *et. al.*, 2014; PESCARINI *et. al.*, 2020). O tempo para manifestação clínica da hanseníase varia entre 2 (dois) a 7 (sete) anos, o método de transmissão, possivelmente é a via respiratória, e para contágio é necessário contato próximo e prolongado além de susceptibilidade individual (GILLINI *et.al.*, 2017; FONSECA *et.al.*, 2017; MONTOYA *et.al.*, 2017; CARVALHO *et.al.*, 2018).

A transmissão da hanseníase permanece ativa no mundo, visto que 62 países reportaram casos novos em menores de 15 anos. No decorrer do ano de 2020, 8.629 novos casos foram diagnosticados, correspondendo a 6,8% do total de casos novos diagnosticados. O acometimento de menores de 15 anos pressupõe a presença de adultos doentes sem diagnóstico e/ou sem tratamento, convivendo e transmitindo a hanseníase para crianças e adolescentes (BRASIL; 2022).

Em 2020, foram reportados à OMS 127.396 casos novos da doença no mundo. Desses, 19.195 (15,1%) ocorreram na região das Américas e 17.979 foram notificados no Brasil, o que corresponde a 93,6% do número de casos novos das Américas. Brasil,

Índia e Indonésia reportaram mais de 10.000 casos novos, correspondendo a 74% dos casos novos detectados no ano de 2020. Nesse contexto, o Brasil ocupa o segundo lugar entre os países com maior número de casos no mundo, atrás apenas da Índia (BRASIL; 2022). Como ilustrado na figura 4.



**Figura 4:** Distribuição de novos casos de hanseníase no mundo. Referência: Aliança contra hanseníase.

No Brasil, apesar dos esforços do Ministério da Saúde (MS), nas ações de controle, a doença continua ativa. Entre os anos de 2014 a 2018, foram diagnosticados 140.578 casos, com média de 28.116 casos novos por ano (BRASIL, 2020).

De acordo com o Boletim Epidemiológico do MS (BRASIL, 2021) em 2019, o Brasil notificou 27.864 novos casos de hanseníase, correspondendo a 93% das notificações das Américas, desse total 1.545 (5,5%) ocorreram em menores de 15 anos.



Em relação ao Grau de Incapacidade Física (GIF), 7.198 casos novos foram diagnosticados com GIF 2, e entre todos os países que notificaram hanseníase, Índia e Brasil, foram os únicos que identificaram mais de 1.000 casos novos com GIF 2 no momento do diagnóstico. Quanto ao GIF 2, a proporção observada foi de 7,1% em 2011 e 10,0% em 2020, com incremento de 40,8% e mudança no parâmetro de endemicidade, que passou de médio para alto. A proporção de casos novos de hanseníase diagnosticados com GIF 2 é um importante indicador para avaliar o diagnóstico tardio (BRASIL; 2022).

### 2.5.2 Hanseníase em Minas Gerais

Em Minas Gerais apesar da diminuição progressiva do número de casos notificados nos últimos anos, o cenário epidemiológico da doença no Estado é preocupante. Tem-se observado aumento da detecção de casos novos, com 5,5% em menores de 15 anos. Assim como outros estados endêmicos do Brasil, Minas Gerais possui uma importante detecção de casos novos com algum GIF. Em 2017 a presença de GIF 2 foi observada em 12% dos casos novos, evidenciando diagnóstico tardio decorrente da detecção passiva de casos de hanseníase pelos serviços de saúde deste estado (MINAS GERAIS; 2020).

Outra situação é a existência de municípios silenciosos, ou seja, que não registraram nenhum caso novo: em 2017, 64,7% (n= 552) dos municípios mineiros se encontravam nesta condição. Atualmente, a secretaria de saúde reconhece a necessidade de reorganização na rede de atenção estadual, regional e municipal, já que essas informações evidenciam que há vazios assistenciais, déficits na infraestrutura física e recursos humanos habilitados, além da distribuição heterogênea de casos no território (LEITE, *et. al.*; 2019; MINAS GERAIS; 2020).

Em um recente estudo realizado por Leite *et. al.* (2019), o Estado de Minas Gerais vem notificando nos últimos oito anos, índices que variam entre 1524 a 1035 casos novos a cada ano. Em 2018, foram notificados 1.035 novos casos, significando 4,92 novos diagnósticos a cada 100 mil habitantes, dos quais 5,6% (58) foram em menores de 15 anos. Do total de casos novos notificados em 2018, 11,9% foram diagnosticados com deformidade, indicando um percentual alto de diagnóstico tardio.

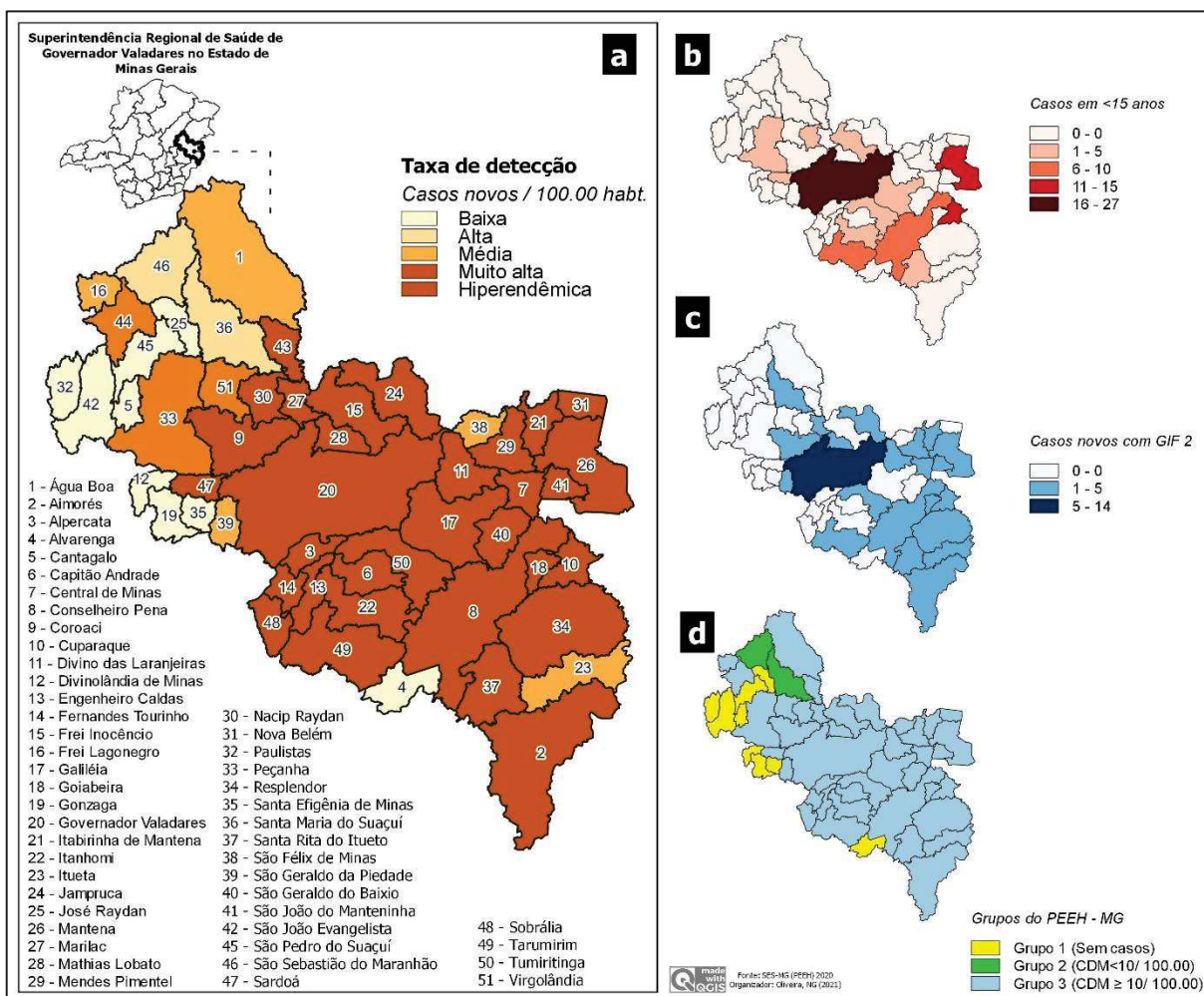


Os autores descreveram os resultados de uma série histórica para avaliar a proporção de municípios silenciosos (sem diagnóstico de casos novos no ano. Em 2009 - 58,6% (500 municípios); 2010 - 59,3%(506 municípios); 2011 -58,5% (497 municípios); 2012 - 59,2% (505 municípios); 2013 - 64,5% (550 municípios); 2014 - 64,5% (55020 municípios); 2015 – 64,4% (549 municípios); 2016 – 65,0% (554 municípios); 2017 – 64,7% (552 municípios); 2018 – 68,4% (577 municípios).

Diante disto, o atual Plano Estadual de Enfrentamento da Hanseníase de Minas Gerais 2019-2022 (PEEH-MG 2019-2022) tem como principal objetivo formular, apoiar e estimular a implementação da Política Estadual de Enfrentamento da Hanseníase, através da reestruturação da Rede de Atenção à Pessoa com hanseníase (RAPH) de acordo com as especificidades regionais e municipais (MINAS GERAIS; 2020).

A Superintendência Regional de Saúde de Governador Valadares (SRS/GV), é uma das 28 SRS do Estado de Minas Gerais que possui uma parcela importante de municípios que requerem atenção no combate e controle da hanseníase.

Segundo dados do PEEH-MG (2020), 62.75% dos municípios da SRS/GV são hiperendêmicos para hanseníase e 78.43% estão dentro do grupo de prioridade 3 no PEEH-MG, ou seja, merecem atenção, considerando sua alta endemicidade. Dos 51 municípios que compõe este território administrativo de saúde, 13 (25.5%) registraram casos novos em crianças entre 2013 a 2017 e 23 (45.1%) registraram detecção de casos novos já com incapacidade física de grau 2. Em todos estes indicadores, o Município de Governador Valadares apresentou as maiores taxas e compõe o grupo de municípios prioritários no estado de Minas Gerais. (MINAS GERAIS, 2020). A figura 5, esquematiza a caracterização dos cenários dos municípios fazem parte da SRS de Governador Valadares.



**Figura 5.** Localização e caracterização dos cenários dos municípios que compõem o SRS de Governador Valadares. **a)** Taxas de detecção de casos por 100 mil habitantes: baixa (menor que 2,00), média (2,00 a 9,99), alta (10,00 a 19,99), muito alta (20,00 a 39,99) e situação hiperendêmica (maior ou igual a 40,00); **b)** Frequência absoluta de casos novos em menores de 15 anos; **c)** Frequência absoluta de casos novos com Grau de Incapacidade Física (GIF) no diagnóstico; **d)** Ranking dos grupos prioritários do Estado de Minas gerais segundo a Política Estadual de Enfrentamento da Hanseníase (PEEH – MG) 2020-2022.

### 2.5.3 Governador Valadares

De acordo com o IBGE, Governador Valadares tem um PIB per capita de R\$ 22.278,79 em 2020 (IBGE, 2021). O índice de desenvolvimento humano (IDH) em 2010 era de 0,727, classificando o município na posição 96 entre os demais municípios do Estado, considerado de alto nível e com faixa de desenvolvimento humano – 0,8 (IBGE, 2021). As atividades econômicas mais relevantes no município são desenvolvidas em cerca de onze mil micro/pequenas empresas estabelecidas na cidade, sendo 43% do setor do comércio, 38% do setor de serviços, 16% do ramo

industrial e 3% do setor agropecuário (BANCO DE DESENVOLVIMENTO DE MINAS GERAIS, 2021) PMS 2022-2025.

De acordo com o Plano Municipal de Saúde de Governador Valadares 2022-2025 (PMS) (GOVERNADOR VALADARES, 2021), o município conta com a Atenção Primária a Saúde (APS) que está organizada em equipes com alta capilaridade territorial na malha urbana e na zona rural, composta por 59 Estratégias de Saúde da Família (ESF) e 05 Unidades Básicas de Saúde (UBS).

O município de Governador Valadares, localizado no leste do Estado, é considerado hiperendêmico. A cidade possui uma população estimada de 279.885 (duzentos e setenta e nove mil oitocentos e oitenta e cinco habitantes) e apresenta casos novos em menores de 15 anos (IBGE, 2019; MINAS GERAIS, 2020). O município é referência no enfrentamento da hanseníase há décadas. Apresenta marcos históricos como por exemplo sediar a Fundação SESP desde a década de 40, implantação da PQT nos anos 80, fundação do Centro de Referência em Doenças Endêmicas e Programas Especiais (CREDEN-PES) em 2001, tentativa de descentralização, capacitação e campanha em 2002, campo de formação de mestres a partir de 2010 com dissertações no tema e atuação de grupos inclusivos de autocuidado merecem destaque (GOVERNADOR VALADARES; 2021).

