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

Marcos Daniel Silva Pinheiro

Detecção molecular de *Mycobacterium leprae*: investigação da resistência à poliquimioterapia em indivíduos classificados como casos e com suspeição de hanseníase no Leste de Minas Gerais

Governador Valadares
2026

Marcos Daniel Silva Pinheiro

Detecção molecular de *Mycobacterium leprae*: investigação da resistência à poliquimioterapia em indivíduos classificados como casos e com suspeição de hanseníase no Leste de Minas Gerais

Defesa de Doutorado apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Juiz de Fora, *campus* Governador Valadares, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Bioquímica e Biologia Molecular. Área de concentração: Bioquímica e Biologia Molecular

Orientadora: Dra. Lucia Alves de Oliveira Fraga

Coorientador: Dr. Rafael Silva Gama

Governador Valadares

2026

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Silva Pinheiro, Marcos Daniel.
Detecção molecular de Mycobacterium leprae: investigação da resistência à poliquimioterapia em indivíduos classificados como casos e com suspeição de hanseníase no Leste de Minas Gerais / Marcos Daniel Silva Pinheiro. -- 2026.
97 f. : il.

Orientadora: Lucia Alves de Oliveira Fraga
Coorientador: Rafael Silva Gama
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências da Vida - ICV. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, 2026.

1. Hanseníase. 2. Mycobacterium leprae. 3. qPCR. 4. RLEP. 5. Resistência Antimicrobiana. I. Alves de Oliveira Fraga, Lucia , orient. II. Silva Gama, Rafael, coorient. III. Título.

Marcos Daniel Silva Pinheiro

Detecção molecular de *Mycobacterium leprae*: investigação da resistência à poliquimioterapia em indivíduos classificados como casos e com suspeição de hanseníase no Leste de Minas Gerais.

Tese 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 Doutor em Bioquímica e Biologia Molecular. Área de concentração: Bioquímica e Biologia Molecular

Aprovada em 08 de setembro de 2026.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Lucia Alves de Oliveira Fraga - Orientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Cibele Velloso Rodrigues
Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Gabriella Freitas Ferreira
Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Fernanda de Souza Gomes Kehdy
Instituto Osvaldo Cruz - FIOCRUZ

Profa. Dra. Maria Aparecida de Faria Grossi
Faculdade de Saúde e Ecologia

Juiz de Fora, 06/10/2026.

Documento assinado eletronicamente por **Gabriella Freitas Ferreira**, **Professor(a)**, em 06/10/2026, às 09:57, 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 **Cibele Velloso Rodrigues**, **Professor(a)**, em 07/10/2026, às 14:05, 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 **Lucia Alves de Oliveira Fraga**, **Professor(a)**, em 19/10/2026, às 15:29, 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 **Maria Aparecida de Faria Grossi**, **Usuário Externo**, em 19/10/2026, às 18:00, 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 **Fernanda de Souza Gomes Kehdy**, **Usuário Externo**, em 20/10/2026, às 11:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Dedico esse trabalho a Jesus, fonte de Fé e Amor, e à minha família, pilar da minha formação pessoal e profissional, e à minha orientadora, que inspira a seguir em frente.

AGRADECIMENTOS

A Jesus, 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, força e fé.

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 por serem a base e o foco dos meus objetivos. Minha mãe, Valdênia, e meus irmãos, Fábio, Paola e Raquel, por sempre acreditarem no meu potencial, às vezes até mais do que eu.

Minha orientadora, Profa. Dra. Lucia Alves de Oliveira Fraga, pessoa na qual me inspiro a ser não só o melhor pesquisador, mas a melhor pessoa que puder, a não desistir nunca da ciência e do conhecimento. Pessoa que sempre nos incentiva a buscar mais e a construir parcerias, mostrando-nos que tudo é possível quando insistimos e decidimos fazer.

Ao meu Coorientador, Prof. Dr. Rafael Gama, que sempre me deu maior suporte no F13 da UNIVALE, com parceria, conhecimento, incentivo e tempo, o bem mais precioso que temos.

Agradeço à minha Pastora Edimar, que sempre me ouviu, manteve os joelhos dobrados e orou para que todas as promessas do Senhor se cumprissem em minha vida.

Ao grupo de pesquisa NUPQHANS-GV, grupo comprometido, dedicado e de pessoas fantásticas, agradeço em especial a Daisy Cristina e a Maisa, que me deram o maior suporte na realização desse trabalho e compartilharam os “perrengues da pesquisa”.

A equipe do CREDEN-PES, local onde trabalho com pessoas que sempre nos incentivam a sonhar e a buscar a realização dos nossos objetivos e sonhos, e aos nossos pacientes, por confiarem no nosso trabalho e na pesquisa, em especial a Regina, Alexandre, Gustavo, Júnior e Eny, que, do nosso jeito, sempre me deram força e incentivo.

Ao Instituto Lauro de Souza Lima, especialmente à Profa. Dra. Ida, Nathan Guilherme, Lavinia e Bruna, que não mediram esforços para o meu aperfeiçoamento e o desenvolvimento deste trabalho, e estendo meus agradecimentos a toda a equipe do ILSL.

À FIOCRUZ Rio de Janeiro, onde pude realizar o sequenciamento das amostras e aprender mais sobre o que são pesquisa, receptividade, apoio e companheirismo, especialmente à Fernanda (Ferdi) e à Isabela, meus sinceros agradecimentos de coração.

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

“Deus não fica devendo nada a ninguém; Ele cumpre suas promessas nos mínimos detalhes.” **(Pastora Edimar)”.**

RESUMO

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae*, capaz de comprometer os nervos periféricos e causar incapacidades físicas quando o diagnóstico é tardio. Embora a avaliação clínica e a baciloscopia permaneçam fundamentais para o diagnóstico, a detecção molecular pode ampliar a identificação do bacilo em situações de baixa carga bacilar. Além disso, a resistência aos fármacos da poliquimioterapia constitui um desafio para o controle da doença. Nesse contexto, este estudo teve como objetivo realizar a detecção molecular de *Mycobacterium leprae* e investigar a resistência à poliquimioterapia em indivíduos classificados como casos e com suspeição de hanseníase no Leste de Minas Gerais. Foi realizado um estudo observacional, com base em amostras e informações provenientes do período de 2017 a 2021, no contexto do Centro de Referência em Doenças Endêmicas e Programas Especiais de Governador Valadares. Inicialmente, foram avaliadas 411 amostras por PCR quantitativa (qPCR), com alvo na região repetitiva RLEP do genoma de *Mycobacterium leprae*. Foram consideradas positivas as amostras com valor de *cycle threshold* (Ct) inferior a 37. Os indivíduos foram classificados como casos quando havia registro de hanseníase no Sistema de Informação de Agravos de Notificação e como indivíduos com suspeição de hanseníase quando apresentavam positividade molecular, mas não possuíam notificação prévia. Os indivíduos com positividade molecular foram caracterizados quanto às variáveis sociodemográficas e à distribuição espacial. Aqueles com suspeição de hanseníase foram acompanhados clinicamente, quando possível, para avaliação da evolução diagnóstica. Para a investigação molecular de resistência, foram selecionadas amostras com Ct inferior a 26, submetidas à amplificação e ao sequenciamento dos genes *folP1, rpoB e gyrA*, associados, respectivamente, à resistência à dapsona, à rifampicina e às fluoroquinolonas. A comparação dos valores de Ct entre os grupos foi realizada pelo teste U de Mann–Whitney. Das 411 amostras iniciais, 278 apresentaram positividade para o RLEP, sendo 158 provenientes de casos e 120 de indivíduos com suspeição de hanseníase. Na análise sociodemográfica, não foram observadas associações estatisticamente significativas entre a positividade da qPCR e o sexo, a faixa etária ou a cor/raça. Os indivíduos com resultado positivo eram provenientes de 31 municípios, dos quais 13 apresentaram pelo menos uma amostra positiva, o que evidencia uma distribuição territorial heterogênea. Entre os indivíduos com suspeição de hanseníase residentes em Governador Valadares, 29 foram acompanhados clinicamente; destes, 12 (41,4%) receberam posteriormente o diagnóstico

