

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
CAMPUS GOVERNADOR VALADARES
GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Daisy Cristina Monteiro dos Santos

Aplicação da qPCR como ferramenta auxiliar no rastreamento de indivíduos com suspeição diagnóstica para hanseníase

Governador Valadares
2024

Daisy Cristina Monteiro dos Santos

Aplicação da qPCR como ferramenta auxiliar no rastreamento de indivíduos com suspeição diagnóstica para hanseníase

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora – *campus* Governador Valadares, como requisito parcial para conclusão do curso de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Lucia Alves de Oliveira Fraga

Co-Orientador: Prof. Ms. Marcos Daniel Silva Pinheiro

Governador Valadares
2024

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Santos, Daisy Cristina Monteiro dos .

Aplicação da qPCR como ferramenta auxiliar no rastreio de indivíduos com suspeição diagnóstica para hanseníase / Daisy Cristina Monteiro dos Santos. -- 2024.

22 f.

Orientador: Lucia Alves de Oliveira Fraga

Coorientador: Marcos Daniel Silva Pinheiro

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Avançado de Governador Valadares, Instituto de Ciências da Vida - ICV, 2024.

1. Hanseníase. 2. Técnicas de Diagnóstico Molecular. 3. PCR. I. Fraga, Lucia Alves de Oliveira , orient. II. Pinheiro, Marcos Daniel Silva, coorient. III. Título.

Daisy Cristina Monteiro dos Santos

Aplicação da qPCR como ferramenta auxiliar no rastreamento de indivíduos com suspeição clínica para hanseníase

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado ao curso de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora – *campus* Governador Valadares, como requisito parcial para conclusão do curso de Bacharel em Farmácia.

Aprovada em: 18 de dezembro de 2024

BANCA EXAMINADORA

Dra. Lúcia Alves de Oliveira Fraga - Orientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora *Campus* Governador Valadares

Ms. Marcos Daniel Silva Pinheiro - Coorientador
Universidade Vale do Rio Doce

Dr. Rafael Silva Gama
Universidade Vale do Rio Doce

Dr. Thalisson Artur Ribeiro Gomides
Universidade Vale do Rio Doce

RESUMO

A hanseníase é uma doença negligenciada, infectocontagiosa e de progressão lenta, causada pelo *Mycobacterium leprae*. Em Governador Valadares entre 2004 e 2023 foram notificados 2.795 novos casos, desses 44,07% foram classificados como multibacilares. O diagnóstico é baseado em exame clínico, tendo como apoio laboratorial a baciloscopia de raspado intradérmico e a histopatologia, métodos com limitações em estágios iniciais. Tecnologias, como a técnica de PCR, têm permitido um diagnóstico precoce. O objetivo desse estudo foi avaliar por meio da qPCR, a presença do *M. leprae* em raspados intradérmicos e biópsias de indivíduos com suspeição diagnóstica de hanseníase residentes em Governador Valadares e entorno. Foram selecionados 37 indivíduos avaliados por meio de exame dermatoneurológico. Amostras de biópsias e raspado intradérmico foram coletadas e seguiu-se o protocolo do ensaio de qPCR. Os dados foram analisados no Software Epi Info™. Verificou-se que das 37 amostras processadas, 15 (40,5%) apresentaram resultado detectável. De um total de 20 mulheres, 07 (35%) dessas apresentaram DNA detectável, enquanto que para os homens, de um total de 17 indivíduos, 08 (47%) tiveram o teste positivo. Dos 37 indivíduos, 07 (21,2%) receberam diagnóstico clínico conclusivo de hanseníase; destes, 02 (28,6%) apresentaram resultado de qPCR equivocal e 05 (71,4%) detectável. Os achados evidenciam que o uso da qPCR possui potencial significativo para o diagnóstico precoce da hanseníase, possibilitando tratamento imediato, controle da transmissão e monitoramento de casos suspeitos e seus contatos, especialmente em regiões de alta prevalência.

Palavras-chave: Hanseníase. Técnicas de Diagnóstico Molecular. PCR.

ABSTRACT

Leprosy is a neglected, infectious, and slow-progressing disease caused by *Mycobacterium leprae*. Between 2004 and 2023, 2,795 new cases were reported in Governador Valadares, of which 44.07% were classified as multibacillary. Diagnosis is based on clinical examination, with laboratory support from intradermal smear microscopy and histopathology, methods with limitations in the early stages. Technologies such as the PCR technique have enabled early diagnosis. This study aimed to use qPCR to assess the presence of *M. leprae* in intradermal scrapings and biopsies from individuals with a suspected diagnosis of leprosy living in Governador Valadares and the surrounding area. Thirty-seven individuals were selected and evaluated by dermatoneurological examination. Samples of biopsies and intradermal scrapings were collected, and the protocol was followed up with the qPCR assay. The data was analyzed using Epi Info™ software. Of the 37 samples processed, 15 (40.5%) showed a detectable result. Of 20 women, 7 (35%) had detectable DNA, while for men, of a total of 17 individuals, 8 (47%) tested positive. Of the 37 individuals, 07 (21.2%) received a conclusive clinical diagnosis of leprosy; of these, 02 (28.6%) had equivocal qPCR results, and 05 (71.4%) were detectable. The findings show that the use of qPCR has significant potential for the early diagnosis of leprosy, enabling immediate treatment, control of transmission, and monitoring of suspected cases and their contacts, especially in regions of high prevalence.