De acordo com a Secretaria Municipal de Saúde (SMS), no Plano Municipal de Enfrentamento a Hanseníase (PMEH), a tendência temporal da detecção dos casos de hanseníase no município, de 2002 a 2020, foi de diminuição do número de diagnósticos na população geral, acompanhado também de diminuição na detecção de casos em menores de 15 anos. Entretanto, a partir da análise da ocorrência de casos novos em menores de 15 anos, é possível afirmar que ainda ocorre transmissão ativa no município, já que o período de incubação longo da doença pode inferir convivência de uma criança com um adulto doente ainda sem tratamento. (GOVERNADOR VALADARES; 2021).

Ainda segundo a SMS (GOVERNADOR VALADARES; 2021), a proporção de contatos de casos novos examinados entre os registrados aumentou de forma significativa, de 50,4% em 2010 para 76,2% em 2020, evidenciando melhora expressiva neste parâmetro.

### 3. JUSTIFICATIVA

Diante do exposto, fica evidente que casos com infecção subclínica da hanseníase passam despercebidos pelos serviços de saúde, constituindo um dos principais desafios para o controle da doença nas regiões endêmicas do Brasil.

No Estado de Minas Gerais, algumas regiões como a SRS/GV, que compreende principalmente o município de Governador Valadares e entorno, apresentam fragilidades operacionais que contribuem para o aumento de casos novos em menores de 15 anos, bem como de indivíduos que chegam nos serviços de saúde com as formas graves da doença.

Neste sentido, técnicas de detecção de DNA de *M. leprae* em regiões endêmicas surgem como importantes ferramentas para compreender a cadeia de transmissão e contribuir para o diagnóstico precoce de casos, especialmente de contatos e/ou de indivíduos suspeitos com possível infecção subclínica,

Os estudos geoespaciais também vem, de forma crescente e indispensável, ganhando espaço e buscam compreender a magnitude da transmissão da doença, apontando regiões prioritárias para implantação de novas ações de rastreamento de casos índices e seus comunicantes. Além disso, auxiliam na compreensão dos perfis logísticos dos pacientes nos territórios contemplados por esses estudos.

Assim sendo, investigações com técnicas moleculares (qPCR) associadas ao geoprocessamento no município de Governador Valadares e região, são necessárias para apresentar as reais contribuições dessas técnicas para um diagnóstico mais seguro e precoce da doença. Os achados desse estudo, devem subsidiar as novas estratégias do serviço no sentido de contribuir para o controle da transmissão da doença e do desenvolvimento de incapacidades físicas.

## **4. OBJETIVO**

### **4.1 Objetivo Geral**

Traçar o perfil clínico, sociodemográfico e laboratorial dos indivíduos notificados e com suspeição diagnóstica de hanseníase atendidos no CREDEN-PES no período de 2017 a 2021.

### **4.2 Objetivos específicos**

- 1) Descrever as características clínicas, epidemiológicas e laboratoriais dos participantes;
- 2) Avaliar a proporção de amostras de raspado intradérmico positivas no exame de baciloscopia (BAAR) e na detecção por qPCR;
- 3) Identificar, por meio do geoprocessamento, regiões com maior número de amostras positivas de raspado intradérmico de indivíduos suspeitos para hanseníase por meio do teste qPCR.

## 5 CASUÍSTICA

### 5.1 Área de Estudo

O CREDEN-PES, é uma unidade de saúde, cujo objetivo é prestar atenção especializada e vigilância integrada nos agravos hanseníase, tuberculose, leishmaniose tegumentar e visceral.

Os pacientes são referenciados pelas unidades de atenção primária à saúde, outras unidades de referência, profissionais do setor privado, encaminhados de outros municípios e/ou acolhidos por demanda espontânea.

Para os casos em tratamento, os familiares são acolhidos por toda equipe multiprofissional. O Creden-pes presta serviços ao Município e existe pactuação para a microregião de Governador Valadares e Resplendor. Funciona como referência para diagnóstico e apoio em hanseníase para outros municípios, tanto no atendimento médico quanto apoio diagnóstico com raspado intradérmico e avaliação dos seus comunicantes.

### 5.2 Desenho do estudo

Estudo de caráter transversal, envolveu coleta de dados cadastrais dos indivíduos com suspeição de hanseníase atendidos no CREDEN-PES, entre os anos de 2017 até julho de 2021. Foram utilizados prontuários médicos e notificações do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) dos participantes.

#### 5.2.1 Organização do Grupo de Estudo

Foram avaliadas 411 amostras de raspado intradérmico coletadas de acordo com o Manual de Hanseníase (BRASIL, 2010). Identificou-se 02 grupos de amostras: o primeiro foi proveniente de indivíduos notificados no SINAN como portadores de hanseníase e classificados como **casos**. O segundo foi constituído de indivíduos que apresentaram quadro de suspeição de hanseníase, por serem contatos, demanda espontânea, avaliação clínica, mas, sem notificação no SINAN e /ou diagnóstico de hanseníase constatado entre os anos de 2017 a julho de 2021. Estes foram denominados nesse estudo como **suspeitos**.

Os casos notificados no SINAN (n = 158) foram agrupados em Paucibacilares (PB) e Multibacilares (MB). O grupo PB constituiu-se de indivíduos com forma clínica

Tuberculoide ou Indeterminada, já o grupo MB, apresentou a forma clínica Dimorfa com baciloscopia positiva ou negativa bem como a forma clínica Virchowiana, com baciloscopia positiva.

### **5.2.2 Avaliação do índice baciloscópio (IB)**

O índice baciloscópio (IB) foi realizado no laboratório do CREDEN-PES por profissionais treinados por meio da coleta de raspado intradérmico em quatro sítios (lóbulo auricular, cotovelo contra-lateral e lesão, e na ausência de lesão, os dois cotovelos). As lâminas foram coradas pelo método de Ziehl-Neelsen e examinadas em microscopia com objetiva de imersão (100x) e o IB foi calculado de acordo com a escala logarítmica de Ridley, variando de 0 a 6. Este índice é obtido a partir da análise microscópica de 100 campos em cada amostra coletada. É o método de avaliação quantitativo preconizado e utilizado na leitura da baciloscopia em hanseníase (BRASIL, 2010).

### **5.2.3 Técnica de coleta, armazenamento e extração de DNA.**

Para o ensaio da qPCR (amplificação de DNA de *M. leprae*) as amostras de raspado intradérmico foram armazenadas em microtubo tipo eppendorf, estéril de 1,5ml com álcool a 70% e estocadas a temperatura de -20°C até processamento da qPCR.

A extração de DNA foi realizada utilizando o kit PuriLink – Thermo Fischer Scientific. As amostras foram descongeladas e em seguida centrifugadas a 13.200 RPM por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado, e ao *pellet*, foram adicionados 20 µL de solução de proteinase K e 180 µL de tampão de digestão genômica PuriLink (da marca Thermo Fischer Scientific). Em seguida, o material foi incubado a 55°C por 4 horas até a lise completa. Posteriormente, centrifugou-se a 13.200 RPM por 3 minutos em temperatura ambiente para remoção de partículas. Foram adicionados 20 µL de RNase A (fornecido pelo fabricante) ao lisado, agitado em vórtex e incubado à temperatura ambiente por 2 minutos. Após a incubação, foi adicionada solução contendo 200 µL de PuriLink Genomic Lysis (*Binding Buffer*) e 200 µL de Etanol 96-100% com posterior agitação em vórtex por 5 segundos. Todo o material foi



transferido para uma coluna PureLink Spin acoplada a um tubo coletor de 2 ml. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 10.000g por 1 minuto à temperatura ambiente para eliminação do líquido e retenção de moléculas de DNA e, eventualmente, proteínas na coluna. Foi realizada a lavagem da coluna com 500 µL de solução tampão 1 PureLink (*Genomic Wash*) e centrifugação a 10.000 g por um minuto em temperatura ambiente. Repetiu-se o processo de lavagem com 500 µL de solução tampão 2 PureLink (*Genomic Wash*), centrifugação a 13.000 g por 3 minutos à temperatura ambiente e posterior descarte do tubo coletor.

Ao final, a coluna foi acoplada em um microtubo de 1,5ml e adicionado 80 µL de solução PureLink (*Genomic Elution Buffer*) da Thermo Fischer Scientific no centro da coluna e o material foi incubado por 1 minuto em temperatura ambiente para maior eficiência na obtenção de DNA. Posteriormente, centrifugou-se a 13.000 RPM por 1 min, e repetiu-se esse processo com o mesmo microtubo, acrescentando-se 60 µL de solução de eluição PureLink (*Genomic Elution Buffer*) da Thermo Fischer Scientific, para recuperação de uma quantidade maior de DNA, conforme recomendação do fabricante.

A concentração de DNA no material eluído foi estimada por meio do espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). Amostras que apresentaram quantidade de DNA baixa, foram concentradas em concentrador à vácuo por 35 minutos a 40°C. Após a dosagem, o DNA extraído foi congelado a -20°C até o momento do ensaio de qPCR.

#### **5.2.4 Ensaio de PCR em tempo Real (qPCR) para amplificação do DNA de *M. leprae***

Os ensaios foram realizados no Instituto Lauro de Souza Lima (ILSL) em Bauru, São Paulo. É um Instituto de pesquisa que conta com *expertises* em diferentes áreas da saúde. Na área de hanseníase os pesquisadores são considerados referência Estadual e Federal, além de participarem como centro colaborador da OMS.

A qPCR foi realizada utilizando o sistema de amplificação TaqMan® qPCR. O alvo de amplificação foi a região gênica RLEP do *M. leprae* de 449pb. As sequências



dos iniciadores (Primers) e da sonda utilizadas no ensaio foram descritas por Martinez *et. al.* (2009) e estão apresentadas na tabela abaixo:

**Tabela 01:** Sequência dos primers e sonda utilizados na qPCR.

Gene	Descrição	Primer / Sonda	Sequência 5'---3'
RLEP	RLEP (Elemento repetitivo)	Forward	GCA GCA GTA TCG TGT TAG TGA A
		Reverse	CGC TAG AAG GTT GCC GTA T
		Sonda	CGC CGA CGG CCG GAT CAT CGA

Fonte: Adaptado de Martinez *et. al.*, 2009.

As reações foram otimizadas para um volume final de 20 µl, contendo 12,5µl de Master Mix (Luna® Universal Probe qPCR Master Mix, concentração 2x), 0,5µl 25mM de cada par de iniciadores e 6µl do DNA alvo na concentração de 20ng/µl.

A ciclagem seguiu às seguintes condições: temperatura inicial de desnaturação do DNA a 95°C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 58°C por 40 segundos e 72°C por 30 segundos, finalizando com uma extensão final de 72°C por 10 minutos.

O resultado da qPCR foi dado pelo número de ciclos – *cycle threshold* (Ct) em que a curva de fluorescência acumulada ultrapassa a linha de corte que pode ser detectada, sendo considerados valores positivos aqueles em que os Ct's foram menores que 37. O Valor do Ct, é inversamente proporcional à quantidade de DNA presente na amostra. Para os controles positivos foi utilizado DNA da cepa referência Thai 53 de *M. leprae*.

### **5.3 Organização dos dados**

Os dados sociodemográficos da população do estudo (Sexo, idade, raça e escolaridade), epidemiológicos (ano diagnóstico, classificação operacional, classificação clínica e operacional do serviço de saúde) e os dados moleculares (qPCR), compuseram as variáveis desse estudo, que posteriormente foram analisadas com georreferenciamento e análise estatística inferencial.

#### **5.3.1 Análise do Georreferenciamento**

A análise do georreferenciamento contextualizou a situação epidemiológica da hanseníase no territórios onde residiam os indivíduos do estudo, em especial, do município de Governador Valadares.

Foram gerados mapas esquemáticos com graduação de cores para apresentar a Prevalência lápsica (taxa de prevalência do período de estudo) e o Coeficiente de detecção médio de hanseníase da Gerência Regional de Saúde de Governador Valadares (GRS-GV). Foi realizada também análise temporal da concentração de indivíduos suspeitos de hanseníase positivos no teste qPCR, sobrepostos aos casos notificados do estudo.

Para a construção dos mapas, foram importados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) a base de dados gráficos e vetoriais (em inglês *s.hapefiles*), com os limites dos municípios do estado de Minas Gerais. As informações das GRS-GV foram construídas de acordo com as informações disponíveis na Web Page da Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais.

Os endereços dos indivíduos notificados e suspeitos de hanseníase, identificados no banco de dados foram transformados em coordenadas geográficas (DD°MM'S''X/Y) com o *Software Google Earth Pro* e analisados no *Open-source software Quantum GIS 3.14 Pi*. Os 150 bairros da cidade de Governador Valadares foram agrupados em 20 setores (1-20) em conformidade com a setorização assumida e disponibilizada pela Prefeitura Municipal de Governador Valadares.