de hanseníase. O intervalo entre a detecção molecular e a confirmação clínica foi de, em média, seis anos. Na comparação dos valores de Ct, foram avaliadas 258 amostras com resultado disponível, sendo 138 do grupo Caso e 120 do grupo com suspeição de hanseníase. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,121$). Entretanto, entre as 54 amostras selecionadas para sequenciamento, sendo 39 de casos e 15 de indivíduos com suspeição de hanseníase, observou-se diferença significativa nos valores de Ct ($p < 0,001$). O raspado intradérmico apresentou-se como fonte aplicável de DNA para sequenciamento, com resultados satisfatórios em 87,0% das amostras para os genes rpoB e gyrA e em 81,5% para o gene *folP1*. Não foram identificadas mutações associadas à resistência nos genes avaliados. Os achados indicam que a qPCR para RLEP, quando integrada à avaliação clínica, à análise territorial e ao acompanhamento longitudinal, pode contribuir para a identificação de indivíduos que necessitam de vigilância sistemática. A diferença observada nos valores de Ct entre as amostras selecionadas para sequenciamento destaca a utilidade da análise quantitativa na seleção de material com maior quantidade relativa de DNA amplificável. A ausência de mutações de resistência deve ser interpretada considerando o número limitado de amostras e não permite excluir a circulação de variantes resistentes. Em conjunto, os resultados reforçam o potencial da detecção molecular e do sequenciamento como ferramentas complementares às estratégias convencionais de diagnóstico, vigilância e investigação da resistência na hanseníase.

Palavras-chave: Hanseníase; *Mycobacterium leprae*; qPCR; RLEP; resistência antimicrobiana; sequenciamento genômico.

ABSTRACT

Leprosy is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae*, which can affect peripheral nerves and lead to physical disabilities when diagnosis is delayed. Although clinical assessment and bacilloscopy remain essential for diagnosis, molecular detection may improve bacillus identification in cases of low bacillary load. In addition, resistance to multidrug therapy challenges disease control. In this context, this study aimed to perform molecular detection of *Mycobacterium leprae* and investigate resistance to multidrug therapy in individuals classified as leprosy cases and individuals suspected of having leprosy in eastern Minas Gerais, Brazil.This observational study used samples and information collected from 2017 to 2021 at the Center for Reference in Endemic Diseases and Special Programs in Governador Valadares. Initially, we evaluated 411 samples by quantitative polymerase chain reaction (qPCR), targeting the repetitive element RLEP of the *Mycobacterium leprae* genome. We considered samples with a cycle threshold (Ct) value below 37 positive. We classified individuals as cases when a leprosy diagnosis was recorded in the Brazilian Notifiable Diseases Information System (SINAN) and as suspected cases when they had molecular positivity but no previous notification. We characterized individuals with molecular positivity by sociodemographic variables and spatial distribution. Individuals suspected of having leprosy were clinically followed up, when possible, to assess diagnostic progression.For the molecular investigation of drug resistance, we selected samples with Ct values below 26 and subjected them to amplification and sequencing of the *folP1, rpoB,* and *gyrA* genes, which are associated with resistance to dapsone, rifampicin, and fluoroquinolones, respectively. We compared Ct values between groups using the Mann–Whitney U test.Of the 411 initial samples, 278 were RLEP-positive, including 158 from cases and 120 from individuals suspected of having leprosy. In the sociodemographic analysis, we found no statistically significant associations between qPCR positivity and sex, age group, or race/ethnicity. Positive individuals came from 31 municipalities, 13 of which had at least one positive sample, indicating heterogeneous territorial distribution.Among individuals suspected of having leprosy who resided in Governador Valadares, 29 underwent clinical follow-up; of these, 12 (41.4%) were subsequently diagnosed with leprosy. The interval between molecular detection and clinical confirmation averaged six years.For the comparison of Ct values, we evaluated 258 samples with available results, including 138 from the Case group and 120 from the group suspected of having leprosy. No statistically significant difference was observed between the groups ($p = 0.121$). However, among the 54 samples selected for sequencing, including 39 from cases and 15 from individuals suspected of having leprosy, Ct values differed significantly ($p < 0.001$).Skin smear samples were a suitable source of DNA for sequencing, with satisfactory results for 87.0% of samples for the *rpoB* and *gyrA* genes and 81.5% for *folP1*. We identified no drug-resistance mutations in the genes evaluated. The findings indicate that RLEP qPCR, when integrated with clinical assessment, territorial analysis, and longitudinal follow-up, may help identify individuals who require systematic surveillance. The differences in Ct values among the samples selected for sequencing highlight the usefulness of quantitative analysis in

selecting material with a greater relative amount of amplifiable DNA. The absence of resistance-associated mutations should be interpreted in light of the limited number of samples and does not rule out the circulation of resistant variants. Overall, the results reinforce the potential of molecular detection and sequencing as complementary tools to conventional strategies for leprosy diagnosis, surveillance, and investigation of drug resistance.

Keywords: Leprosy; *Mycobacterium leprae*; qPCR; RLEP; antimicrobial resistance; genomic sequencing.

LISTA DE ABREVIATURAS

APS - Atenção Primária à Saúde
BAAR - Bacilo Álcool-Ácido-Resistente
BB - Borderline Borderline
BL - Borderline Lepromatous
BT - Borderline Tuberculoide
CFZ - Clofazimina
CREDEN-PES - Centro de Referência em Doenças Endêmicas e Programas Especiais
Ct - *Cycle threshold*
DDS - Dapsona
DHPS - Dihidropteroato Sintase
DRDR - Determinantes de Resistência a Drogas
ELISA - Enzyme-Linked Imunosorbent Assay
ENH - Eritema Nodoso Hansênico
ESF - Estratégias de Saúde da Família
fg - Fentogramas
GIF - Grau de Incapacidade Física
IB - Índice Baciloscópico
IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IF - Incapacidades físicas
IFN-γ - Interferon-gama
IL-10 - Interleucina 10
IL-4 - Interleucina 4
LAM - lipoarabinomanana
LID-1 - Leprosy IDRI Diagnostic 1
LL - Lepromatoso
MB - Multibacilar
MLPA - Aglutinação com Partículas de Gelatina
NDO-HSA - Natural Disaccharide linked to Human Serum Albumin via Octyl
OMS - Organização Mundial da Saúde
PABA - Ácido Para-aminobenzóico
PB - Paucibacilar
PCR - Reação em cadeia da polimerase

PEEH-MG - Plano Estadual de Enfrentamento da Hanseníase de Minas Gerais

PEP - Profilaxia Pós-Exposição

PGL-1 - glicolipídeo fenólico 1

PHA - Hemoaglutinação Passiva

PMEH - Plano Municipal de Enfrentamento à Hanseníase

PMS - Plano Municipal de Saúde

PQT - Poliquimioterapia

PQT-U - Poliquimioterapia Única

RAPH - Rede de Atenção à Pessoa com Hanseníase

RFP - Rifampicina

RR - Reação Reversa

SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SMS - Secretaria Municipal de Saúde