Keywords: Leprosy. Molecular Diagnostic Techniques. PCR.

1 INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença negligenciada, infectocontagiosa e de progressão lenta, causada pelo *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), um patógeno intracelular obrigatório que até o momento não pode ser cultivado *in vitro*. Este microrganismo apresenta tropismo por células apresentadoras de antígenos (APCs), incluindo macrófagos, células dendríticas e monócitos, bem como pelas células de Schwann. A hanseníase acomete principalmente a pele e os nervos periféricos, afetando também olhos, mãos e pés. As lesões causadas pela infecção são caracterizadas pela diminuição da sensibilidade térmica, dolorosa e tátil, além de apresentarem atrofia e paresias, refletindo o impacto neurológico da doença (Suzuki *et al.*, 2012; Romão; Mazzoni, 2013).

Em 2023, foram registrados 182.815 novos casos de hanseníase em todo o mundo, dos quais 24.773 (13,6%) ocorreram nas Américas, o Brasil responde por 22.773 desses casos, representando 95% destes registros. Globalmente o Brasil somou 12,4% dos casos detectados ocupando a segunda posição mundial em número de novos diagnósticos, e a Índia com 58,9% (WHO, 2024).

Em Minas Gerais, apesar do declínio no número de novos casos, muitos municípios ainda não atingiram a meta de eliminação e a transmissão ativa é indicada por casos em menores de 15 anos, refletindo a presença de adultos infectados sem diagnóstico, que continuam propagando a doença (Yadav *et al.*, 2014; Leite *et al.*, 2019; Minas Gerais, 2020).

Governador Valadares, é considerada referência para o diagnóstico e tratamento da hanseníase na região do leste mineiro. No período de 2004 a 2023 a cidade notificou 2.795 novos casos, dos quais 44,07% (1.232) casos foram classificados como multibacilares (MB) (Governador Valadares, 2024).

O diagnóstico da hanseníase baseia-se majoritariamente no exame clínico, tendo como apoio laboratorial a baciloscopia de raspado intradérmico e histopatologia, apresentando limitações em termos de sensibilidade e especificidade, especialmente nas fases iniciais da doença com carga bacilar baixa ou ausente (Brasil, 2022).

Avanços tecnológicos, como a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), têm permitido um diagnóstico mais sensível e específico da infecção causada pelo *M. leprae*. Além disso, a PCR pode ser aplicada em diferentes tipos de amostras clínicas, conferindo-lhe grande potencial para o diagnóstico diferencial da hanseníase, atuando como um suporte aos métodos diagnósticos tradicionais (Kang *et al.*, 2003; Goulart & Goulart, 2008; Manta, *et al.* 2020). Assim sendo, estudos envolvendo técnicas moleculares são de grande relevância, pois

possibilitam um diagnóstico precoce, importante para o tratamento imediato contribuindo para a interrupção da cadeia de transmissão do *M. leprae*.

Neste contexto, o presente estudo objetivou avaliar por meio da qPCR (Reação da Cadeia da Polimerase-quantitativo), a presença do *M. leprae* em raspados intradérmicos e biópsias de indivíduos com suspeição diagnóstica de hanseníase residentes em Governador Valadares e entorno.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 FORMAS CLÍNICAS

A variabilidade clínica da hanseníase é determinada pelo tropismo do *M. leprae* pela pele e pelo tecido nervoso periférico, além da suscetibilidade genética individual ao microrganismo (Fischer *et al.*, 2008). A classificação de Ridley & Jopling (1966) organiza a doença em dois polos: Tuberculóide e Lepromatoso, com três formas intermediárias. A forma Borderline Tuberculóide (BT) está mais próxima do polo Tuberculóide, a Borderline Borderline (BB) é intermediária, e a Borderline Lepromatosa (BL) se aproxima do polo Lepromatoso. Além dessas, existe a hanseníase neural pura, que pode afetar apenas os nervos periféricos, apresentando poucos bacilos mesmo em biópsias nervosas (Cunha *et al.*, 2006; Hungria *et al.*, 2016; Tiwari *et al.*, 2017).

Em 1982, a Organização Mundial da Saúde (OMS) definiu diretrizes para o tratamento da hanseníase, estabelecendo uma classificação operacional com base no número de lesões cutâneas (Paucibacilares (PB) < 5 lesões e Multibacilares (MB) ≥ 5 lesões ou um nervo afetado) que orienta o uso da Poliquimioterapia (PQT) composto por Dapsona, Clofazimina e Rifampicina, não utilizando a Clofazimina nos casos PB, porém a partir de julho de 2021 foi determinado o uso da Poliquimioterapia Única (PQT-U) com uso dos três medicamentos, para pacientes PB e MB se diferenciando apenas pelo tempo de tratamento. A baciloscopia é utilizada para auxiliar nessa distinção; embora um resultado positivo indique um caso MB, a ausência de bacilos na baciloscopia não exclui a possibilidade de hanseníase (Brasil, 2016; 2022).