#### **5.3.2 Análise estatística**

As informações clínicas, sóciodemográficas e laboratoriais foram organizadas em uma planilha Microsoft Excel e analisadas no Software Epi Info™ e apresentadas

em frequências absolutas e relativas. Afim de avaliar quantitativamente essas variáveis em relação à positividade para a qPCR, foi empregado o teste qui-quadrado ( $X^2$ ), sendo adotado o nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

As variáveis para análise incluíram: idade, sexo, cor da pele, modo de entrada no serviço de saúde, ano de diagnóstico, forma clínica, classificação operacional (MB e PB), índice baciloscópico e resultados da qPCR dos participantes do estudo.

#### **5.4 Comitê de Ética em Pesquisa**

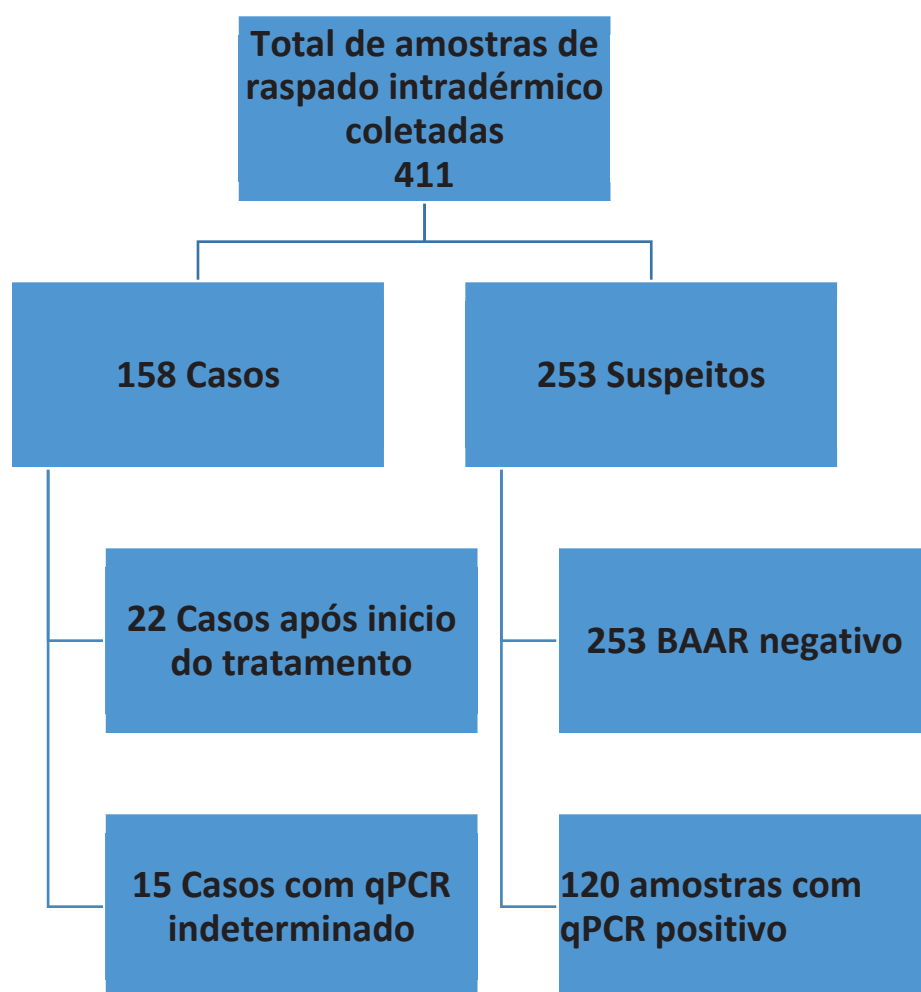
O presente estudo faz parte de um projeto maior intitulado “*Hanseníase, parasitoses e deficiência de micronutrientes: Novos paradigmas para combater uma doença antiga*” cujo protocolo de Pesquisa e TCLE foram submetidos à Plataforma Brasil e encaminhados ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFJF (CEP/UFJF), credenciado pelo CONEP e aprovado pelo CEP/UFJF sob o CAAE 56863016.6.1001.5147 (Anexo 01).

## 6 Resultados

### 6.1 - Análise dos dados sociodemográficos, clínicos e laboratoriais

#### 6.1.1 Grupo de Estudo

A presença do DNA de *M. leprae* em amostras de raspado intradérmico coletadas no período de 2017 a 2021, foi analisada de um total de 411 indivíduos. Desse total, 158 foram classificados como casos e 253 como suspeitos. As amostras foram analisadas conforme o fluxograma abaixo.

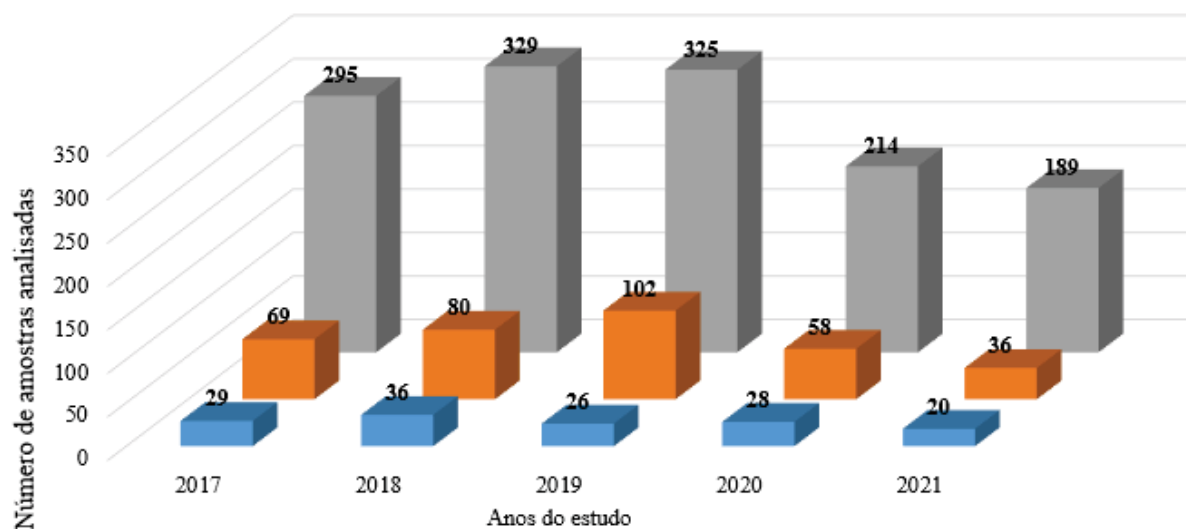


#### 6.1.2 Análise dos dados da qPCR

Nos anos de 2017, 2018, 2019 e 2020, a quantidade de notificações em comparação ao número de raspados intradérmicos analisados foram respectivamente 23,38%, 24,31%, 31,38% e 27,10%, já no ano de 2021, as notificações

corresponderam a 19,04% de raspados intradérmicos coletados. Ademais, a maior quantidade de amostras analisadas pelo teste da qPCR, foi o ano de 2021, com 69,44% das amostras de indivíduos notificados.

A figura 6, apresenta o número de amostras de raspado intradérmico coletadas no CREDENS-PES, número de indivíduos notificados e número de amostras avaliadas por qPCR. Em 2017 foram coletadas amostras de 295 indivíduos. Desses, 69 indivíduos foram notificados como portadores de hanseníase. A qPCR foi realizada em 33 amostras, do total de indivíduos notificados. Em 2018, dos 80 indivíduos notificados com hanseníase, 40 indivíduos foram analisados por meio do ensaio de qPCR. No ano de 2019 foram coletadas 325 amostras de raspado dérmico, das quais 102 indivíduos foram notificados. A qPCR foi realizada em 30 desses indivíduos. No período relativo ao ano 2020 o total de amostras coletadas foi de 214 apresentando 58 indivíduos positivos para hanseníase. Desses, 30 foram testados na qPCR. Finalmente, até meados de 2021, 189 coletas de raspado intradérmico foram realizadas, com 36 indivíduos notificados e desses, 25 amostras foram utilizadas para reação da qPCR.



*Número de amostras de raspado intradérmico*

	2017	2018	2019	2020	2021
Total de raspados intradérmicos realizados no CREDEN-PES	295	329	325	214	189
Indivíduos Notificados em Governador Valadares/ MG	69	80	102	58	36
Total de raspados intradérmicos avaliados na qPCR	33	40	30	30	25

**Figura 6.** Número de amostras de raspados intradérmicos realizados no CREDENS-PES. Número de indivíduos notificados com hanseníase e número de raspado intradérmico avaliado na qPCR nos indivíduos notificados, no período de 2017 julho de 2021.

### 6.1.3 Frequência da amplificação da qPCR em relação às variáveis sociodemográficas e classificação operacional dos indivíduos notificados.

A tabela 2 apresenta os dados da amplificação da qPCR relativos às variáveis sociodemográficas e classificação operacional. Verificou-se que 83.87% do sexo masculino e 80.00% do sexo feminino apresentaram qPCR positiva.

Com relação a variável idade, a faixa etária entre 40 e 69 anos apresentou grande número de casos com teste qPCR positivo. A variável raça, mostrou uma maioria de indivíduos da raça parda com uma frequência de 78.16% de resultados positivos para qPCR. Quanto a escolaridade, 89.66% dos indivíduos com ensino de 1° a 4° série incompleta, apresentaram qPCR positivo.

Considerando a classificação operacional, constatou-se que 57 indivíduos foram classificados como PB e 101 MB. Nesse grupo, 75.44% dos indivíduos PB e 86.14% MB, apresentaram qPCR positiva.

Analisou-se o modo de detecção, e verificou-se que dos 158 indivíduos notificados, 66,45% foram encaminhados. E de acordo com o resultado da qPCR, desses indivíduos, 82,86% apresentaram o teste positivo.

**Tabela 2.** Amplificação da reação qPCR em relação as variáveis sociodemográficas e classificação operacional dos indivíduos notificados com hanseníase.

		Amplificação no qPCR				P-value
		Positivo		Negativo		
		n	%	n	%	
Sexo	<b>Homens</b>	<b>78</b>	<b>83.87</b>	15	16.13	0.5306
	Mulheres	52	80,00	13	20,00	
Grupo etário	0-14	9	90,00	1	10,00	0.715
	15-19	6	85.71	1	14.29	
	20-29	9	81.82	2	18.18	
	30-39	16	84.21	3	15.79	
	<b>40-49</b>	<b>21</b>	<b>75,00</b>	7	25,00	
	<b>50-59</b>	<b>22</b>	<b>84.62</b>	4	15.38	
	<b>60-69</b>	<b>26</b>	<b>83.87</b>	5	16.13	
	70-79	17	89.47	2	10.53	
>80	4	57.14	3	42.86		
Raça	Branca	25	86.21	4	13.79	0.3177
	<b>Parda</b>	<b>68</b>	<b>78.16</b>	19	21.84	
	Preta	37	88.1	5	11.9	
Escolaridade	<b>1° a 4° Série incompleta</b>	<b>26</b>	<b>89.66</b>	3	10.34	0.598
	4° Série Completa do Ensino Fundamental	6	100,00	0	0,00	
	5° a 8° Série incompleta	32	82.05	7	17.95	
	Analfabeto	15	75,00	5	25,00	
	Educação Superior Completa	7	77.78	2	22.22	
	Educação Superior Incompleta	2	66.67	1	33.33	
	Ensino Fundamental Completo	6	100,00	0	0,00	
	Ensino Médio Completo	16	72.73	6	27.27	
	Ensino Médio Incompleto	15	88.24	2	11.76	
	Ignorado	5	71.43	2	28.57	
Classificação operacional	Paucibacilar	43	75.44	14	24.56	0.0907
	<b>Multibacilar</b>	<b>87</b>	<b>86.14</b>	14	13.86	
Modo de detecção	Demanda espontânea	21	80.77	5	19.23	0.8559
	<b>Encaminhamento</b>	<b>87</b>	<b>82.86</b>	18	17.14	
	Exame de contato	1	50,00	1	50,00	
	Exame de coletividade	1	100,00	0	0,00	
	Exame de contatos	9	90,00	1	10,00	
	Transferência entre UBS	1	100,00	0	0,00	
	Transferência do mesmo município	2	100,00	0	0,00	
	Transferência de outro estado	1	100,00	0	0,00	
	Não Informado	7	30,00	3	70,00	

#### **6.1.4 Proporção de casos e suspeitos de hanseníase, segundo as variáveis sexo, faixa etária, baciloscopia e qPCR**

A tabela 3 mostra os resultados referentes a 411 amostras de raspado intradérmico coletadas de indivíduos casos e suspeitos, considerando as seguintes variáveis sexo, grupo etário, exame de baciloscopia e qPCR.