SRS/GV - Superintendência Regional de Saúde de Governador Valadares

TBE - Tris-Borato-EDTA

TNF - Fator de Necrose Tumoral

TT - Tuberculóide

UBS - Unidades Básicas de Saúde

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Modelo esquemático do envelope celular de *Mycobacterium leprae* 20
Figura 2 - Espectro de formas clínicas da hanseníase segundo a classificação de Ridley & Jopling (1966) 22
Figura 3 - Sequência do fragmento do gene *folP1* de *M. leprae* indicando os códons que podem sofrer mutações 32
Figura 4 - Sequência do fragmento do gene *rpoB* de *M. leprae* indicando os códons que podem ter mutações 33
Figura 5 - Sequência do fragmento do gene *gyrA de M. leprae* destacando os códons que podem sofrer mutações 33
Figura 6 - Estruturas químicas dos medicamentos usados no tratamento da hanseníase 34
Figura 7 - Ilustração da inibição da RNA polimerase dependente de DNA por Rifampicina 35
Figura 8 - Distribuição de novos casos de hanseníase no mundo.....39
Figura 9 - Localização e caracterização dos cenários dos municípios que compõem a SRS de Governador Valadares no período de 2019 – 2022. 42
Figura 10 - Desenho experimental e fluxo metodológico do estudo: da identificação molecular realizado no mestrado e às análises clínicas, espaciais e de resistência realizado no doutorado 49
Figura 11 - Distribuição dos indivíduos qPCR positivos para hanseníase nos municípios da Superintendência Regional de Saúde de Governador Valadares, Minas Gerais. 61
Figura 12 - Distribuição espacial de indivíduos com qPCR positivo e de casos confirmados de hanseníase em Governador Valadares. 63
Figura 13 - Distribuição de indivíduos sem diagnóstico prévio de hanseníase e com qPCR positivo para o RLEP para acompanhamento clínico. 64
Figura 14 - Distribuição espacial dos indivíduos diagnosticados com hanseníase, em acompanhamento e com qPCR positivo para o RLEP na área urbana de Governador Valadares. 66
Figura 15 - Distribuição espacial dos casos notificados de hanseníase e dos indivíduos com qPCR positivo para *M. leprae* em Governador Valadares 68

Figura 16 - Caracterização das amostras de casos e indivíduos em suspeição de hanseníase segundo a qualidade do sequenciamento dos genes *rpoB, gyrA* e *folP1* de *M. leprae.* 70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros da PCR, para amplificação dos genes *folP1, rpoB* e *gyrA* 51
Tabela 2 - Protocolo do sequenciamento 53
Tabela 3 - Distribuição dos resultados da qPCR segundo as características sociodemográficas dos participantes avaliados, entre 2017 e 2021 57
Tabela 4 - Detalhamento dos 120 indivíduos com qPCR positivo para RLEP e com suspeição de hanseníase 62
Tabela 5 - Comparação dos valores de Ct obtidos pela qPCR para RLEP entre os grupos Caso e Suspeito, mediante o teste U de Mann–Whitney, no período de 2017 a 2021.....72

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17
2. REFERENCIAL TEÓRICO 19
2.1 ASPECTOS GERAIS DO AGENTE ETIOLÓGICO 19
2.2 ASPECTOS CLÍNICOS E CLASSIFICAÇÃO 21
2.3 TRATAMENTO DA HANSENÍASE 23
2.4 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA HANSENÍASE 24
2.4.1 Testes Sorológicos 25
2.4.2 Testes Moleculares de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR): qPCR na hanseníase 27
2.4.3 Aspectos da resistência a antimicrobianos 30
2.5 TRANSMISSÃO E EPIDEMIOLOGIA DA HANSENÍASE 38
2.5.1 Hanseníase em Minas Gerais 40
2.5.2 Situação atual da hanseníase no município de Governador Valadares 43
3. OBJETIVOS 45
3.1 OBJETIVO GERAL 45
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 45
4 MATERIAIS E MÉTODOS 46
4.1 ÁREA DE ESTUDO 46
4.2 DESENHO EXPERIMENTAL 46
4.2.1 Mestrado – Identificação Molecular e classificação inicial 46
4.2.2 Doutorado – Seguimento clínico, análise espacial e investigação molecular de resistência 47
4.2.3 Técnica de coleta, armazenamento e extração de DNA. 50
4.2.4 Ensaio de Pré-PCR para amplificação dos genes *folP1, rpoB* e *gyrA*. 50
4.2.5 Procedimentos para eletroforese e isolamento do *amplicon* para sequenciamento 51
4.2.6 Procedimentos para purificação de bandas amplificadas 51

4.2.7 Reação de Sequenciamento dos genes *folP1*, *rpoB* e *gyrA* 52

4.2.8 Análise de sequências dos genes *folP1*, *rpoB* e *gyrA* de *M. leprae*: investigação de mutações associadas à resistência aos fármacos da poliquimioterapia 54

4.3 COLETA E ORGANIZAÇÃO DOS DADOS SOCIODEMOGRÁFICOS E CLÍNICOs...54

4.4 GEOPROCESSAMENTO E ANÁLISE ESPACIAL 54

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....55

4.6 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....56

5 RESULTADOS 57

5.1 PERFIL SOCIODEMOGRÁFICO DOS PARTICIPANTES SEGUNDO OS RESULTADOS DA QPCR 57

5.2 DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DE INDIVÍDUOS COM SUSPEIÇÃO DE HANSENÍASE E RESULTADO POSITIVO PARA qPCR RLEP 60

5.3 SEQUENCIAMENTO DOS GENES DE RESISTÊNCIA A PQT - CASOS E COM SUSPEIÇÃO DE HANSENÍASE.....69

5.4 COMPARAÇÃO DOS VALORES DE CT ENTRE OS GRUPOS CASOS E COM SUSPEIÇÃO DE HANSENÍASE.....71

6 DISCUSSÃO 73

7 CONCLUSÃO.....80

REFERÊNCIAS 82

ANEXO A – Termo De Consentimento Livre e Esclarecido 93

1 INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma infecção granulomatosa crônica, causada pelo *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), que acomete primariamente os nervos periféricos. As manifestações clínicas da doença decorrem do padrão de resposta imunológica estabelecido diante da infecção pelo microrganismo. 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 térmica, tátil e dolorosa (Azulay; Azulay, 1997; Bif, *et. al.,* 2024; Jesus, *et. al.*, 2023).

Quando o diagnóstico ocorre tardiamente, os pacientes podem apresentar incapacidades físicas (IF). Estima-se que no mundo existam entre 1 e 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, o fortalecimento dos serviços de saúde nas ações de combate e controle da doença (Hespanhol; Domingues; Uchôa-Figueiredo; 2021; Silveira *et. al.*, 2014).

No entanto, mesmo diante de variações nas taxas de detecção ao longo dos anos, a hanseníase permanece um problema relevante de saúde pública em Minas Gerais, com distribuição heterogênea entre os municípios e presença de bolsões de transmissão ativa. Dados recentes indicam aumento no número de municípios classificados em categorias de maior endemicidade entre 2021 e 2025, evidenciando ampliação da magnitude da doença em determinadas áreas. Além disso, a ocorrência de casos, ainda que em menor proporção, entre menores de 15 anos ao longo do período, reforça a manutenção da transmissão ativa, sugerindo a existência de casos não diagnosticados ou diagnosticados tardiamente na população adulta. Esses achados evidenciam a necessidade de fortalecimento das ações de vigilância, diagnóstico precoce e acompanhamento de contatos no território (Leite, *et. al,* 2019; Minas Gerais, 2026)

O desenvolvimento de técnicas moleculares e o conhecimento prévio da sequência genômica de *M. leprae* tornaram possível a aplicação do método de amplificação de DNA para a identificação do bacilo em amostras clínicas. Ao contrário da baciloscopia, que

requer cerca de 10^4 organismos por grama de tecido para detecção efetiva, a reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica de alta especificidade e sensibilidade, capaz de detectar 25 fentogramas (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 alto potencial para o diagnóstico diferencial. Assim, a técnica da PCR pode vir a ser utilizada como método de suporte alternativo aos métodos tradicionais de diagnóstico da doença (Goulart; Goulart, 2008; Kang *et. al.*, 2003; Yan *et. al.*, 2014).