2.2 DIAGNÓSTICO

Uma das dificuldades no diagnóstico da hanseníase é a impossibilidade de cultivar o *M. leprae in vitro*. Para contornar essa limitação, estudos com infecção em camundongos e tatus têm ajudado na obtenção do bacilo e no desenvolvimento de técnicas para seu sequenciamento genético (Martinez *et al.*, 2011; Turankar *et al.*, 2015; Rosa *et al.*, 2019). A busca por métodos mais sensíveis para detecção e diagnóstico da doença é crucial para iniciar o tratamento e controlar a transmissão, especialmente entre os contatos domiciliares (Azevedo *et al.*, 2016). Nesse sentido, novas abordagens diagnósticas, tanto sorológicas quanto moleculares, têm sido propostas (Turankar *et al.*, 2015; Richardus *et al.*, 2017; Romero-Montoya *et al.*, 2017).

Embora as técnicas de biologia molecular e sorologia tenham avançado, o diagnóstico da hanseníase ainda é majoritariamente clínico, baseado na avaliação das lesões cutâneas e nervos periféricos. No entanto, os critérios clínicos usados pela OMS e pelo Ministério da Saúde do Brasil têm especificidade limitada, podendo resultar em diagnósticos falso-positivos ou falso-negativos, fazendo com que exames laboratoriais sejam importantes suporte diagnóstico para a doença (Brasil, 2022).

A baciloscopia do raspado intradérmico é considerada o exame complementar padrão-ouro no diagnóstico, apresentando fácil execução e baixo custo. É realizado por meio de uma pequena incisão na pele, com a coleta ocorrendo em lesões cutâneas e nos lóbulos auriculares e cotovelos. O número de bacilos observados por campo à microscopia em cada esfregaço é avaliado utilizando a escala logarítmica de Ridley, que atribui índices baciloscópicos (IB) de 0 a 6+. Um resultado positivo classifica o caso como MB, independentemente do número de lesões, mas o resultado negativo não exclui a possibilidade de hanseníase (Brasil, 2010, 2022).

2.3 TESTES IMUNOLÓGICOS

Os primeiros testes sorológicos para hanseníase foram desenvolvidos na década de 1980, após a descoberta do antígeno glicolípido-fenólico 1 (PGL-1), específico do *M. leprae*. Desde então, várias técnicas foram empregadas para detectar anticorpos anti-PGL-1, incluindo o *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), o teste de hemaglutinação passiva (PHA) e o teste de aglutinação com partículas de gelatina (MLPA), além de testes simplificados como o *ML dipstick* e o teste rápido de fluxo lateral (*ML Flow*) (Bührer *et al.*, 1998; Bührer-Sekula *et al.*, 2003).

O PGL-1 induz a formação de anticorpos IgG e IgM, sendo a pesquisa destes anticorpos o parâmetro sorológico mais utilizado para a hanseníase. A detecção desses anticorpos pode indicar infecção subclínica ou doença ativa, e sua titulação está correlacionada à carga bacilar em indivíduos com hanseníase (Lyon *et al.*, 2008). O ML *Flow*, desenvolvido em 2003, é um teste imunocromatográfico que detecta anticorpos IgM contra PGL-1 e é de fácil execução, sem necessidade de equipamentos laboratoriais, podendo ser realizado diretamente pelos profissionais de saúde. No entanto, a detecção de anticorpos anti-PGL-1 não deve ser usada isoladamente para diagnóstico, pois indivíduos saudáveis podem apresentar sorologia positiva, enquanto casos paucibacilares podem ter resultados negativos (Buhner-Sekula *et al.*, 2003; Moura *et al.*, 2008; Brasil, 2022).

2.4 TESTE DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA DETECÇÃO DE *M. LEPRAE*

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica que amplifica fragmentos específicos de DNA, permitindo sua identificação em amostras biológicas como sangue, raspado dérmico, biópsias e secreções nasais (Almeida *et al.*, 2004). Utilizando primers, que são sequências curtas de ácido nucleico, define-se a porção do genoma a ser analisada, e através de ciclos repetidos de aquecimento e resfriamento, a enzima polimerase é ativada, promovendo a replicação contínua da sequência-alvo, resultando em bilhões de cópias em poucas horas (Zhu *et al.*, 2020).

Um importante avanço na técnica de PCR foi o desenvolvimento de metodologias que permitem o acompanhamento da amplificação do DNA durante todo o processo, em vez de apenas ao final, como ocorre na PCR convencional (Zaha, 2014). A reação de amplificação em tempo real (qPCR), uma variante da PCR convencional, representa um grande progresso nos métodos moleculares utilizados no diagnóstico, especialmente por facilitar a quantificação da expressão gênica em tecidos ou amostras biológicas. O método utiliza um sistema fluorescente em plataforma capaz de detectar a luz gerada durante a amplificação (Holland *et al.*, 1991; Higuchi *et al.*, 1993; Williams, 2009).

A PCR é uma técnica altamente específica e sensível, o que confere ao método um grande potencial para diagnóstico diferencial (Goulart e Goulart, 2008). Martinez *et al.* (2009) confirmaram a especificidade dos primers 16S rRNA e *Specific Repetitive Element* (RLEP) para *M. leprae*, utilizando a técnica de qPCR em outras nove espécies de *Mycobacterium*, além de

bactérias de outros gêneros, como *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes* e *Escherichia coli*.