Verificou-se que do total de casos, 58.86% eram do sexo masculino e 41.14% do sexo feminino. Entre os suspeitos 53,36% eram do sexo masculino e 46,64% do sexo feminino.

Observou-se um maior número de casos e de suspeitos compreendidos entre 40 e 69 anos.

É importante observar que entre os casos apenas 34,18%, apresentaram baciloscopia positiva. Como esperado, todos os indivíduos suspeitos apresentaram baciloscopia negativa, com significância de  $p < 0,0001$ . Os resultados da qPCR mostraram que 82,28% dos casos apresentaram qPCR positivo. Já nos suspeitos, 47,43% apresentaram resultado positivo com significância de  $p < 0,0001$ .

De forma geral isso significa que os indivíduos notificados apresentaram a maioria de resultados positivos e minoria negativos no teste da qPCR. Ao compararmos os indivíduos suspeitos, obtivemos um importante número de resultados positivos.



**Tabela 3:** Frequência das variáveis sexo, faixa etária, baciloscopia e qPCR entre os indivíduos notificados e suspeitos de hanseníase.

		Indivíduos Notificados		Suspeitos		<i>p-value</i>
		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	
Sexo	<b>Masculino</b>	<b>93</b>	<b>58.86</b>	<b>135</b>	<b>53.36</b>	0.275
	Feminino	65	41.14	118	46.64	
Grupo etário*	0-14	10	6.33	4	1.75	0.2138
	15-19	7	4.43	9	3.93	
	20-29	11	6.96	12	5.24	
	30-39	19	12.03	30	13.1	
	<b>40-49</b>	<b>28</b>	<b>17.72</b>	<b>39</b>	<b>17.03</b>	
	<b>50-59</b>	<b>26</b>	<b>16.46</b>	<b>56</b>	<b>24.45</b>	
	<b>60-69</b>	<b>31</b>	<b>19.62</b>	<b>52</b>	<b>22.71</b>	
	70-79	19	12.03	20	8.73	
>80	7	4.43	7	3.06		
Baciloscopia	Positiva	54	34.18	0	0	<0.0001
	<b>Negativa</b>	<b>104</b>	<b>65.82</b>	<b>253</b>	<b>100</b>	
Amplificação no qPCR	<b>Positivos</b>	<b>130</b>	<b>82.28</b>	120	47.43	<0.0001
	Negativos	28	17.72	133	52.57	

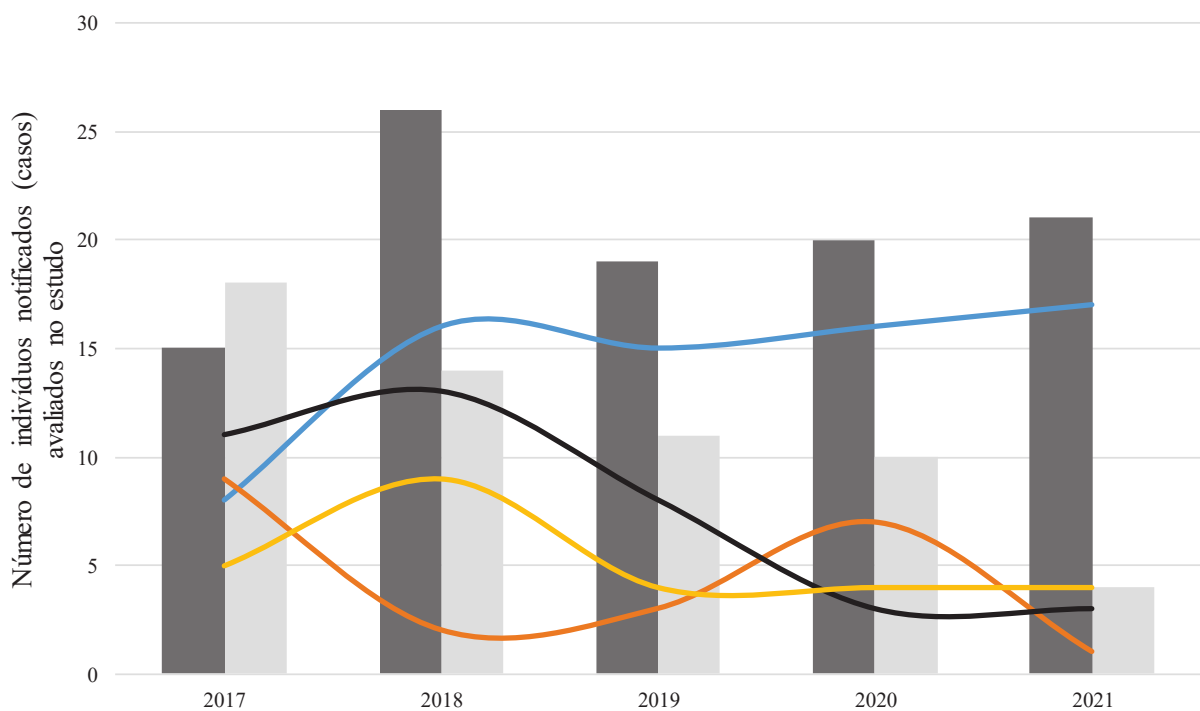
\* No grupo dos suspeitos, 24 indivíduos não possuíam informações sobre a idade.

### 6.1.5 Distribuição do número de indivíduos notificados com hanseníase de acordo com a classificação operacional e a forma clínica.

A figura 7 apresenta a distribuição dos indivíduos do estudo que foram notificados com hanseníase. Estes pacientes foram organizados de acordo com a classificação operacional (PB e MB) e com a forma clínica (Tuberculóide, Indeterminado, Dimorfo e Virchowiano).

Verificou-se que em 2017, os casos PB representaram 54.50% dos indivíduos notificados enquanto os MB representaram 45.50%. Considerando a forma clínica, observou-se que a forma tuberculóide correspondeu a 33.30% por outro lado a virchowiana representou 15.10% do total de notificados.

É interessante notar que nos anos seguintes, ocorreu um aumento 64.60% do número de casos MB entre 2017 a julho de 2021. Até julho de 2021 constatou-se que os casos MB corresponderam a 84.00% e desses 17 eram dimorfos.



*Número de indivíduos notificados (casos)*

	2017	2018	2019	2020	2021
Dimorfos	8	16	15	16	17
Indeterminados	9	2	3	7	1
Tuberculóides	11	13	8	3	3
Virchowianos	5	9	4	4	4
Multibacilares	15	26	19	20	21
Paucibacilares	18	14	11	10	4

**Figura 7.** Distribuição do número de indivíduos notificados com hanseníase segundo a classificação operacional e clínica.

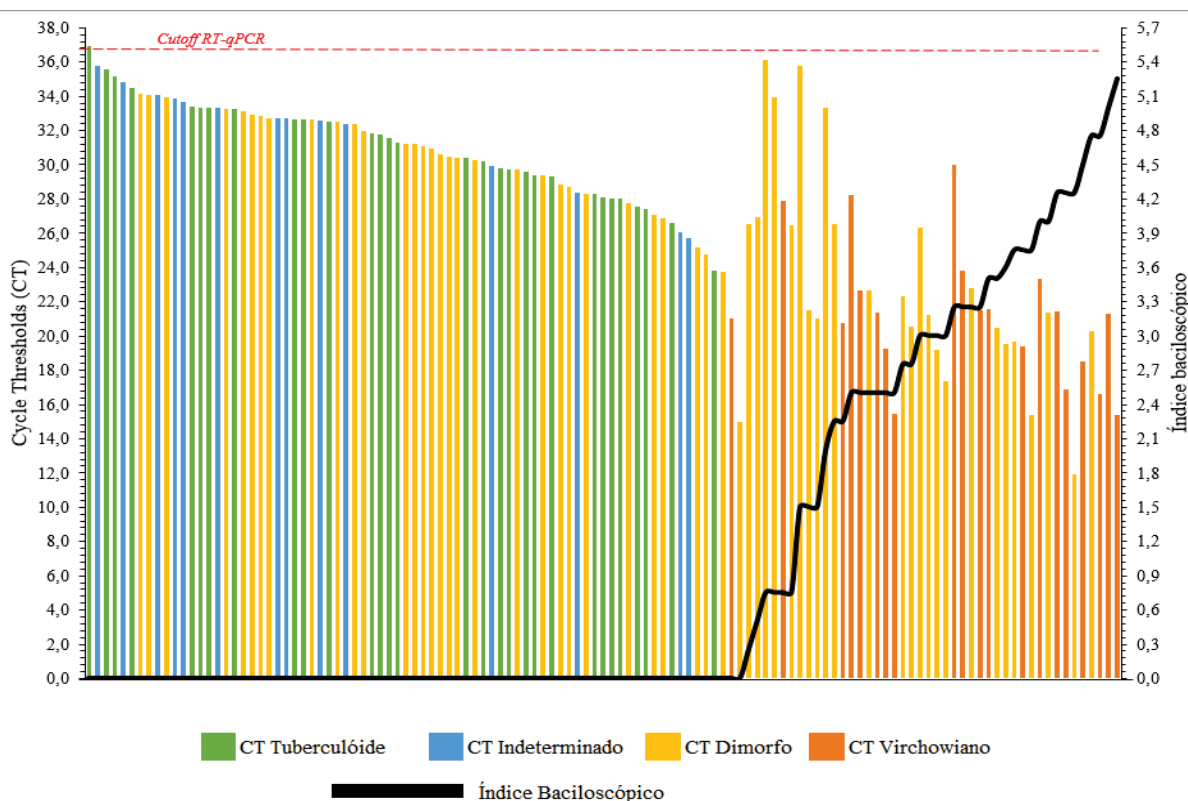
### 6.1.6 Análise dos parâmetros: Ct da qPCR, baciloscopia e forma clínica

A figura 8, apresenta a análise entre os parâmetros: Ct da qPCR, baciloscopia e a forma clínica. Para a construção desse gráfico, foram utilizados os dados de 122 das 136 amostras de casos. Essas 122 amostras eram provenientes de indivíduos

que na coleta do raspado intradérmico não haviam iniciado o tratamento e foram positivas na qPCR.

Verificou-se que 56 amostras provenientes de casos da forma clínica tuberculóide e indeterminada, apresentaram BAAR negativo. Entretanto, a qPCR foi positiva para 82,14% dessas amostras. Entre os indivíduos classificados como Virchowianos, 95% das amostras apresentaram os testes duplamente positivos para BAAR e qPCR. Observou-se que entre os 60 casos classificados como dimorfos, 91,67% apresentaram qPCR positiva, entretanto, apenas 43,33% desses indivíduos apresentaram BAAR positivo.

Importante notar que 1 (um) caso classificado como dimorfo apresentou um valor de *Ct* igual a 16, mas na baciloscopia o resultado foi negativo.

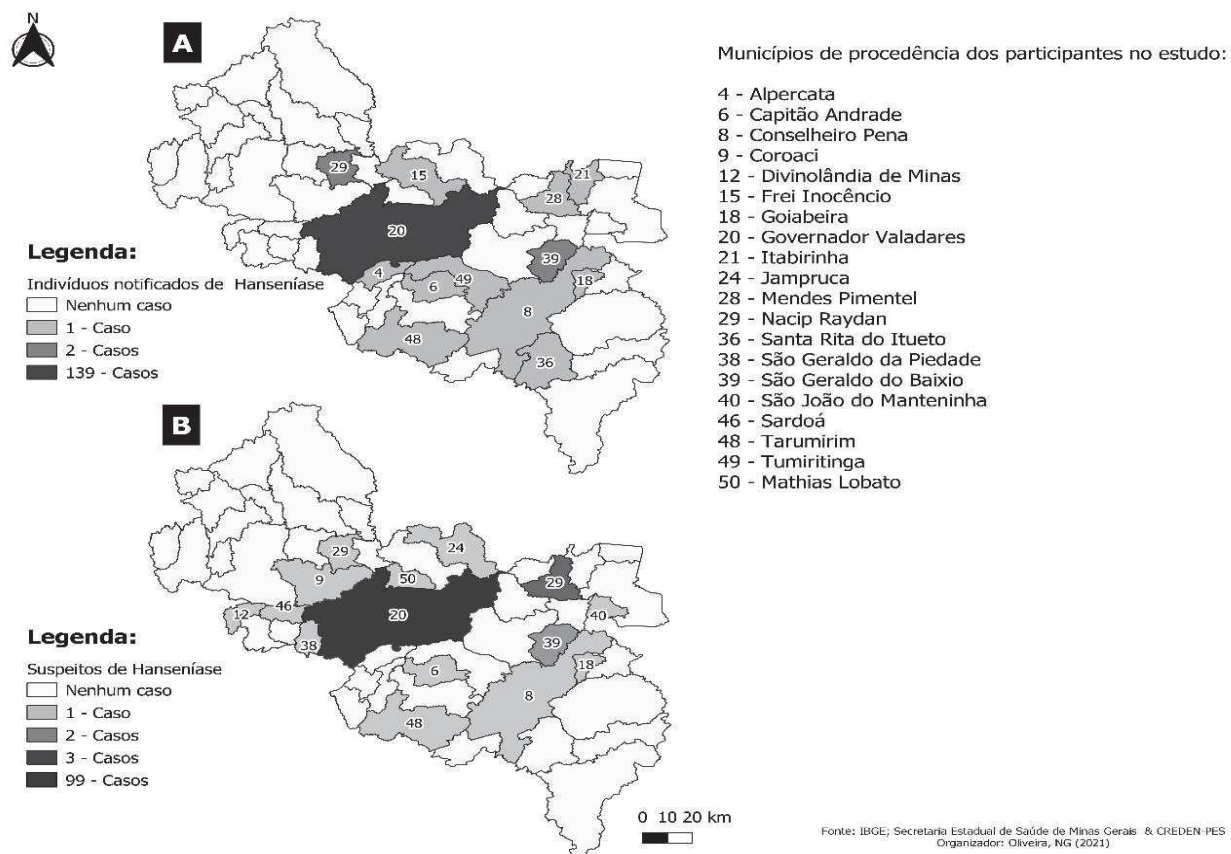


**Figura 8:** Análise dos parâmetros: *Ct* na qPCR, índice baciloscópico e forma clínica dos indivíduos notificados com hanseníase.