A realização de testes para identificar resistência à hanseníase é fundamental para o controle eficaz da doença, especialmente em regiões endêmicas. A resistência aos medicamentos da poliquimioterapia (PQT), como a dapsona, a rifampicina e as fluoroquinolonas de segunda escolha, tem sido relatada em diversos estudos, comprometendo a eficácia do tratamento e aumentando o risco de transmissão contínua do *M. leprae* (Duo Filho *et. al.*, 2021). A detecção precoce de mutações genéticas associadas à resistência, como as encontradas nos genes *folP1*, *rpoB* e *gyrA*, permite a adaptação terapêutica, evitando falhas no tratamento e o desenvolvimento de incapacidades físicas. Além disso, a identificação de cepas resistentes contribui para a vigilância epidemiológica, auxiliando na formulação de políticas públicas mais eficazes para o controle da doença. Portanto, a incorporação de testes moleculares, como a PCR e o sequenciamento de DNA, é essencial para um diagnóstico preciso e um manejo terapêutico adequado, visando à diagnóstico precoce, tratamento imediato e redução significativa de casos da hanseníase minimizando consideravelmente este problema de saúde pública (Andrade, 2022; Brasil, 2023).

Diante disso, o objetivo deste estudo foi realizar a detecção molecular de *M. leprae* e investigar a resistência à poliquimioterapia em indivíduos classificados como casos e com suspeição de hanseníase no Leste de Minas Gerais

2. REFERENCIAL TEÓRICO

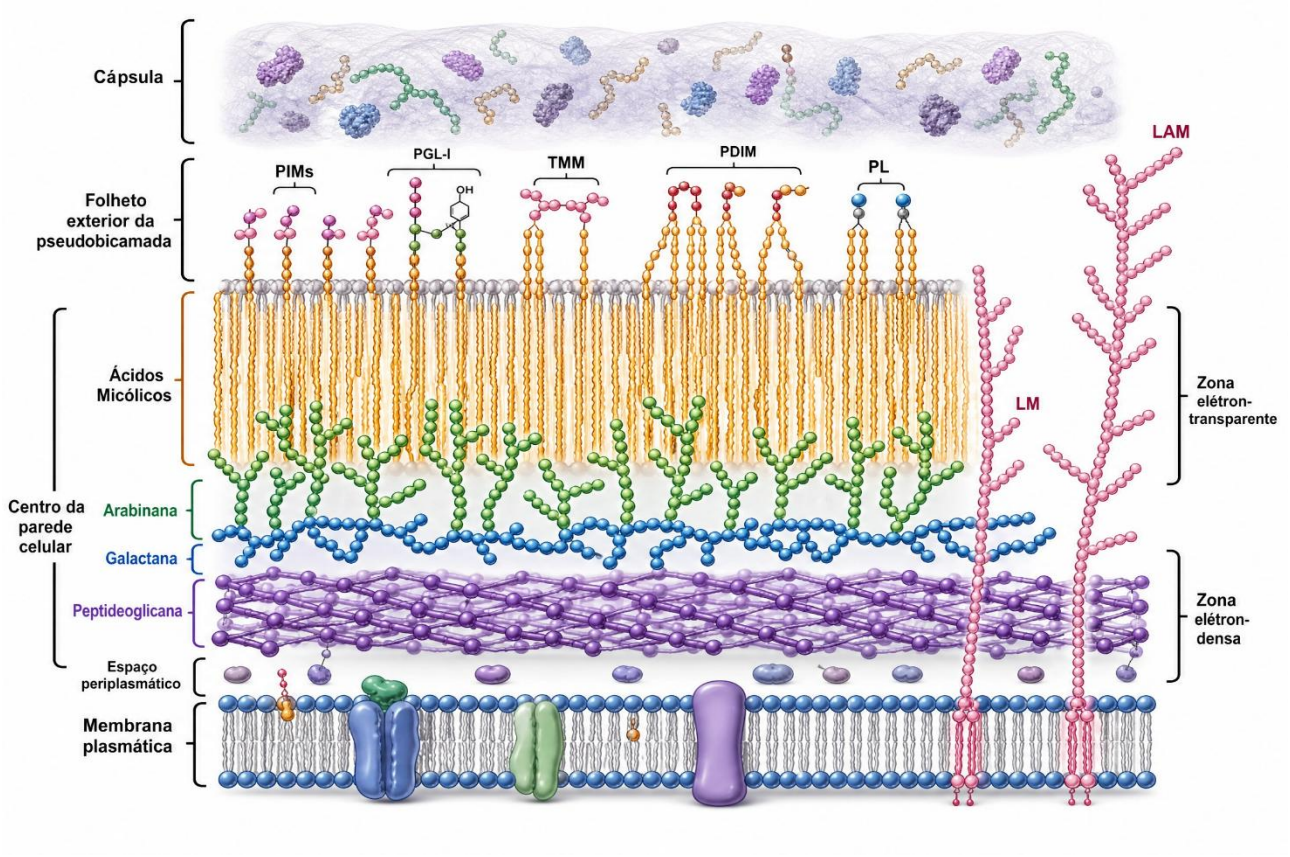
Nesta seção, será apresentado o referencial teórico que embasa o presente trabalho.

2.1 ASPECTOS GERAIS DO AGENTE ETIOLÓGICO

O *M. leprae* foi descrito em 1873 por Gerhard Henrik Armauer Hansen como um bacilo reto ou ligeiramente encurvado que se cora em vermelho com fucsina e não se descora após lavagem em solução álcool-ácida, sendo, portanto, classificado como bacilo álcool-ácido-resistente (BAAR). Como bactéria intracelular, apresenta tropismo por células de Schwann nos nervos periféricos (Scollard *et. al.*, 2006), especialmente em locais onde a temperatura corporal é inferior a 37 °C, o que favorece seu metabolismo. Nos tecidos infectados, aparecem isolados ou em feixes paralelos, dispondo-se em “globias” (Hastings, 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, composta por peptidoglicana entrelaçada e ligada a cadeias polissacarídicas que servem de suporte aos ácidos micólicos, que representam cerca da metade do peso da parede celular e conferem a ela uma característica hidrofóbica. A lipoarabinomanana (LAM) é um importante componente da parede celular micobacteriana (Figura 1). O bacilo apresenta uma cápsula contendo uma grande quantidade de lipídios, na qual se encontra um lipídeo quimicamente distinto dos observados em outras espécies de micobactérias, o glicolipídeo fenólico 1 (PGL-1), que contém um trissacarídeo característico e único de *M. leprae*. Este lipídio pode ser detectado em tecidos infectados, persistindo por um longo tempo mesmo após a degradação e eliminação do bacilo (Vissa e Brennan, 2001; Opromolla, 2000).

Figura 1 - Modelo esquemático do envelope celular de *Mycobacterium leprae*



Fonte: Adaptado de Vissa e Brennan (2001).

Mycobacterium leprae apresenta uma parede celular sobreposta à membrana plasmática. Esta parede é constituída por uma região eletrondensa, composta por peptidoglicana, galactana, arabinomana, lipomanana e lipoarabinomana; uma região eletrontransparente, composta por arabinogalactana ligada a micolatos, lipomanana, lipoarabinomanana; e uma cápsula formada por fosfatidilinositol manosídeos, glicolipídeo fenólico 1, fosfolipídeos, monomicolato de trealose e ftiocerol dimicocerosato, lipomanana; LAM, lipoarabinomanana; PL, fosfolipídeo; TMM, monomicolato di trealose; PIMs, fosfatidilinositolo manosiidi; PGL-1, glicolipide fenolico I; PDIM, fitocerolo dimicocerosato.