Manta *et al.* (2019) mostraram que a variabilidade na positividade da PCR pode ser afetada pelo tipo de amostra e alvo utilizado. O gene 16S rRNA melhorou a precisão do diagnóstico da hanseníase na forma paucibacilar (PB). A qPCR, ao ser aplicada em contatos positivos para PGL-1, aumentou a taxa de positividade em 40%. A técnica também apresentou maior positividade em raspados intradérmicos de contatos de pacientes MB, mas não houve diferença significativa no número de genomas entre os contatos de pacientes PB e MB.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O NuPqHans desenvolve projetos na área de hanseníase contemplando uma coorte de 1200 indivíduos residentes nos municípios de Governador Valadares, Teófilo Otoni, Inhapim, Mantena e no distrito de Limeira de Mantena, Minas Gerais. Os participantes deste estudo foram selecionados através de uma estratégia de amostragem aleatória por meio de busca ativa. Este projeto foi aprovado no comitê de ética da UFJF/GV sob o número (CAAE: 56863016.6.1001.5147).

Dando continuidade a este projeto, no presente estudo, foram selecionados 37 participantes, avaliados por meio de exame clínico dermatoneurológico que apresentaram suspeição diagnóstica de hanseníase.

3.1 EXTRAÇÃO DE DNA

As amostras de raspado intradérmico e as biópsias de lesão de pele foram coletadas por profissionais treinados e armazenadas em microtubo tipo eppendorf, estéril com capacidade de 1,5mL contendo 1mL de álcool a 70% e acondicionadas a temperatura de -20°C até o processamento da qPCR.

As amostras, coletadas e fragmentadas com estilete estéril, foram processadas para extração de DNA utilizando o DNeasy® Blood & Tissue Kit - QIAGEN, de acordo com as instruções do fabricante (QIAGEN, 2023).

A concentração de DNA presente nas amostras foi dosada através do espectrofotômetro NanoVue™ e em seguida armazenadas a temperatura de -20°C até o ensaio de qPCR.

3.2 ENSAIO DE qPCR

Para este ensaio foi utilizado o Kit IBMP Biomol Hanseníase, ou “Kit NAT Hanseníase”, que de acordo com a Fiocruz (2021) é o primeiro teste molecular comercial para a doença desenvolvido no Brasil e o segundo exame autorizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), tendo sido desenvolvido conjuntamente pelo Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz), o Instituto Carlos Chagas (Fiocruz Paraná) e o Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP).

Após a extração do DNA as amostras foram processadas seguindo as determinações do fabricante (IBMP, 2024).

3.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As informações clínicas, de gênero e laboratoriais dos participantes foram organizadas em uma planilha Microsoft Excel e analisadas no Software Epi Info™, apresentadas em frequências absolutas e relativas. A fim 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% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

Foi observado no presente estudo que do total de 37 amostras coletadas, 17 (45,9%) eram de indivíduos do sexo masculino e 20 (54,1%) do sexo feminino. Desses, 14 (37,9%) eram residentes em Governador Valadares, 13 (35,1%) em Limeira de Mantena, 06 (16,2%) em Mantena e 04 (10,8%) em Inhapim.

A Tabela 1 apresenta a distribuição dos dados obtidos dos participantes em relação ao sexo, resultados da qPCR, tipo de material biológico e casos diagnosticados de hanseníase clínico e laboratorialmente pelo serviço de referência.

Tabela 1 - Distribuição dos dados coletados

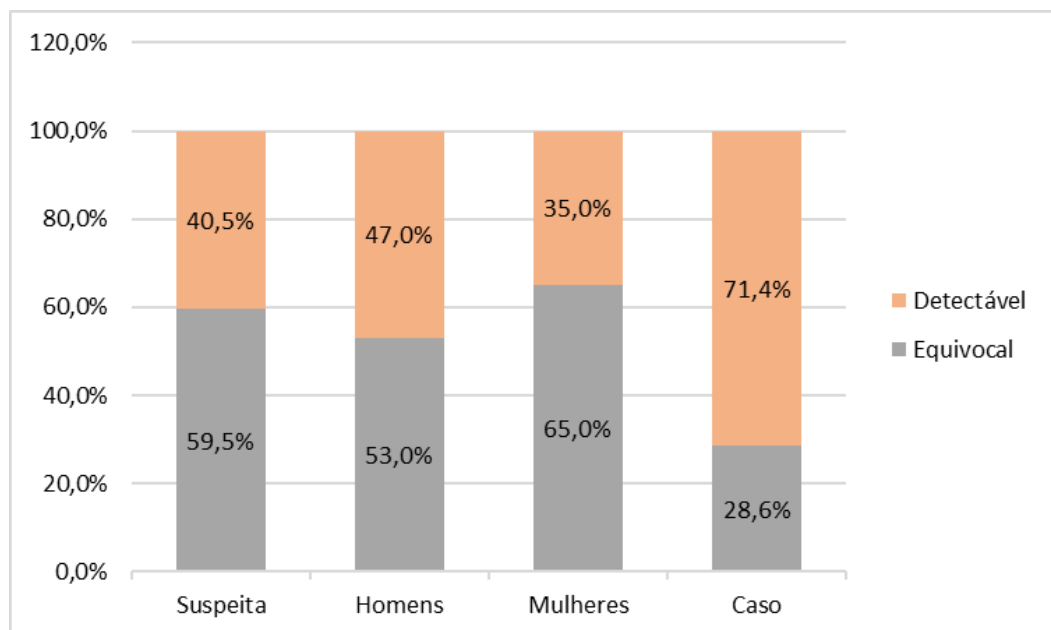
Sexo	Indivíduos	Resultado do teste qPCR		Amostra biológica		
		Detectável	Equivocal	Biópsia	Raspado	Diagnóstico
Masculino	17	08	09	04	13	05
Feminino	20	07	13	00	20	02