## 6.2 - Análise Geoespacial

### 6.2.1 Concentração de indivíduos notificados e suspeitos para hanseníase residentes nos municípios da GRS-Governador Valadares

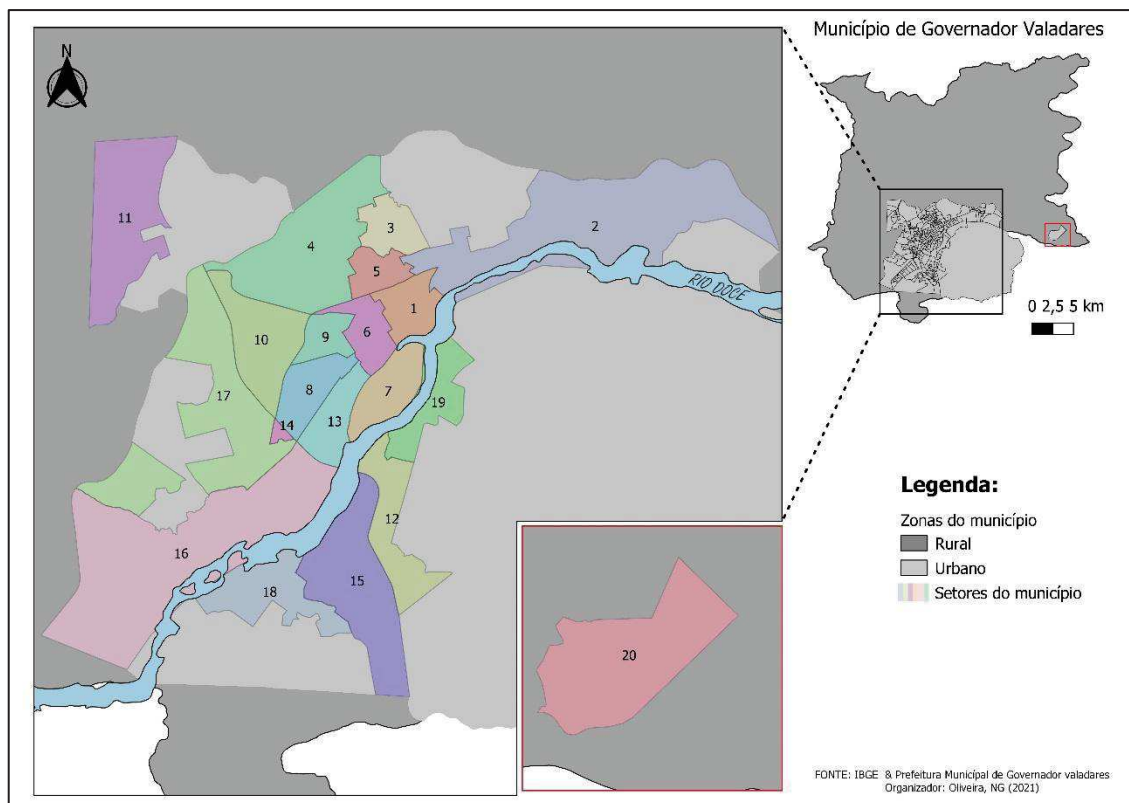
A figura 9, apresenta o mapa com os municípios de residência dos indivíduos que participaram do estudo. Na figura 9A, Governador Valadares representou o município com maior número de notificações para hanseníase no período de 2017 a 2021. Da mesma forma, para os suspeitos mostrados na figura B, Governador Valadares se destacou com o maior número.



**Figura 9.** Concentração de indivíduos notificados (A) e suspeitos para hanseníase (B) de acordo com o município de residência na GRS-Governador Valadares.

## 6.2.2 Setorização da cidade de Governador Valadares

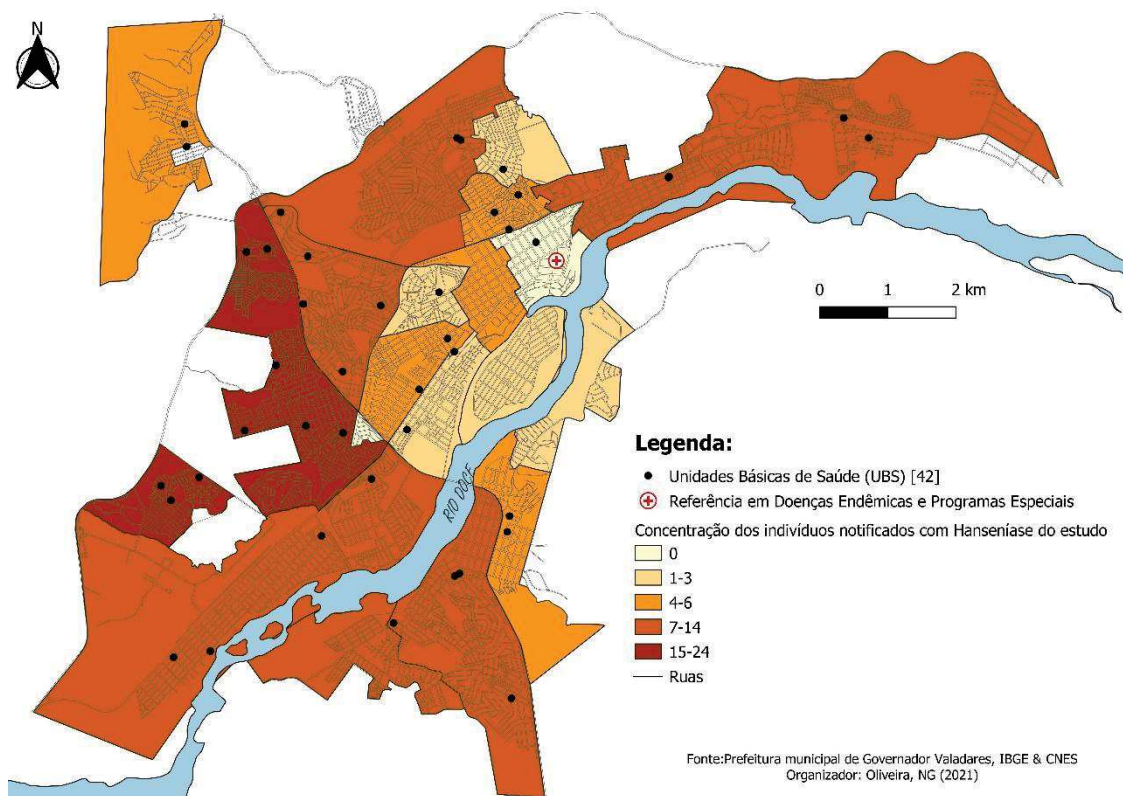
A figura 10, apresenta o mapa de Governador Valadares e a forma como é organizado. Verificou-se que o município é dividido em 20 setores, cada setor contendo entre 01 a 41 bairros.



**Figura 10.** Setorização da cidade de Governador Valadares.

## 6.2.3 Concentração de indivíduos notificados por setor na cidade de Governador Valadares

A figura 11, apresenta os setores da cidade de Governador Valadares, destacando aqueles com maior número de indivíduos notificados. Verificou-se que o setor 17 concentrou o maior número de casos 27 (16,67%). Diferentemente, o setor 1 (um) não apresentou nenhum caso. A figura também mostra a distribuição das unidades de saúde, realçando um maior número no setor 17.



**Figura 11.** Concentração dos indivíduos notificados com hanseníase do estudo no período de 2017 a 2021 nos setores do Governador Valadares e distribuição espacial das unidades básicas de saúde do perímetro urbano.

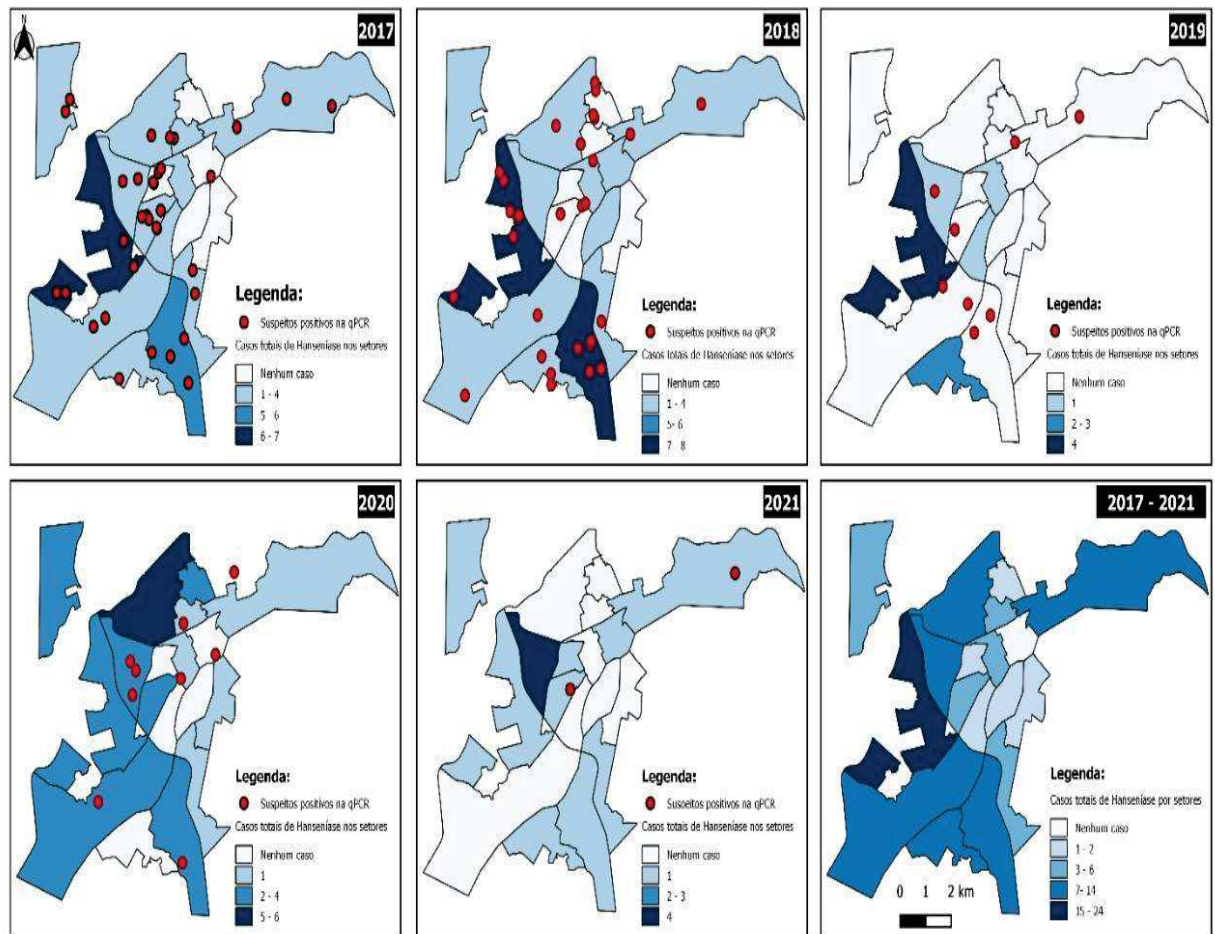
#### 6.2.4 Análise temporal da concentração de casos notificados e de suspeitos para hanseníase por meio do teste qPCR positivo.