O genoma de *M. leprae* apresenta uma extensa redução evolutiva, com perda funcional de cerca de 2.000 genes em comparação com o de *M. tuberculosis*, o que resulta na perda de quase metade de suas funções metabólicas e na ausência de vias metabólicas inteiras presentes em *M. tuberculosis*. Menos de 50% de genoma de *M. leprae*, que consiste em 3.268.203 pares de bases, codifica proteínas. O bacilo apresenta um total de 2.770 genes, um número excepcionalmente elevado de pseudogenes (1.116) e 1.604 sequências codificadoras de proteínas (Cole *et. al.*, 2001).

O processo de extensa redução genômica do *M. leprae*, embora resulte na perda de funções metabólicas e na presença de um elevado número de pseudogenes (1.116), não o

torna menos adaptável. Pelo contrário, essa especialização genômica pode ter impulsionado uma notável diversidade de estratégias adaptativas, influenciando a virulência e a capacidade de interação com o hospedeiro. A abundância de pseudogenes, que reflete a perda de vias metabólicas inteiras, é um fator determinante para a adaptação intracelular do bacilo, permitindo sua sobrevivência e proliferação nesse ambiente restrito (Corrêa, 2022).

2.2 ASPECTOS CLÍNICOS E CLASSIFICAÇÃO

Em 1982, a Organização Mundial da Saúde (OMS), instituiu as normas para a operacionalização do tratamento da doença. Com isso, estabeleceu-se a classificação operacional, que consiste nos seguintes parâmetros: pacientes com menos de cinco lesões de pele são classificados como paucibacilar (PB), e os que têm cinco ou mais lesões de pele são classificados como multibacilar (MB). O intuito da classificação operacional é orientar o tratamento com poliquimioterapia (PQT). A baciloscopia auxilia no processo de classificação, em que um resultado positivo indica o paciente como MB; no entanto, uma baciloscopia negativa não descarta a possibilidade de hanseníase (Brasil, 2016; Juan *et. al.*, 2024).

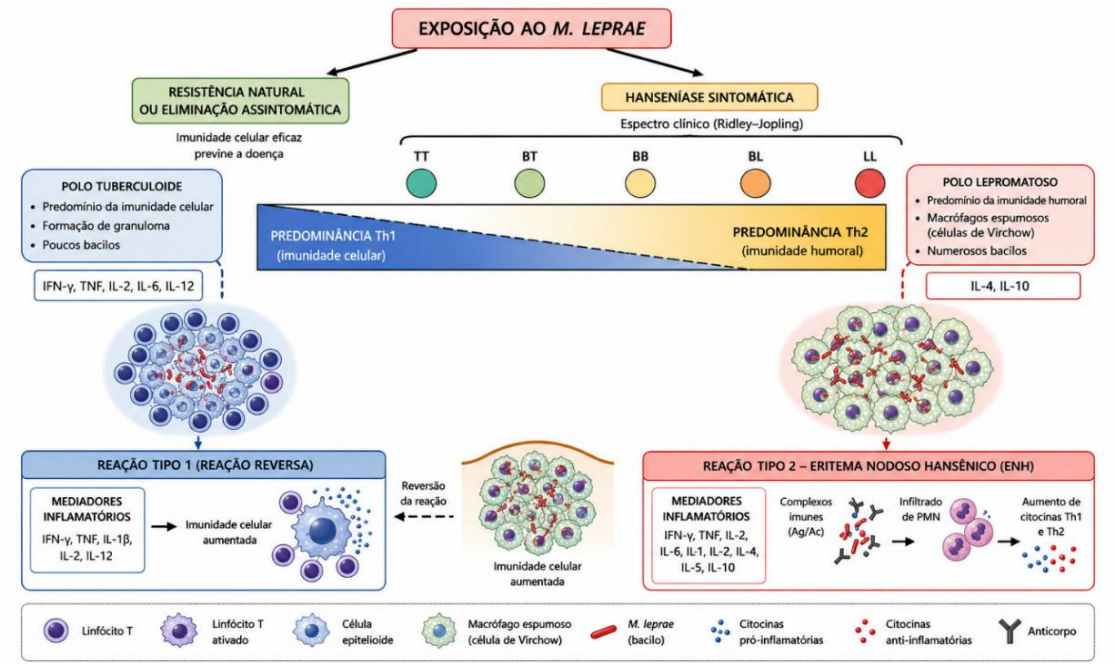
A classificação de Ridley & Joplin (1966) envolve dois polos: tuberculóide e lepromatoso. Entre os dois polos, há três formas intermediárias e dinâmicas. Quanto mais próxima da forma tuberculóide, é chamada *Borderline tuberculoide* (BT); a mais centralizada é conhecida como *Borderline borderline* (BB); assemelhando-se à forma lepromatosa, é classificada como *Borderline lepromatous* (BL). O diagnóstico é feito com base na sintomatologia clínica e em exames complementares, como raspado intradérmico e/ou biópsia, que auxiliam 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; Juan *et. al.*, 2024; Silva *et. al.*, 2024; Tiwari *et. al.*,2017).

O espectro de formas clínicas da hanseníase, segundo a classificação de Ridley & Joplin, é 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, o que combate eficazmente a infecção. Neste polo, há um pequeno número de bacilos nas lesões. Já os pacientes do polo lepromatoso apresentam

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. Os pacientes “borderline” apresentam características intermediárias, aproximando-se mais de um polo ou de outro, de acordo com seu perfil de resposta imunológica ao *M. leprae*.

Existem ainda os episódios reacionais, responsáveis por grande destruição de ramos nervosos e por incapacidades decorrentes. 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 (Carvalho *et. al.*, 2024; Misch *et. al.*, 2010; Oliveira *et. al.*, 2024).

Figura 2 - Espectro de formas clínicas da hanseníase segundo a classificação de Ridley & Jopling (1966)



Fonte: Adaptado de Misch *et. al.* (2010).

A Figura 2 detalha o espectro imunopatológico da hanseníase, desde a exposição ao *M. leprae* até as manifestações clínicas e reacionais. Indivíduos podem desenvolver resistência natural ou hanseníase sintomática, que varia do polo TT ao LL. No polo TT, predomina uma resposta imune celular (Th1), com formação de granulomas, baixa carga bacilar e mediadores como IFN-γ e TNF. No polo LL, a resposta é humoral (Th2), ineficaz, resultando em macrófagos espumosos, alta carga bacilar e na produção de citocinas como IL-4 e IL-10. As reações imunológicas incluem: Reação Reversa (Tipo 1): Exacerbação da imunidade celular (Th1), com mediadores como IFN-γ e TNF, levando à inflamação aguda; ENH (Tipo 2): Comum em formas lepromatosas, envolve complexos antígeno-anticorpo, infiltração de neutrófilos e aumento de citocinas Th1 e Th2, como IFN-γ, TNF, IL-4 e IL-10.

Vale ressaltar que cerca de 95% dos indivíduos expostos ao *M. leprae* são resistentes à infecção ou a eliminam sem apresentar sintomas. Entretanto, os 5% restantes poderão desenvolver a doença em uma das formas clínicas, dependendo da capacidade de resposta imune mediada por células frente aos antígenos do *M. leprae* (Scollard *et. al.*, 2006; Vidal *et. al.*, 2019).