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Detectável: *M. leprae* detectável; Equivocal: Teste indeterminado

A Figura 1 demonstra a comparação entre os resultados da qPCR considerando sexo e diagnóstico clínico. Verificou-se que das 37 amostras processadas no teste da qPCR para os genes 16SrRNA e RLEP do *M. leprae*, 15 (40,5%) apresentaram resultado detectável, indicando de fato, um teste positivo para DNA de *M. leprae* nas amostras coletas desses participantes. Evidenciou-se também que, de um total de 20 mulheres, 07 (35%) dessas apresentaram DNA detectável nas amostras coletadas, enquanto que para os homens, de um total de 17 indivíduos, 08 (47%) tiveram o teste positivo. Dos 37 indivíduos avaliados, 07 (21,2% da amostra total) receberam diagnóstico clínico conclusivo de hanseníase; 02 (28,6%) apresentaram resultado equivocal de qPCR enquanto 05 (71,4%) detectável.

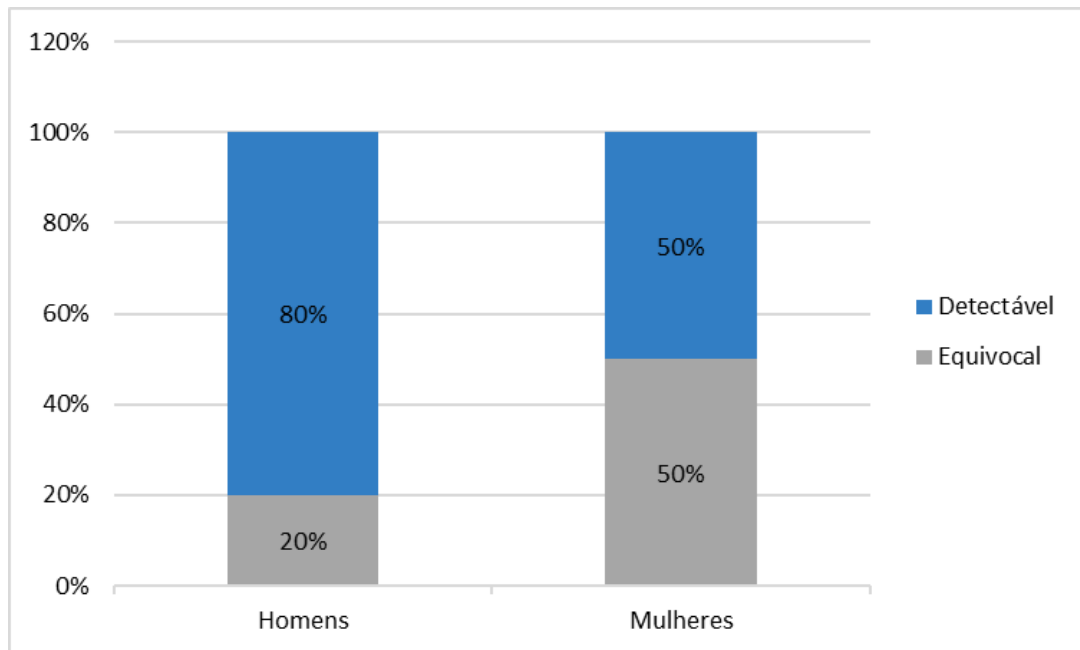
Figura 1 - Comparação dos resultados da qPCR considerando diagnóstico clínico dos participantes



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

A Figura 2 apresenta a análise da distribuição dos casos diagnosticados em relação ao resultado da qPCR. É possível observar que do total de indivíduos que realizaram o teste da qPCR, 07 (18,9% da amostra total) foram diagnosticados com hanseníase e, desses, 5 (71,4%) são do sexo masculino, dos quais 4 (80%) apresentaram qPCR detectável. Com relação aos participantes do sexo feminino verificou-se que das 2 (28,6%) participantes diagnosticadas 1 (50%) apresentou resultado equivocal.