A figura 12 apresenta a distribuição dos casos notificados e suspeitos de hanseníase no período de 2017 a 2021 na cidade de Governador Valadares. Vale ressaltar que o setor 17, apresentou o maior número de casos entre os anos de 2017 a 2019. É interessante observar que para o mesmo período ocorreu uma maior distribuição dos suspeitos com a reação de qPCR positiva para os setores mais próximos do setor 17.

Das 120 amostras suspeitas que apresentaram qPCR positivo no período avaliado, observou-se que no ano de 2017, 41 dessas amostras foram da cidade de Governador Valadares, representando 82,92% do total. Uma proporção semelhante de amostras positivas ocorreu nos anos subsequentes (2018, 2019, 2020). No entanto, até meados de 2021, 04 (quatro) amostras apresentaram qPCR positivo e



50% dessas eram de Governador Valadares.



Fonte: Prefeitura Municipal de Governador Valadares & CREDEN-PES  
Organizador: Oliveira, NG (2021)

**Figura 12.** Análise temporal da concentração de casos e suspeitos de hanseníase positivos para qPCR. \* 12 amostras não possuíam data de coleta e não foram incluídas na análise do mapa temporal.

## 7 Discussão

A detecção precoce da hanseníase é uma estratégia importante para interromper a cadeia de transmissão do *M. leprae* e prevenir a incapacidade física, considerada uma consequência grave. O diagnóstico é essencialmente clínico, e em muitos casos os sintomas são sutis e, às vezes passam despercebidos mesmo por especialistas. Os exames de baciloscopia e histopatologia, são utilizados como auxílio do diagnóstico clínico e são úteis na categorização espectral e no tratamento da doença (WOROBEK, 2012.). Em regiões onde a endemicidade é maior, métodos sorológicos e moleculares podem ser empregados, principalmente em contatos domiciliares de pacientes com intuito de identificar indivíduos com possibilidade de adoecimento (BANERJEE *et. al.*, 2010; MARTINEZ *et. al.*, 2006; CALEFFI *et. al.*, 2012; DUTHIE *et. al.*, 2007; CABRAL *et. al.*, 2013; AMORIM *et. al.*, 2016; FRADE *et. al.*, 2017).

Em nosso estudo, dentre os casos de hanseníase, homens pardos com idade de 40 a 69 anos, com baixa escolaridade, classificados como MB, foram os mais presentes. Nossos resultados corroboram com os dados do levantamento epidemiológico relatados pelo Ministério da Saúde entre os anos de 2015 a 2019, onde verificou-se que no acumulado desse período, indivíduos pardos e do sexo masculino prevaleceram entre os casos de hanseníase (Brasil, 2021). Para o ano de 2019 a faixa etária de 40 a 79 anos de idade concentrou maior número de casos. Ribeiro *et. al.*, (2019), avaliaram a prevalência e distribuição do *M. leprae* em um município de média endemicidade em Minas Gerais e constataram que todos os casos eram adultos ou idosos.

Alguns fatores podem se associar para uma maior vulnerabilidade individual que contribui para o aumento da hanseníase em determinadas localidades, e podem ser destacados como socioeconômico e ambiental. Na Índia há uma associação importante entre o grau de incapacidade e o nível educacional do indivíduo (GUTHI, AREPALLI e GUANAPA, 2016). Lages *et. al.* (2018), verificaram que 49,5% dos indivíduos examinados apresentavam algum grau de incapacidade no diagnóstico, e desses mais de 60% eram iletrados. Analisando associação do nível de escolaridade com incapacidade, os autores confirmaram que indivíduos iletrados apresentaram maior chance (82%) de desenvolver incapacidade física em relação aqueles que



possuíam ensino fundamental. Posteriormente Costa *et. al.*, (2020), observaram que 72% dos participantes do estudo, possuíam apenas o ensino fundamental completo

O boletim epidemiológico do Ministério da Saúde (BRASIL, 2021) indicou que 79,5% dos casos notificados foram classificados como MB. Em Rondonópolis-MT, no período de 2001 a 2010, Souza, Neto e Lisboa (2018), avaliaram o perfil epidemiológico da hanseníase, e observaram que os casos MB corresponderam a 52% das notificações. Dados semelhantes foram observados por Cardoso e Gomides (2020), que realizaram estudo em Governador Valadares avaliando o contexto clínico e epidemiológico no município. Os autores verificaram que o município persiste com alta endemicidade. Avaliando as notificações entre os anos de 2015 a 2019, constataram que a frequência de casos MB foi de 56,3% (218 casos).

Sobre o Modo de Detecção nossos dados são corroborados por Ferreira *et. al.*, (2020), que mostraram que a maioria dos casos notificados foram encaminhados, correspondendo a 54,45% dos diagnósticos.

Os achados são preocupantes, porque os indivíduos pertencem a uma faixa etária economicamente ativa, e podem ser os principais transmissores da doença. Quanto ao nível de escolaridade, indivíduos que tem maior compreensão sobre informações de saúde, buscam uma unidade de saúde o mais breve possível, diminuindo o diagnóstico tardio e reduzindo a transmissão. Além disso, casos classificados como MB, possuem maior possibilidade de transmissão da doença, tornando o diagnóstico precoce, fundamental para reduzir a transmissão. Já os encaminhamentos aos Centros de Referência realçam a dificuldade de descentralização do diagnóstico de hanseníase na APS.

Além dos exames complementares de rotina para diagnóstico da hanseníase, é importante considerar a utilização de testes moleculares como ferramenta auxiliar. Sabe-se que a identificação de contatos com qPCR positivo para *M. leprae* é fundamental para o diagnóstico precoce e interrupção da cadeia de transmissão da hanseníase. Os dados da tabela 3, mostraram que 120 indivíduos do grupo suspeitos (47,43%), apresentaram qPCR positivo para o gene RLEP.

Goulart & Goulart (2008), relataram que entre diversos marcadores de ácido nucleico para diagnóstico da hanseníase, três apresentaram maior sensibilidade e

especificidade (RLEP, Ag 85B e 16S rRNA). Posteriormente, Banerjee *et. al.*, (2010), verificaram que entre 110 contatos de MB e 72 de PB, 12 contatos de MB apresentaram PCR positivo utilizando swab nasal. Entretanto, entre os PB, apenas um indivíduo apresentou o teste positivo. Martinez *at. al.* (2011) constataram que o ensaio de qPCR utilizando o gene RLEP pode ser utilizado para melhor identificação de pacientes devido à alta sensibilidade, 100% para casos MB e 80,5% para PB. Esses autores encontraram resultado positivo para quatro amostras de indivíduos considerados sadios e concluíram que tal possibilidade pode ocorrer em estágios subclínicos de uma infecção pelo *M. leprae*. E, segundo Cardoso *et. al.* (2011), a ocorrência dessa bactéria em uma forma dormente dentro de granulomas é possível. Mais recentemente, Gama *at. al.*, (2019) avaliaram 113 contatos domiciliares de pacientes com hanseníase, sendo 61 contatos de MB e 52 contatos de PB. Entre os contatos de MB e PB, 19,7% e 11,5% apresentaram, respectivamente, resultado positivo para o DNA de *M. leprae* pelo método de qPCR e segundo os autores, um indivíduo foi diagnosticado posteriormente com hanseníase com a forma operacional PB.

Diante dos resultados desses estudos, torna-se relevante acompanhar os participantes considerados suspeitos que apresentaram qPCR positivo. Avaliar a possibilidade de adoecimento, assim como investigar seus comunicantes, verificando a transmissão da doença no ambiente domiciliar.

Em nosso estudo identificamos um maior número de casos MB, com predominância da forma clínica dimorfa. Sabe-se que o diagnóstico e classificação, dos casos dimorfos é muitas vezes dificultado, uma vez que a baciloscopia desses indivíduos pode ser positiva ou negativa. Nesse sentido, é possível que alguns casos passem despercebidos pelo serviço de saúde, tornando necessário um maior investimento na capacitação das equipes. Além disso, o processo de descentralização do Serviço para diagnóstico e tratamento da hanseníase, em nosso Município, não tem acontecido, sobrecarregando a Referência com os cuidados da Atenção Primária.

Em concordância com os nossos dados, tem sido relatado uma maior prevalência da forma clínica dimorfa, especialmente em indivíduos idosos (Pêga *et. al.*, (2020, Rocha, Nobre e Garcia 2020).

Outro ponto importante que realçamos foi o grande número de amostras de raspado dérmico com IB zero, mas, com resultado positivo para qPCR. Consideramos a relevância da continuidade desse tipo de avaliação, uma vez que nossas amostras apresentaram um grande número da forma clínica dimorfa bem como casos PB, o que contribuiu para um maior número de resultados negativos de IB.

Diante disso, como os resultados de qPCR foram positivos para a grande maioria das nossas amostras, reforçamos a necessidade da implementação de métodos mais sensíveis para o diagnóstico conclusivo da hanseníase.

Foi preocupante a identificação de dois casos de pacientes (virchowiano e dimorfo) com IB zero e qPCR positivo. Nesses casos, o valor de *Ct* nas amostras indicou elevada presença de DNA do *M. leprae*. Sabe-se que vários fatores podem comprometer o resultado de uma baciloscopia, desde a coleta do raspado dérmico, a coloração, a microscopia e até mesmo a possibilidade de equívocos do registro no SINAN. Essa situação também foi relatada por Sartori (2015) onde o autor descreve sobre algumas amostras positivas para baciloscopia, e negativas para testes moleculares como a qPCR e vice e versa,

Gama *et. al.*, (2019) avaliaram o desempenho da qPCR comparando com a baciloscopia, em casos PB e MB. Os autores observaram que 25,0% dos pacientes PB apresentaram DNA de *M. leprae*, tanto em amostra de sangue como de raspado dérmico. Entretanto, no grupo MB, a qPCR foi positiva para 69,6% dos pacientes e baciloscopia positiva em 56,5%. Ao compararem todas as amostras investigadas, os autores observaram que foi possível identificar DNA do *M. leprae* em 48,8% das amostras, e a baciloscopia foi positiva em apenas 30,2%.

Nossos resultados mostraram uma elevada porcentagem de qPCR positiva (91.67%) entre os pacientes da forma clínica dimorfa comparando com o IB que foi positivo em apenas 43,3% dos indivíduos. Esses dados novamente enfatizam a importância da utilização de métodos moleculares para o auxílio no diagnóstico da hanseníase.

Sabe-se que os estudos de georreferenciamento no contexto da saúde, são importantes para análises e avaliação dos riscos à saúde coletiva, principalmente os relacionados com meio ambiente e o perfil socioeconômico da população (SKABA, *et.*

al. 2004). Hino *et. al.*, (2006), relatam que a análise da distribuição das doenças e seus determinantes nas populações, no espaço e no tempo é fundamental dentro da epidemiologia, e envolve algumas questões como quem adoece, quando e como ocorreu o adoecimento.

Nesse estudo a análise geoespacial mostrou que muitos municípios pertencentes a SRS-Governador Valadares apresentaram casos e suspeitos de hanseníase atendidos no CREDEN-PES. Apesar do Município de Governador Valadares não possuir pactuação para atendimento e acompanhamento da hanseníase de outros Municípios, Gov. Valadares assume o papel de dar suporte quanto à realização de exames histopatológicos, raspado intradérmicos, e diagnóstico de Municípios que compõem a SRS-GV.

Na cidade de Gov. Valadares, o setor 17 concentrou o maior número de casos de hanseníase (16,67%). Em um estudo anterior, Rodrigues (2012) verificou que o risco de adoecimento variava entre os índices 1,34 a 6,49 em diferentes setores na cidade de Gov. Valadares. Além disso, a autora constatou a existência de *clusters*, como por exemplo o bairro Turmalina, que está localizado no setor 17, identificado em nosso estudo.

Mediante essa informação, fica evidente a importância do acompanhamento de casos e possíveis contatos de pacientes com hanseníase, por meio do georreferenciamento, identificando de uma forma mais precisa as residências dos indivíduos infectados para um controle mais eficaz da doença.

Nosso estudo permitiu identificar um maior número de casos e suspeitos nos anos de 2017 e 2018, e uma predominância desses indivíduos residindo próximo aos setores 15 e 17. Esses setores possuem aglomerados de casos e contatos o que reforça a necessidade do Município em priorizar as ações de controle nessas localidades.

Quanto às limitações do estudo, vale relatar uma redução do número de amostras de raspado intradérmico coletadas no CREDEN-PES a partir do ano de 2019. Essa redução ocorreu devido a questões operacionais e ao início da pandemia da COVID-19, o que comprometeu o acesso dos indivíduos aos serviços de saúde. Apesar dessa redução no ano de 2020, foi possível observar um importante número de indivíduos suspeitos no setor 10 e esse setor no ano de 2021, apresentou maior concentração casos.