2.3 TRATAMENTO DA HANSENÍASE

Apesar de o tratamento da hanseníase existir há muitos anos, no início da era terapêutica moderna, a monoterapia era a base do tratamento. Devido a relatos de resistência bacteriana aos fármacos usados no tratamento da hanseníase, a OMS implantou, em 1981, a PQT com Dapsona (DDS), Rifampicina (RFP) e Clofazimina (CFZ), o que diminuiu drasticamente a prevalência da hanseníase e reduziu o número de cepas resistentes a esses medicamentos (Diorio *et. al.*, 2009; Marpaung, Ernawati e Dwivania, 2022; Rosa *et. al.*, 2019; Santos *et. al.*, 2018).

No Brasil, de acordo com o Ministério da Saúde (Brasil, 2016), o acompanhamento do paciente com hanseníase é ambulatorial, independentemente da classificação operacional (PB ou MB), e deve assegurar ao paciente um tratamento adequado e completo. O tratamento é padrão conforme a classificação operacional. Para os casos de PB, usam-se 6 *blisters* contendo Rifampicina e Dapsona, por um 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 *blisters* contendo Rifampicina, Dapsona e acréscimo de Clofazimina, com duração de 12 a 18 meses. Ao final do tratamento, são realizadas novas avaliações dermatoneurológicas e o grau de incapacidade física (GIF). Não havendo alterações, o paciente receberá alta por cura.

A partir de 7 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, Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, regulamentou a Poliquimioterapia única (PQT-U) que associa os fármacos Dapsona, Rifampicina e Clofazimina na apresentação de *blisters* 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 implementou um programa piloto para avaliar a operacionalidade da quimioprofilaxia com rifampicina em dose única. O programa foi denominado “Profilaxia Pós-Exposição” (PEP) e implementado na rotina dos programas de hanseníase no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS), nos Estados de Mato Grosso, Tocantins e Pernambuco. Entretanto, de acordo com os autores, a viabilidade, a implementação e o funcionamento adequado do PEPHans-Brasil exigem articulação em todos os níveis de atenção à saúde e a consideração de algumas condições. Há necessidade de um planejamento operacional, de fatores técnicos, de disponibilidades de recursos, de conhecimento sobre o estigma, as percepções, o impacto da distribuição do PEP e a 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, de fácil execução e de baixo custo. Colhe-se o material a ser examinado (raspado de tecido dérmico) nos lóbulos das orelhas direita e esquerda, nos cotovelos direito e esquerdo e/ou na lesão suspeita. A coloração é realizada pelo método de Ziehl-Neelsen, e o resultado é expresso como índice baciloscópico (IB), numa escala de 0 a 6+, de acordo com o número de bacilos observados por campo microscópico. É utilizada como exame complementar para a identificação de casos de PB e MB de difícil classificação clínica. A baciloscopia positiva classifica o caso como MB, independentemente do número de lesões. No entanto, o resultado negativo não descarta a hanseníase (Brasil, 2010, Brasil, 2022).

Uma das dificuldades no diagnóstico da hanseníase é a ausência de um meio de cultivo *in vitro* para *M. leprae.* Existem investigações, como a infecção em camundongos e tatus, que auxiliam na obtenção do bacilo, além de dar suporte às técnicas de sequenciamento genético do *M. leprae* (Martinez *et. al.*, 2011; Rosa *et. al.*, 2019; Turankar *et. al.,* 2015).

A busca por técnicas mais sensíveis para a detecção e o diagnóstico da doença é essencial para iniciar o tratamento e controlar a transmissão, especialmente entre os contatos domiciliares (Azevedo *et. al.,* 2016). Assim, novos métodos de diagnóstico, tanto sorológicos quanto moleculares, têm sido propostos (Brito et al., 2021; Montoya; Alzate; Castro, 2017; Richardus et al., 2017; Turankar et al*.,* 2015).

2.4.1 Testes Sorológicos

Uma diversidade de ensaios sorológicos foi proposta para o diagnóstico da hanseníase; entre eles, destacam-se: o teste de Hemaglutinação Passiva (PHA), o teste de Aglutinação com Partículas de Gelatina (MLPA), o Dispstick e o teste de Fluxo Lateral, que apresentam vantagens e limitações, dependendo do tipo de pesquisa.

Segundo Andrade *et. al.* (2008), a positividade do teste ML *flow* (teste de fluxo lateral) 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 para identificar, entre os contatos, aqueles com maior risco de desenvolver a doença. Esses autores também verificaram que o ML *Flow* foi positivo em todos os pacientes com IB > 2 e que a chance de soropositividade aumentou à medida que o número de nervos comprometidos e/ou de lesões cutâneas aumentava (Grossi *et. al.*, 2008a). Houve uma tentativa de empregar o teste ML *Flow* como instrumento adicional para a correta classificação de novos casos de hanseníase em PB ou MB e para a identificação de contatos de pacientes com hanseníase com maior risco de desenvolver a doença no futuro. De acordo com os autores, há uma forte tendência de os pacientes serem classificados como MB pelos profissionais de saúde. 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 glicolipídio fenólico conjugado com soro albumina bovina (Duthie *et. al.*, 2014a; Lobato *et. al.* 2011), o *Leprosy* IDRI *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; 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 a doença.

Posteriormente, Fabri *et. al.* (2015) sugeriram que testes baseados na detecção de anticorpos contra PGL-1 e/ou LID-1 são eficazes para identificar pacientes com MB,

enquanto 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 *Enzyme-Linked Imunosorbent Assay* (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 de contatos intradomiciliares assintomáticos. Os níveis séricos de anticorpos IgM e IgG contra os antígenos LID-1, NDO-LID e NDO-HSA estavam elevados em pacientes MB, em comparação com os grupos de contatos. Os anticorpos IgM apresentaram maior reatividade ao antígeno NDO-LID, enquanto os IgG apresentaram maior reatividade ao 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 testes sorológicos avaliados em conjunto com as características do caso índice associadas às questões sociodemográficas, têm potencial para atuar como auxiliares na detecção de indivíduos infectados pelo *M. leprae*, contribuindo para a vigilância dos contatos.

Segundo Oliveira *et. al.* (2024), biomarcadores da resposta imune podem atuar como ferramenta para o diagnóstico e prognóstico da hanseníase, principalmente entre contatos intradomiciliares dos indivíduos MB. Desta forma, realizar avaliações regulares dos níveis de TNF e IFN-γ poderia ajudar a identificar respostas imunes indicativas de infecção subclínica, permitindo intervenção precoce antes do surgimento de sintomas clínicos.

2.4.2 Testes Moleculares de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR): qPCR na hanseníase

De acordo com Gama *et. al.* (2020), 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; 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 nove 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 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 RLEP conferia maior sensibilidade à técnica. No entanto, o ensaio com o RLEP foi positivo em quatro pacientes com outras doenças dermatológicas. O ensaio com *16S rRNA*, embora menos sensível, foi específico para o *M. leprae*.

Diversos estudos têm avaliado o emprego da PCR em tempo real (qPCR) no diagnóstico da hanseníase, com o objetivo de identificar alvos genéticos do *M. leprae*. No entanto, ainda não há consenso sobre qual alvo seria o mais adequado para o diagnóstico na fase inicial da doença (Benjak *et. al.,* 2018; Turankar *et. al.,* 2015).