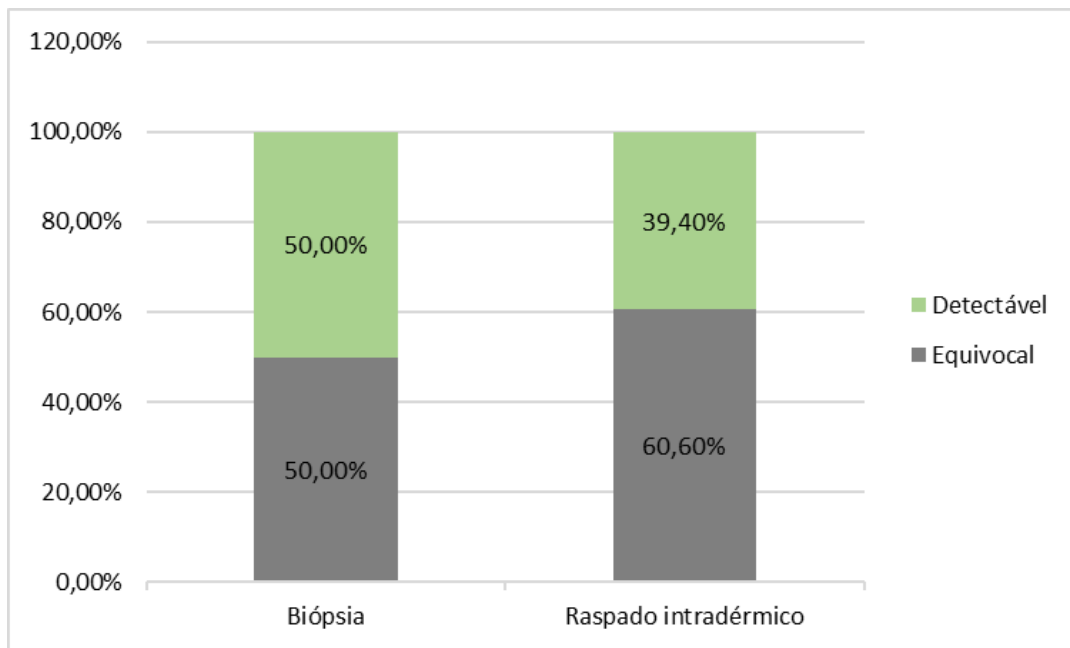
Figura 2 - Distribuição dos casos diagnosticados em relação ao sexo e resultado da qPCR



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

A Figura 3 apresenta o resultado da análise do teste qPCR em relação ao tipo de material biológico utilizado. Verificou-se que das 37 amostras processadas, 04 eram de biópsias e 50% dessas amostras apresentaram valor de referência classificado como detectável, já para as 33 amostras de raspado intradérmico, 39,4% dessas, o teste qPCR mostrou resultado detectável.

Figura 3 - Análise do teste qPCR em relação ao tipo de material biológico utilizado



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Considerando os resultados da Figura 3, verificou-se por meio da análise estatística que não houve associação significativa entre os resultados de referência do teste qPCR (Detectável e Equívocal) e o tipo de material biológico (biópsia ou raspado dérmico); uma vez que o p-valor foi de 0,35.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo, mostrou que não houve diferença estatística significativa entre o material utilizado (biópsia ou raspado intradérmico) e os valores de referência do teste da qPCR (detectável e equívocal).

Embora, o grupo de participantes tenha sido composto majoritariamente por indivíduos do sexo feminino, verificou-se uma predominância de indivíduos do sexo masculino apresentando resultado detectável para o teste molecular.

É importante ressaltar que dos indivíduos avaliados, 15 apresentaram resultado detectável na qPCR, desses 08 (53,3%) são indivíduos do sexo masculino, dos quais 04 (50%) apresentaram diagnóstico clínico da doença. Este achado evidencia a necessidade de atenção à saúde do homem, uma vez que, sabe-se que sua participação nas ações de saúde representa um desafio por diversas razões. Além disso, a valorização do corpo no contexto da saúde e a prática

de cuidar dos outros não são aspectos tradicionalmente enfatizados durante a socialização masculina. Souza et al (2018), ressalta que apesar da doença não apresentar distinção entre os gêneros, é observado que homens são diagnosticados com maior frequência tardiamente. Chagas et al (2021) em seus estudos ainda apontam que a hanseníase virchowiana, forma mais disseminada da doença, apresentou maior frequência em indivíduos do sexo masculino em comparação ao feminino (33,9% contra 19,7%), sugerindo que fatores hormonais podem influenciar o desenvolvimento da hanseníase entre os homens.

Corroborando com estes achados, 55,6% dos novos casos de hanseníase notificados no Brasil, ocorreram em indivíduos do sexo masculino, entre os anos de 2013 e 2022 (Brasil, 2024). Governador Valadares apresentou a maior incidência de casos no estado de Minas Gerais entre os anos de 2001 e 2022, tendo 55% dos casos em indivíduos do sexo masculino (Governador Valadares, 2024).

É importante destacar que dos indivíduos considerados como resultado detectável para *M. leprae* no teste da qPCR, 46,7% apresentaram confirmação do diagnóstico clínico para hanseníase, indicando uma sensibilidade considerável do método utilizado. Neste sentido, Gama et. al (2019) utilizando amostras de sangue e raspado intradérmico de casos de hanseníase e seus contatos domiciliares, realizaram uma análise integrada de qPCR (16S rRNA) e ELISA (anti ND-O-LID e LID-1) através do algoritmo Random Forest, com o objetivo de aprimorar o desempenho dos testes diagnósticos. A qPCR mostrou uma sensibilidade de 48,8% e especificidade de 100%, enquanto que o ensaio de ELISA anti-NDO-LID apresentou sensibilidade de 57,9% e especificidade de 97,5%, e o anti-LID-1 teve sensibilidade de 63,2% e especificidade de 92,5%. Entretanto, ao integrar os dados utilizando o algoritmo *Random Forest*, os autores descreveram uma sensibilidade de 81,6% e especificidade de 92,5% na predição de novos casos. Esse modelo foi utilizado para monitorar contatos domiciliares por 5 anos, identificando dois casos de hanseníase entre os contatos antes mesmo do diagnóstico clínico.