Isso nos leva a inferir, que os indivíduos com suspeição de hanseníase tendo o teste qPCR positivo, podem estar com uma infecção subclínica. E mais importante ainda, podem até mesmo estarem transmitindo o *M. leprae* para indivíduos mais susceptíveis.

Assim, estudos que busquem acompanhar esses indivíduos com suspeição e seus contatos, se fazem necessários para avaliar a taxa de adoecimento bem como a possibilidade de transmissão.

Acreditamos que nossos dados contribuem para potencializar o diagnóstico precoce e assim auxiliar no controle da hanseníase no município de Governador Valadares e entorno, onde essa endemia permanece como um agravo preocupante.

## 8 CONCLUSÃO

Esse estudo permitiu concluir que das 411 amostras de raspado intradérmico, 158 foram obtidas de casos, com predominância de indivíduos com idade entre 40 e 69 anos, com forma clínica dimorfa e desses apenas 43,3% apresentaram IB positivo.

Dos 158 indivíduos notificados, apenas 34,18% apresentaram baciloscopia positiva. Constatou-se que 82,28% dos casos apresentaram qPCR positivo.

Como esperado do total de 253 amostras coletadas de indivíduos com suspeição a baciloscopia foi negativa, no entanto o resultado da qPCR foi positiva para 47,43% das amostras.

No município de Governador Valadares identificou um maior número de casos e suspeitos nos anos de 2017 e 2018, e uma predominância desses indivíduos residindo próximo aos setores 15 e 17.

Torna-se relevante monitorar esses indivíduos suspeitos para hanseníase, especialmente os locais de residência daqueles que foram positivos no teste da qPCR.

A detecção de DNA de *M. leprae*, especialmente em contatos com possível infecção subclínica, contribuirá para o maior e melhor controle da doença.

## 9 PERSPECTIVAS FUTURAS

É do nosso interesse dar continuidade a esse estudo por meio do acompanhamento e identificação de possíveis suspeitos que vierem a adoecer, o que favorece o tratamento precoce e a prevenção de incapacidades.

Realizar a amplificação dos genes *rpoB*, *folp1* e *gyrA* nas amostras que apresentaram qPCR positivo e fazer o sequenciamento desses genes para identificação de possíveis mutações, responsáveis pelo caráter de resistência às drogas utilizadas no tratamento da hanseníase.

## REFERÊNCIAS

Alliance against leprosy Institute; disponível em: <  
[https://www.allianceagainstleprosy.org/hanseníase-numero-de-pacientes-que-  
comecam-tratamento-ja-com-sequelas-fisicas-aumenta-no-brasil/](https://www.allianceagainstleprosy.org/hanseníase-numero-de-pacientes-que-comecam-tratamento-ja-com-sequelas-fisicas-aumenta-no-brasil/)>; acesso em  
06/04/2022.

ALMEIDA, E. C., *et. al.*; Detection of *Mycobacterium leprae* DNA by Polymerase Chain Reaction in the Blood and Nasal Secretion of Brazilian Household Contacts; **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**; v. 99 (5), p. 509-512; 2004.

AMORIM, F. M. *et al.* Identifying leprosy and those at risk of developing leprosy by detection of antibodies against LID-1 and LID-NDO. **PLoS. Negl. Trop. Dis.**, v. 10, n. 9: Sep. 2016.

ANDRADE, A. R. C., *et. al.*; Soroprevalência do teste ML Flow em contatos de hanseníase de Minas Gerais; **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**; v. 41, n. 2, p.56-59; 2008.

AZEVEDO, M. C. S., *et. al.*; qPCR detection of *Mycobacterium leprae* in biopsies and slit skin smear of different leprosy clinical forms; **Braz. J. Infect. Disease**; 2016.

AZULAY, R. D.; AZULAY, D. R. Dermatologia. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

BANERJEE, S. *et al.* Multiplex PCR technique could be an alternative approach for early detection of leprosy among close contacts - a pilot study from India. **BMC Infectious Diseases**, v. 10, p. 252, 2010.

BANCO DE DESENVOLVIMENTO DE MINAS GERAIS - BDMG. **BDMG Orienta** – Série Cidades Mineiras: Governador Valadares. Belo Horizonte: BDMG, 2021. Disponível em:<<https://bdmgorienta.bdmg.mg.gov.br/governador-valadares-cidades-mineiras>>. Acesso em 06/04/2022.



BARBIERI, R. R., *et. al.*; Quantitative polymerase chain reaction in paucibacillary leprosy diagnosis: A follow-up study; **PLoS. Negl. Trop. Dis**; v. 13(3); 2019.

BENJAK, A., *et. al.*; Phylogenomics and antimicrobial resistance of the leprosy bacillus *Mycobacterium leprae*; **Nature Communications**; v.9; 2018.

BRASIL. IBGE. **Censo Demográfico**, 2019. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/mg/governador-valadares.html>>. Acesso em 31/03/2020.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Cidades**: Governador Valadares. Disponível em:<[ibge.gov.br](http://ibge.gov.br)>. Acesso em: 09/04/2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Guia para o Controle da hanseníase**. Brasília: ministério da Saúde, 2002. Disponível em: <[http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia\\_controle\\_hanseniose\\_cab10.pdf](http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_controle_hanseniose_cab10.pdf)>. Acesso em: 16 fev. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças. **Diretrizes para vigilância, atenção e eliminação da Hanseníase como problema de saúde pública: manual técnico-operacional**. Brasília: Ministério da Saúde, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de procedimentos técnicos Baciloscopia em Hanseníase**; Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Boletim Epidemiológico**; Brasília: Ministério da Saúde, 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças e Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. **Nota Técnica nº 16/2021**; Brasília: Ministério da Saúde, 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças. **Boletim Epidemiológico**. Brasília: Ministério da Saúde, 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças. **Boletim Epidemiológico**. Brasília: Ministério da Saúde, jan. 2022.

CABRAL, P. B. et al.; Anti-PGL1 salivary IgA/IgM, serum IgG/IgM, and nasal Mycobacterium Leprae DNA in individuals with household contact with leprosy. **Int. J. Infect. Dis.**, v. 17, n. 11, nov; 2013.

CALEFFI K. R. et al.; Use of the polymerase chain reaction to detect Mycobacterium Leprae in urine. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.**, v. 45, n. 2, p. 153-157. 2012.

CARDOSO, D. M. e GOMIDES, T. A. R.; Contexto clínico-epidemiológico dos casos de hanseníase notificados em Governador Valadares, Minas Gerais – Brasil, entre 2015 e 2019; **Saúde Santa Maria**; v.46, n. 2; 2020.

CARDOSO, C. C. et al. Leprosy susceptibility: genetic variations regulate innate and adaptive immunity, and disease outcome. **Future Microbiol.**, v. 6, p. 533-549. 2011.

CARDOSO, L. P. V. et al. Development of a quantitative rapid diagnostic test for multibacillary leprosy using smart phone technology. **Bio. Med. Central Infectious Diseases**, London, v. 13, n. 497, oct. 2013.

CARVALHO, R. S., *et. al.*; Early detection of *M. lerae* by qPCR in untreated patients and their contacts: results for nasal swab and palate mucosa scraping; **European Journal of Clinical Microbiology e Infectious Diseases**; 2018.

COLE, S. T., *et. al.*; Massive gene decay in the leprosy bacillus; **Nature**; v.409, p. 1007-1011; 2001.

CORTELA, D. C. B., *et. al.*; Aceitabilidade da quimioprofilaxia em área endêmica para hanseníase: projeto PEP-Hans Brasil; **Cad. Saúde Pública**; n.36 v. 3; 2020.

COSTA, N. M. G. B., *et. al.*; Perfil sociodemográfico e grau de incapacidade do portador de hanseníase em um centro de referência no estado do Ceará; **Rev. Braz. Journal. Health**; v. 6, n. 6, p. 41439-41449; jun; 2020.

CUNHA, F. M. B., *et. al.*; Pure neural leprosy: diagnostic value of the polymerase chain reaction; **Muscle e Nerve**; v. 33, n. 3, p. 409-414, 2006.

DIORIO, S. M., *et. al.*; Recidiva Associada a Resistência a Drogas na Hanseníase; **Hansenologia Internationalis**; n.34, v.1, p. 37-42; 2009.

dos SANTOS, D. S., *et. al.*; Chemoprophylaxis of leprosy with rifampicin in contacts of multibacillary patients: study protocol for a randomized controlled trial; **Trial**; 2018.

DUTHIE M. S., *et. al.*; A rapid ELISA for the diagnosis of MB leprosy based on complementary detection of antibodies against a novel protein-glycolipid conjugate. **Diagn Microbiol Infect Dis**. V.79, n.2, p. 233-239; 2014 a.

DUTHIE M. S., *et. al.*; Rapid quantitative serological test for detection of infection with mycobacterium leprae, the causative agent of leprosy. **J Clin Microbiol**. V.52, n.2, p. 613-619, 2014b.

DUTHIE, M.S. *et al.*; Selection of antigens and development of prototype tests for point-of-care leprosy diagnosis. **Clin Vaccine Immunol**, v. 15, n. 10, p. 1590-1597; 2008.

DUTHIE, M.S., *et al.*; Specific IgG antibody responses may be used to monitor leprosy treatment efficacy and as recurrence prognostic markers. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 30, n.10, p. 1257-1265; 2011.

DUTHIE, M.S., *et al.*; Use of protein antigens for early serological diagnosis of leprosy. **Clin Vaccine Immunol**, v. 14, n. 11, p. 1400-1408; 2007.

FABRI, A.C.O.C., *et. al.*; Antigen-specific assessment of the immunological status of various groups in a leprosy endemic region. **BMC Infect Dis.**15:218-218; 2015.

FERREIRA, T. C. R., *et. al.*; Análise das fichas de notificação de hanseníase das unidades básicas de saúde de Belém do Pará; **Ver. CPAQV**; v.12, n. 3; 2020.

FONSECA, A. B. L., *et. al.*; The influence of innate and adaptative immune responses on the differential clinical outcomes of leprosy; **Infectious Diseases of Poverty**; n. 6, v.5; 2017.

FRADE, M. A. C. *et al.* Unexpectedly high leprosy seroprevalence detected using a random surveillance strategy in midwestern Brazil: A comparison of ELISA and a rapid diagnostic test. **PLoS. Negl. Trop. Dis.**, v. 11, n., 2017.

Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Agência Fiocruz de Notícias; <https://www.unasus.gov.br/noticia/fiocruz-cria-teste-molecular-para-hanseníase-inedito-no-brasil> acesso em 07/12/2021.

GAMA, R. S., *et. al.*; A novel integrated molecular and serological analysis method to predict new cases of leprosy amongst household contacts; **PLoS. Negl. Trop. Dis.**; v.13, n. 6; 2019.

GAMA, R. S., *et. al.*; High frequency of *M. leprae* DNA detection in asymptomatic household contacts; **BMC Infectious Diseases**; v. 18, n. 153; 2018.

Garcia DR, Ignotti E, Cortela DCB, Xavier DR, Barelli AP. Análise espacial dos casos de hanseníase, com enfoque à área de risco, em uma unidade básica de saúde no município de Cáceres (MT). **Cad Saúde Coletiva**; v.21, n. 2, p. 167- 172; 2013.

GILLINI, E., *et. al.*; Global practices in regard to implementation of preventive measures for leprosy; **PLoS. Negl. Trop. Dis.**; n.11, v.15; 2017.

GOULART, I. M. B.; GOULART, L. R. Leprosy: diagnostic and control challenges for a worldwide disease. **Arch Dermatol Res**, v. 300, n. 6, p. 269-290, 2008.

GOVERNADOR VALADARES; Secretaria Municipal de Saúde; **Plano Municipal de Saúde 2022-2025**; 2021.

GOVERNADOR VALADARES; Secretaria Municipal de Saúde; **Plano Municipal de ação para enfrentamento da hanseníase**; 2021.

GROSSI, M. A. F., *et. al.*; A influência do teste sorológico ML Flow na classificação da hanseníase; **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**; v. 41, n. 2, p. 34-38; 2008 b.

GROSSI, M. A. F., *et. al.*; Fatores de risco para a soropositividade do ML Flow em pacientes com hanseníase; **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**; v. 41, n. 2, p. 39-44; 2008 a.

GUTHI, V. R., AREPALLI, S. e GANAPA, P.; Study of socio demographic factors person affected by leprosy in Kurnool Division of Kurnool district, Andhra Pradesh, India; **Int. Journal of Community Med. and halth public**; v.3, n. 12, p. 3548-3555; dez. 2016.

HASTINGS, R. C. Leprosy: medicine in the tropics. London: Churchill Livingstone, 1988.

HIGUCHI, R., *et. al.*; Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Nat.Biotechnol**, London, v. 11, p. 1026-1030, 1993.