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 do grupo PB apresentaram DNA de *M. leprae*

em pelo menos uma das amostras (sangue e/ou raspado dérmico). Entretanto, todos os pacientes do grupo PB foram negativos na 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 identificaram 19,23% dos contatos de PB e 27,87% dos contatos de MB como positivos para *M. leprae*. Em termos gerais, entre os 113 contatos assintomáticos avaliados por 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 o início do tratamento, especialmente em pacientes com PB e em casos de hanseníase neural pura. Sabe-se que, quando as condições clínicas e histológicas são insuficientes para o diagnóstico da hanseníase, a qPCR auxilia nesse diagnóstico. Nos casos em que houve suspeita de hanseníase da forma clínica PB, o uso simultâneo de qPCR e de 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, 25% foram diagnosticados clinicamente com hanseníase. Entretanto, ao empregar a qPCR e o ensaio ELISA, os autores identificaram um número significativamente maior de casos novos entre os contatos, com sensibilidade de 78% e especificidade de 75,2% para a qPCR, em comparação com o ELISA, que apresentou sensibilidade de 76% e especificidade de 49%.

De acordo com Manta *et. al.,* (2019), a utilização de diferentes amostras e alvos de *M. leprae* pode afetar a variabilidade da positividade da PCR. Esses autores mostraram que o uso do gene *16S rRNA* aumentou 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 *Random Forest* (floresta de decisão), com o objetivo de melhorar o desempenho dos testes diagnósticos para 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 foi de 57,9% e a especificidade, de 97,5%, enquanto no ensaio anti-LID-1, a sensibilidade e a especificidade foram de 63,2% e 92,5%, respectivamente. Entretanto, os autores concluíram que, por meio da análise integrada dos dados com *Random Forest*, obtiveram uma sensibilidade de 81,6% e uma 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 ao longo de cinco anos e identificou, entre os contatos, dois doentes, mesmo antes do diagnóstico clínico.

Segundo Manta *et. al.* (2022), os ensaios utilizando os marcadores 16S rRNA e RLEP do *M. leprae* apresentaram uma sensibilidade de 91% e especificidade de 100%. Ao avaliarem os valores preditivos positivos e negativos, obtiveram 100% e 90%, respectivamente, e esses valores foram semelhantes tanto em casos MB quanto em casos PB. Dessa forma, observaram que, do total de amostras avaliadas, apenas cinco foram classificadas incorretamente: uma negativa e quatro com resultados equivocados, caracterizados pela indeterminação e pela necessidade de avaliações complementares. Entretanto, todas apresentaram índice bacilar zero e nenhuma das amostras, provenientes de pacientes portadores de outras doenças de pele, foram classificadas como positivas para o *M. leprae.*

O kit NAT de hanseníase é o primeiro teste molecular comercial para a doença desenvolvido no Brasil e autorizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Esse registro permite a comercialização do teste e é exigido para que o exame seja oferecido no SUS. Esse teste foi desenvolvido 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 na investigação de uma doença negligenciada (FIOCRUZ, 2021).

Dornelas *et. al.* (2024), verificaram que casos indeterminados de hanseníase após 4 a 6 anos em uso de PQT, sem sinais de doença ativa, apresentaram positividade para DNA do *M. leprae em* 54,5% dos casos. Os autores sugeriram a presença de bacilos por mais

tempo do que o previsto, ressaltando que, embora a reinfecção não possa ser excluída, a qPCR positiva em indivíduos com suspeição de hanseníase pode indicar infecção subclínica, tornando-os potencialmente portadores e transmissores do *M. leprae.*

2.4.3 Aspectos da resistência a antimicrobianos

O desenvolvimento de microrganismos resistentes a fármacos é considerado uma grave ameaça ao controle de doenças infecciosas. Além disso, a avaliação da resistência do *M. leprae* aos fármacos da PQT não pode ser realizada por métodos fenotípicos, uma vez que o bacilo não é cultivável em meios artificiais *in vitro*, o que inviabiliza a realização de testes convencionais de sensibilidade (antibiograma). Dessa forma, a detecção da resistência baseia-se na avaliação genotípica, por meio da amplificação e do sequenciamento de regiões específicas dos genes-alvo, como *rpoB*, *folP1* e *gyrA*, que permitem identificar mutações pontuais associadas à resistência à rifampicina, à dapsona e às quinolonas, respectivamente (Scollard *et. al.*, 2006; Rivera, Casado e Soto, 2025).

No genoma de *M. leprae*, existem regiões determinantes de resistência a drogas (DRDR). A resistência às drogas utilizadas na PQT evoluiu devido às mutações nessas regiões DRDR e, entre os casos novos, ainda é considerada rara (Matsuoka *et. al.,* 2008).

A resistência às drogas na hanseníase manteve-se em níveis baixos após a introdução da PQT. Apesar de sua eficácia, não impede a mutação em algumas cepas, que podem desenvolver resistência a uma ou mais drogas da PQT. Apesar da recidiva ainda ser considerada rara, quando acontece, é um fator importante para indicar a falha terapêutica (Diorio *et. al.,* 2009; Kai, *et. al.*, 2011).

Diante disso, resistência primária a fármacos na hanseníase é definida pela presença de cepas de *M. leprae* resistentes em pacientes que nunca foram submetidos a qualquer regime de tratamento. Este fenômeno ocorre quando indivíduos são infectados por bacilos que já possuem mutações genéticas que conferem resistência, geralmente transmitidos por pacientes, tratados ou não, que abrigam essas cepas resistentes. A identificação da resistência primária é de suma importância para a saúde pública, pois indica a circulação de *M. leprae* resistente na comunidade, o que pode comprometer a eficácia da PQT desde o início e dificultar os esforços de controle da doença. Estudos recentes têm investigado a prevalência e os marcadores genéticos dessa resistência em diversas regiões, como o

Amazonas no Brasil, evidenciando a necessidade de vigilância genômica contínua para monitorar a disseminação dessas cepas (Braet *et. al.*, 2022; Ferreira *et. al.*, 2025).

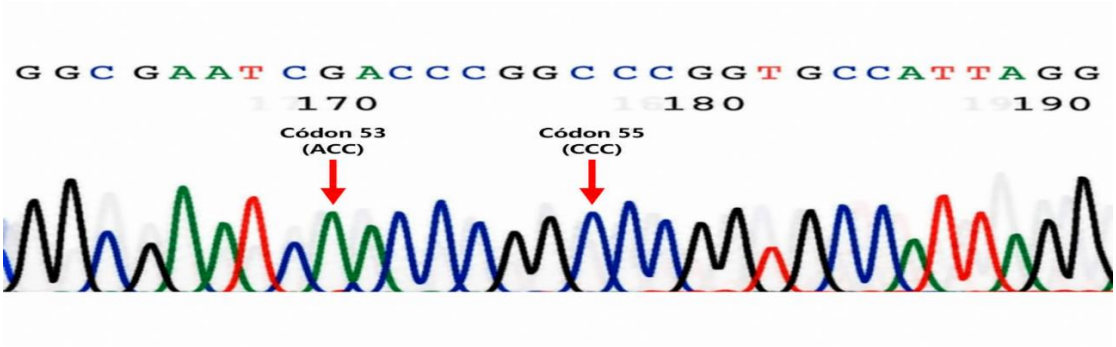
Já a resistência secundária desenvolve-se em pacientes que já receberam tratamento para hanseníase, mas que, devido à falha terapêutica ou à recidiva, apresentam cepas de *M. leprae* que adquiriram resistência durante o curso do tratamento. Este tipo de resistência é frequentemente associado a regimes de tratamento inadequados, à adesão deficiente do paciente ou ao uso de monoterapia, que favorecem a seleção de bacilos mutantes. A ocorrência de resistência secundária representa um desafio clínico considerável, exigindo a modificação do esquema terapêutico e, por vezes, o uso de drogas de segunda linha. A análise molecular de genes como *gyrA*, *folP1* e *rpoB* é crucial para identificar as mutações responsáveis por essa resistência e guiar a escolha de um tratamento de resgate eficaz, visando evitar a progressão da doença e a transmissão de cepas resistentes (Chauffour *et. al.*, 2021; Perera *et. al.*, 2025).