Por meio da técnica de qPCR, Gomides (2014) analisou amostras de raspado dérmico do lóbulo da orelha de 84 contatos domiciliares em Governador Valadares, MG, entre 2011 e 2012. Observou-se uma redução significativa de contatos positivos para o DNA do *M. leprae*, de 17,9% na primeira avaliação para 6% na segunda ($p < 0,001$). Constatou-se aumento significativo de indivíduos com duas cicatrizes de BCG sugerindo uma possível resposta imunológica induzida pela vacinação. Além disso, 5 contatos apresentaram resultado positivo para a qPCR, sendo 2 contatos de PB e 3 contatos de MB, indicando a importância da

continuidade do monitoramento desses indivíduos que podem apresentar um maior risco de adoecer

Em uma abordagem semelhante ao presente estudo, Manta et al (2022) realizaram ensaios com amostras de biópsia de pele coletadas de 2010 a 2018, através de multiplex de qPCR, tendo como alvo os genes 16S rRNA e RLEP de *M. leprae*. Os resultados demonstraram alta sensibilidade diagnóstica (91%) e especificidade (100%) quando avaliadas 97 amostras de pacientes. Em uma validação independente com 50 amostras, a sensibilidade e a especificidade foram de 97% e 98%, respectivamente.

Vale reforçar que, em nosso estudo, os 20 (66,7%) indivíduos que apresentaram resultado equívocal no teste qPCR e cujo diagnóstico clínico não foi confirmado, devem ser acompanhados, uma vez que de acordo com o Instituto de Biologia Molecular do Paraná - IBMP (2024) (fabricante do Kit), um resultado “não detectável” ou “equivocal” não exclui a possibilidade de infecção por *M. leprae*. Nesse sentido, IBMP (2024) destaca que resultados falso negativos podem ocorrer, principalmente em pacientes PB, sendo sugerido, nestes casos, a testagem da amostra em triplicata, ou a repetição do teste após um determinado período de tempo.

Embora não tenha sido encontrada associação estatisticamente significativa entre o resultado do teste qPCR e o material utilizado (raspado intradérmico e biópsia), o kit preconiza o uso de amostras de biópsia de pele de 2 a 6 mm da lesão ou de nervo.

Dessa forma, consideramos como limitação do presente estudo, o número de amostras avaliadas, que pode não ter sido suficiente para demonstrar diferença estatística entre os materiais biológicos utilizados, ou seja, biópsia e raspado dérmico.

6 CONCLUSÃO

Diante do exposto, observa-se que indivíduos com suspeição diagnóstica de hanseníase que apresentam teste de qPCR detectável para *M. leprae* podem ser portadores da forma subclínica da infecção, com potencial transmissão da doença, e, portanto, devem ser tratados.

Os achados reforçam a importância do diagnóstico precoce no controle da hanseníase, especialmente em Governador Valadares e região, onde a doença se mantém como um grave problema de saúde pública.

Concluimos que o ensaio utilizando a qPCR pode contribuir significativamente para o diagnóstico precoce da hanseníase, que é crucial para o tratamento imediato e controle eficaz da transmissão da doença.

É fundamental o acompanhamento dos participantes com resultado equívocal no teste qPCR bem como de seus contatos domiciliares para avaliar o risco de adoecimento e transmissão da doença, especialmente nas comunidades que apresentam alta prevalência de casos de hanseníase.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, Elza Carmen *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, n. 5, p. 509-512; 2004.

AZEVEDO, Michelle de Campos Soriani *et al.* qPCR detection of *Mycobacterium leprae* in biopsies and slit skin smear of different leprosy clinical forms; **Braz. J. Infect. Disease**; 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas da hanseníase**. Brasília: Ministério da Saúde, 2022. 152 p.: il. ISBN 978-65-5993-387-7. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/protocolo_clinico_diretrizes_terapeuticas_hansenise.pdf. Acesso em: 02 nov. 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Acompanhamento dos dados de Hanseníase**: Minas Gerais. Minas Gerais. 2024. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/hanswmg.def>. Acesso em: 27 nov. 2024.

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. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico: Hanseníase 2024**. Brasília: MS/CGDI, 2024. 71 p. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/especiais/2024/be_hansen-2024_19jan_final.pdf. Acesso em: 25 nov. 2024.

BÜHRER, Samira S. *et al.* A simple dipstick assay for the detection of antibodies to phenolic glycolipid-I of *Mycobacterium leprae*. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 58, n. 2, p. 133-136, 1998.

BUHRER-SEKULA, S. *et al.* Simple and fast lateral flow test for classification of leprosy patients and identification of contacts with high risk of developing leprosy. **Journal of clinical Microbiology**, v. 41, n. 5, p. 1991-1995, 2003.

CHAGAS, Lilian Beatriz Moreira de Oliveira *et al.* Sociodemographic, clinical and geospatial profile of new leprosy cases diagnosed at Institute Lauro de Souza Lima, Bauru, São Paulo, between 2015 and 2019. **Hansenologia Internationalis: hanseníase e outras doenças infecciosas**, v. 46, p. 1-22, 2021.