HINO, P., *et. al.*; Geoprocessamento aplicado a saúde; **Rev. Latino americana de enfermagem**; v. 14, n. 16, nov-dez; 2016.

HOLLAND, P. M., *et. al.*; Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'- 3' exonuclease activity of thermusaquaticus.**Proceedings of the National Academy of Sciences**.v.88, p. 7276-7280; 1991.

HUNGRIA, E. M., *et. al.*, Can baseline ML Flow test results predict leprosy reaction? An investigation in a cohort of patients enrolled in the uniform multidrug therapy clinical trial for leprosy patient in Brazil; **Infectious Diseases of Poverty**; 2016.

KANG, T. J. *et al.* Comparision of two different PCR amplification products (the 18-kDa protein gene vs. RLEP repetitive sequence) in diagnosis of Mycobacterim Leprae. **Experimental Dermatology**, v. 28, p. 420-424, jul. 2003.

LAGES D. S., *at. al.*; A baixa escolaridade está associada ao aumento de incapacidades físicas no diagnóstico da hanseníase no Vale do Jequitinhonha; **HU Revista**; v.44, n. 3, p. 303-309; jul-set; 2018.

LEITE, M. L. C.,*et.al.*; Situação Epidemiológica da Hanseníase Minas Gerais – Municípios Silenciosos – 2009-2018; **10° Simpósio Brasileiro de Hansenologia**; Recife-PE; 2019.

LOBATO J., *et. al.*; Comparison of three immunological tests for leprosy diagnosis and detection of subclinical infection. **Lepr Rev.** v. 82, n.2, p. 389-401; 2011.

MANTA, F. S. N., *et. al.*; Quantitative PCR for leprosy diagnosis and monitoring in household contacts: A follow-up study, 2011-2018; **Scientific Reports**; v.9; 2019.

MARÇAL, P. H. F., *et. al.*; Utility of imunoglobulina isotypes against LID-1 and NDO-LID for, particular IgG1, confirming the diagnosis of multibacillary leprosy; **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**; v. 113 (5); 2018.

MARTINEZ, A. N. *et al.* Evaluation of qPCR-Based Assays for Leprosy Diagnosis Directly in Clinical Specimens. **PLoS. Negl. Trop. Dis.**, v. 5, n. 10, p.1354. 2011.

MARTINEZ, A. N. *et al.* Molecular detection of *Mycobacterium Leprae* viability by use of Real-Time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 7, p. 2124-2130, jul. 2009.

MARTINEZ, A. N., *et al.*; PCR Based Techniques for Leprosy Diagnosis: From the Laboratory on the Clinic; **PLoS. Negl. Trop. Dis.**; v. 8; 2014.

MARTINEZ, N.A. *et al.*; Evaluation of real-time and conventional PCR targeting complex 85 genes for detection of *Mycobacterium Leprae* DNA in skin biopsy samples from patients diagnosed with leprosy. **J. Clin. Microbiol**, v. 44, p. 3154-3159. 2006.

MINAS GERAIS. Secretaria Estadual de Saúde; 2020. Disponível em: <https://www.saude.mg.gov.br/hanseniaze> acesso em 31/03/2020.

MINAS GERAIS. Secretaria Estadual de Saúde; Plano Estadual de Saúde; 2020. Disponível em: [https://www.saude.mg.gov.br/images/1\\_noticias/09\\_2021/01\\_jan-fev-marc/08-02-Plano-Estadual-de-Saude%20-de-Minas-Gerais%20%202020-2023.pdf](https://www.saude.mg.gov.br/images/1_noticias/09_2021/01_jan-fev-marc/08-02-Plano-Estadual-de-Saude%20-de-Minas-Gerais%20%202020-2023.pdf) Acesso em 05/04/2022.

MIRANDA, M. C. R., *et al.*; Plano de enfrentamento da Hanseníase em Minas Gerais, 2018-2021; **10º Simpósio Brasileiro de Hansenologia**; Recife-PE; 2019.

MISCH, E. A., *et al.*; Leprosy and the Human Genome; **Microbiology and Molecular Biology**; v. 74, n. 4, p. 589-620; 2010.

MONTOYA, M. R., ALZATE, J. C. B. & CASTRO, N. C., Evaluation and Monitoring of *Mycobacterium leprae* Transmission in Household Contacts of Patients with Hansen's Disease in Colombia; **PLoS. Negl. Trop. Dis.**; 2017.

OLIVEIRA, J. *et al.*; Detecção Sorológica e Molecular do *Mycobacterium leprae* em Famílias de Pacientes de Hanseníase; **10º Simpósio Brasileiro de Hansenologia**; Recife-PE; 2019.

OPROMOLLA, D.V.A. Noções de Hansenologia. Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato, Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, 2000.

PÊGA, A. F., *et. al.*; Hanseníase: correlação entre o número de lesões hansênicas, nervos afetados e o diagnóstico precoce no estado de Minas Gerais; **Rev. Eletrônica acervo saúde**; v. 12, n.9; 2020.

PESCARINI, J. M., *et. al.*, Effect of a conditional cash transfer programme on leprosy treatment adherence and cure in patients from the Nationwide 100 Million Brazilin Cohort: a quasi-experimental study; **Lancet Infect. Dis.**; 2020.

RIBEIRO, G. C., *et. al.*; Prevalence and spacial distribution of *Mycobacterium leprae* infection in a médium endemicity municipality; **Rev. Rene**; v. 20; 2019.

RICHARDUS, R. A., *et. al.*; Longitudinal assessment of anti-PGL-I serology in contacts of leprosy patients in Bangladesh; **PLoS. Negl. Trop. Dis.**; v11, n.12; 2017.

ROCHA, M. C. N., NOBRE, M. L. e GARCIA, L. P.; Caraterísticas epidemiológicas da hanseníase nos idosos e comparação com outros grupos etários, Brasil (2016-2018); **Cad. Saúde Pública**; v. 36, n. 9; 2020.

RODRIGUES, K. C.; **Dinâmica espaço-temporal da endemia de hanseníase em Governador Valadares, Minas Gerais, de 2001 a 2010: um olhar**; 2012; Dissertação de Mestrado; Universidade Vale do Rio Doce; Governador Valares – MG; 2012.

ROSA, P. S., *et. al.*; Emergence and Transmission of Drug-/Multidrug-resistant *Mycobacterium leprae* in a Former Leprosy Colony in the Brazilian Amazon; **Clinical Infectious Diseases**; p. 1-8; 2019.

SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI. Dermatologia. 2. ed. São Paulo: Artes Médicas, 1998.

SARTORI, B. G. C.; **Determinação Molecular da viabilidade do *Mycobacterium leprae*: um comparação com outras abordagens metodológicas**; 2015;



Dissertação de Mestrado em Doenças Tropicais; Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”; Botucatu-SP; 2015.

SCOLLARD, D. M. *et al.* The continuing challenges of leprosy. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 2, p. 338-81, maio 2006.

SILVEIRA, M.G. B. *et. al.*, Hansen’s disease patients: psychological impact of the diagnosis; **Psicol. Soc.**; v. 26, n. 2; 2014. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/psoc/a/RPBTmY3rsvg7BBZXQMxK83h/?lang=pt#:~:text=A%20hansen%C3%ADase%20pode%20causar%20no,de%20suas%20necessidades%20e%20desejos> Acesso em: 05/04/2022

SKABA, D. A., *et. al.*; Geoprocessamento dos dados da saúde: o tratamento dos endereços; **Cad. Saúde Pública**; v. 20, n. 6; nov-dez; 2004.

SOUZA, M., *et. al.*; Utility of recombinant proteins LID-1 and PADL in screening for *Mycobacterium leprae* infection and leprosy. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 2014.

SOUZA, T. J., NETO, L. R. C. e LISBOA, H. C. F.; Perfil epidemiológico da hanseníase em Rondonópolis/MT: 2001 a 2010; **Saúde Santa Maria**; v. 44, n. 3, p. 1-10; set-dez; 2018.

TIWARI, V., *et. al.*; Evaluation of polymerase chain reaction in nerve biopsy specimens of patients with Hansen’s disease; **Journal of the Neurological Sciences**; v.380, p. 187-190; 2017.

Travassos C, Viacava F, Fernandes C, Almeida CM. Desigualdades geográficas e sociais na utilização de serviços de saúde no Brasil. **Ciências & Saúde Coletiva**; v.5, n. 1, p. 133-149; 1997.

TURANKAR, R. P., *et. al.*; Comparative evaluation of PCR amplification of RLEP, 16S rRNA, rpoT and Sod A gene targets for detection of *M. leprae* DNA from clinical and environmental samples; **Internation Journal of Micobateriology**; v4. P. 54-59; 2015.

VIDAL, S. L. *et. al.*; Testes sorológicos anti-NDO-HSA, anti-LID-1 e anti-NDO-LID: Potencial para Vigilância Epidemiológica de Contatos Domiciliares de Área não Endêmica de Hanseníase; **10° Simpósio Brasileiro de Hansenologia**; Recife-PE; 2019.

VIEIRA, G. D., *et. al.*; Leprosy in Rondonia: incidence and characteristics of reported cases, 2001-2012; **Epidemiol. Serv. Saúde**; n. 23, v. 2, p. 269-275; 2014.

Vissa VD, Brennan PJ. The genome of *Mycobacterium leprae*: a minimal mycobacterial; **Geno Biology**; v. 2, n. 8; 2001.

YADAV, N.; KAR, S.; MADKE, B.; DASHATWAR, D.; SINGH, N.; PRASAD, K.; KESARI, V. Leprosy elimination: A myth busted. J. Neurosci. Rural Pract. v.5, p.28-32, nov; 2014.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Leprosy (Hansen's disease) Strategy 2021–2030; 2021. Disponível em <https://www.who.int/publications/i/item/9789290228509>; acesso em 04/04/2022.

WILLIAMS, P. M.; Thebeginnings of real-time PCR; **Clinical Chemistry**, v. 55, n.4, p. 833- 834, Janeiro. 2009.

WOROBEC, S. M. Current approaches and future directions in the treatment of leprosy. Res. Rep. **Trop. Med.** v. 3, p. 79-91, 2012.

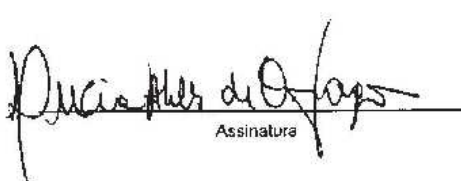

ZAHA, A., FERREIRA, H. B. & PASSAGLIA, L. M. P.; **Biologia Molecular básica**; 5° ed.; Artmed; Porto Alegre; 2014.

## ANEXOS



MINISTÉRIO DA SAÚDE - Conselho Nacional de Saúde - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

### FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

1. Projeto de Pesquisa: HANSENIASE, PARASITÓSES E DEFICIÊNCIA DE MICRONUTRIENTES: NOVOS PARADIGMAS PARA COMBATER UMA DOENÇA ANTIGA			
2. Número de Participantes da Pesquisa: 210			
3. Área Temática:			
4. Área do Conhecimento: Grande Área 2. Ciências Biológicas . Grande Área 4. Ciências da Saúde			
<b>PESQUISADOR RESPONSÁVEL:</b>			
5. Nome: Lucia Alves de Oliveira Fraga			
6. CPF: 219.806.408-53	7. Endereço (Rua, n.º): VEREADOR EUZEBINHO CABRAL, 110 CENTRO apto 202 GOVERNADOR VALADARES MINAS GERAIS 35010260		
8. Nacionalidade: BRASILEIRO	9. Telefone: (33) 3225-4998	10. Outro Telefons:	11. Email: luciaalvesfraga@yshoo.com.br
<p>Termo de Compromisso: Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 466/12 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e a publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima. Tenho ciência que essa folha será anexada ao projeto devidamente assinada por todos os responsáveis e fará parte integrante da documentação do mesmo.</p>			
Data: <u>26</u> / <u>02</u> / <u>2016</u>		 Assinatura	
<b>INSTITUIÇÃO PROPONENTE</b>			
12. Nome: Universidade Federal de Juiz de Fora UFJF		13. CNPJ:	14. Unidade/Orgão: Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia/UFJF
15. Telefone: (32) 2102-3213	16. Outro Telefone:		
<p>Termo de Compromisso (do responsável pela instituição): Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 466/12 e suas Complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento desta projeto, autorizo sua execução.</p>			
Responsável: <u>Angelo Mourão Leite de Lencastre</u>		CPF: <u>034 833 596-21</u>	
Cargo/Função: <u>Coordenador Acadêmico / Diretor em exercício</u>			
Data: <u>26</u> / <u>02</u> / <u>16</u>		 Assinatura	
<b>PATROCINADOR PRINCIPAL</b>			
Não se aplica.			