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

FISCHER, Stefan *et al.* Increase of MCP-1 (CCL2) in myelin mutant Schwann cells is mediated by MEK-ERK signaling pathway. **Glia**, v. 56, n. 8, p. 836–843, 2008.

GAMA, Rafael Silva *et al.* A novel integrated molecular and serological analysis method to predict new cases of leprosy amongst household contacts. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 6, p. e0007400, 2019.

GOMIDES, Thalisson Artur Ribeiro. **Monitoramento clínico e molecular de contatos domiciliares de indivíduos com hanseníase**. 2014. 56 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Vale do Rio Doce, Governador Valadares, 2014.
Disponível em: https://sucupira-legado.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id_trabalho=1366985. Acesso em: 12 nov. 2024.

GOULART, Isabela Maria Bernardes; GOULART, Luiz Ricardo.. 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. **Boletim Epidemiológico Hanseníase**. Governador Valadares, p. 16, 2024.

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

HOLLAND, Pamela 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, Emerith Mayra *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.

INSTITUTO DE BIOLOGIA MOLECULAR DO PARANÁ (IBMP). **Instrução de Uso: Kit IBMP Biomol Hanseníase**. Revisão 11. 05 nov. 2024. Disponível em: <https://www.ibmp.org.br/wp-content/uploads/2024/11/IU-IVD-006-11-Kit-IBMP-Biomol-Hanseníase.pdf>. Acesso em: 09 nov. 2024

KANG, Tae June *et al.* Comparison of two different PCR amplification products (the 18-kDa protein gene vs. RLEP repetitive sequence) in diagnosis of Mycobacterium Leprae. **Experimental Dermatology**, v. 28, p. 420-424, jul. 2003. DOI: doi.org/10.1046/j.1365-2230.2003.01300.x

LEITE, Maria de Lourdes Carvalho *et.al.* Situação Epidemiológica da Hanseníase Minas Gerais – Municípios Silenciosos – 2009-2018; **10º Simpósio Brasileiro de Hansenologia**; Recife-PE; 2019.

LYON, Sandra *et al.* Association of the ML Flow serologic test to slit skin smear. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 23-26, 2008.

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

MANTA, Fernanda Saloum de Neves *et al.* Development and validation of a multiplex real-time qPCR assay using GMP-grade reagents for leprosy diagnosis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 16, n. 2, p. e0009850, 2022.

MANTA, Fernanda Saloum de Neves *et al.* Ultra-sensitive detection of *Mycobacterium leprae*: DNA extraction and PCR assays. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 14, n. 5, p. e0008325, 2020.

MARTINEZ, Alejandra 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, Alejandra 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.

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%20de-Minas-Gerais%202020-2023.pdf. Acesso em 08/11/2024.

ROMERO-MONTOYA, Marcela *et al.* Evaluation and Monitoring of *Mycobacterium leprae* Transmission in Household Contacts of Patients with Hansen's Disease in Colombia; **PLoS. Negl. Trop. Dis.**; 2017.

MOURA, Rodrigo Scaliante de *et al.* Sorologia da hanseníase utilizando PGL-I: revisão sistemática. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 11-18, 2008.

QIAGEN. **DNeasy® Blood & Tissue Handbook**. 2023. Disponível em: <https://www.qiagen.com/br/resources/download.aspx?id=68f29296-5a9f-40fa-8b3d-1c148d0b3030&lang=en>. Acesso em: 25 nov. 2024.

RICHARDUS, Renate 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.

RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity. **Int j lepr other mycobact dis**, v. 34, n. 3, p. 255-273, 1966.

ROMÃO, Edilson Ribeiro; MAZZONI, Alessandro Mendonça. Perfil epidemiológico da hanseníase no município de Guarulhos, SP. **Rev Epidemiol Control Infect**, v. 3, n. 1, p. 22-27, 2013.

ROSA, Patrícia 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.

SOUZA, Eliana Amorim de *et al.* Hanseníase e gênero no Brasil: tendências em área endêmica da região Nordeste, 2001–2014. **Revista de Saúde Pública**, v. 52, p. 20, 2018.

SUZUKI, Koichi *et al.* Current status of leprosy: epidemiology, basic science and clinical perspectives. **The Journal of dermatology**, v. 39, n. 2, p. 121-129, 2012. DOI: doi: 10.1111/j.1346-8138.2011.01370.x

TIWARI, Vandana *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.

TURANKAR, Ravindra 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.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **WEEKLY EPIDEMIOLOGICAL RECORD n°37**. 2024. Disponível em: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/378895/WER9937-501-521.pdf?sequence=1>. Acesso em: 20 nov. 2024.

YADAV, Nidhi *et al.* Leprosy elimination: A myth busted. **Journal of Neurosciences in Rural Practice**, v. 5, n. Suppl 1, p. S28, 2014.

ZAHA, Arnaldo *et al.* **Biologia Molecular básica**; 5° ed.; Artmed; Porto Alegre; 2014.

ZHU, Hanliang *et al.* PCR past, present and future. **Biotechniques**, v. 69, n. 4, p. 317-325, 2020.