Entretanto, na hanseníase não existe uma definição oficial de bacilos multidroga-resistentes, sendo este termo utilizado quando se encontra *M. leprae* resistente à rifampicina e a outro fármaco utilizado no esquema PQT (Rocha, *et. al.*, 2012).

De acordo com Rosa *et. al.,* (2019), os primeiros casos de resistência a antimicrobianos no tratamento da hanseníase foram identificados por Pettit e Rees (1964). O registro de resistência à Rifampicina foi descrito em 1976 e o de resistência à Dapsona ocorreu em 1977 (Jacobson e Hastings, 1976; Pearson et al., 1977). O primeiro caso de resistência relacionada à PQT foi identificado por Shetty, Uplekar e Antia (1996). Sendo assim, o monitoramento de resistência antimicrobiana do *M. leprae*, bem como a vigilância epidemiológica, são pontos estratégicos da OMS para erradicação da hanseníase (Jouet *et. al.* 2023).

Segundo Singh e Cole (2011), a partir do sequenciamento do genoma de *M. leprae*, foi possível identificar dois genes relacionados à biossíntese de folato, denominados *folP1* e *folp2*. Esta descoberta foi importante porque a Dapsona atua sobre a enzima dihidropteroato sintase (DHPS), inibindo competitivamente o substrato da enzima, o ácido para-aminobenzóico (PABA), e, consequentemente, inibe a biossíntese do ácido fólico. A resistência à Dapsona está associada a mutações nos códons 53 e 55 do gene *folP1*, como ilustrado na Figura 3. Até o momento, nenhuma mutação do gene *folp2* foi associada à resistência a esta droga.

Figura 3 – Sequência do fragmento do gene *folP1* de *M. leprae* indicando os códons que podem sofrer mutações

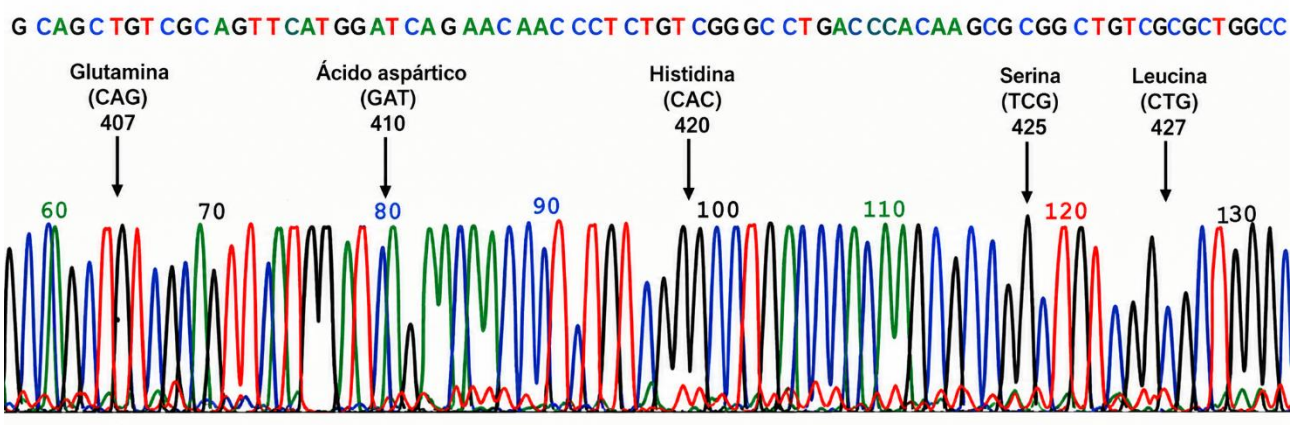


Fonte: Adaptado de Matsuoka *et. al.* (2008)

Os estudos de *Singh e Cole (2011)* também demonstraram que a resistência à rifampicina é principalmente devida a mutações em um pequeno locusdo gene *rpoB*, que codifica a subunidade β da enzima RNA polimerase, determinante da resistência à rifampicina, localizado entre os códons 407 e 427. Os autores relatam que milhares de isolados sensíveis à rifampicina não apresentam mutações no gene *rpoB*.

As mutações no gene *rpoB* até agora identificadas encontram-se nos códons 407, 410, 420, 425 e 427, assim como, inserções entre os códons 408 e 409 podem conferir resistência à rifampicina. No códon 407, ocorre a substituição de glutamina (CAG) por valina (GTG). No códon 410 foi identificada a mudança do ácido aspártico (GAT) → tirosina (TAT), no códon 420 troca a histidina (CAC) → ácido aspártico (GAC), no códon 425 troca serina (TCG) → leucina (TTG) (em alta frequência, similar à descrita para o *M. tuberculosis*) ou fenilalanina (ATG) → metionina (TTC). No códon 427, há uma substituição de leucina (CTG) por valina (GAG). Também foram identificadas outras mutações, por exemplo, nas posições 416 (serina (TCG) → cisteína (TGT)) e 408 (glicina → ácido aspártico), como ilustrado na Figura 4. Entretanto, ainda não está esclarecida a associação com resistência à rifampicina (Maeda *et. al.*, 2001; Matsuoka, 2010).

Figura 4 -Sequência do fragmento do gene *rpoB* de *M. leprae* indicando os códons que podem ter mutações

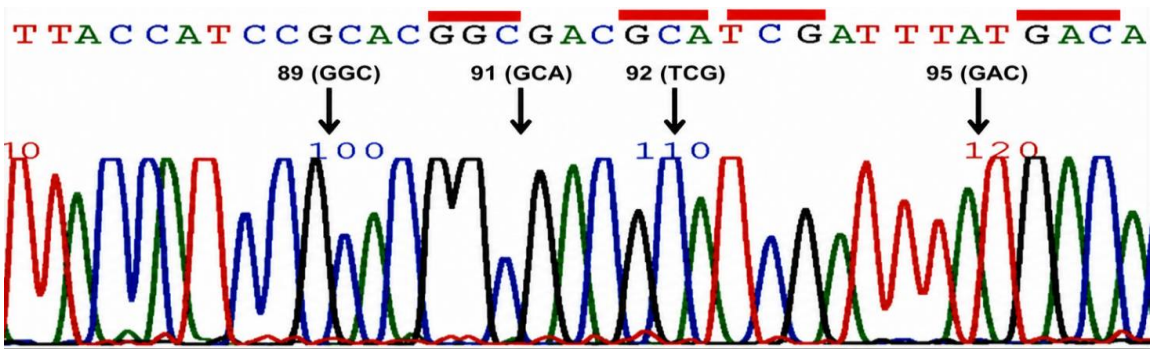


Fonte: Adaptado de Matsuoka *et. al.* (2008)

A ofloxacina, uma droga do grupo das fluoroquinolonas, inibe a replicação do DNA ao se ligar à subunidade A da girase do DNA, codificada pelo gene *gyrA*. Esta droga foi incluída no novo regime de rifampicina, ofloxacina e minociclina, conhecido como ROM, utilizado no tratamento da hanseníase na forma clínica PB. O primeiro achado de resistência a esta droga foi em 1994, quando foi identificado também um isolado proveniente do Haiti mostrando resistência múltipla à ofloxacina e à rifampicina (Cambau *et. al.*, 1997; Kai *et. al.*, 2011; Singh e Cole, 2011).

Segundo Matsuoka (2010), foram encontradas mutações no gene *gyrA*, presentes nos códons: 89: glicina (GGA) → cisteína (TGC) e no códon 91: alanina (GCA) → valina (GTA), como mostrado na Figura 5. Os códons 91 (serina) e 94 (asparagina) estão associados à resistência às quinolonas.

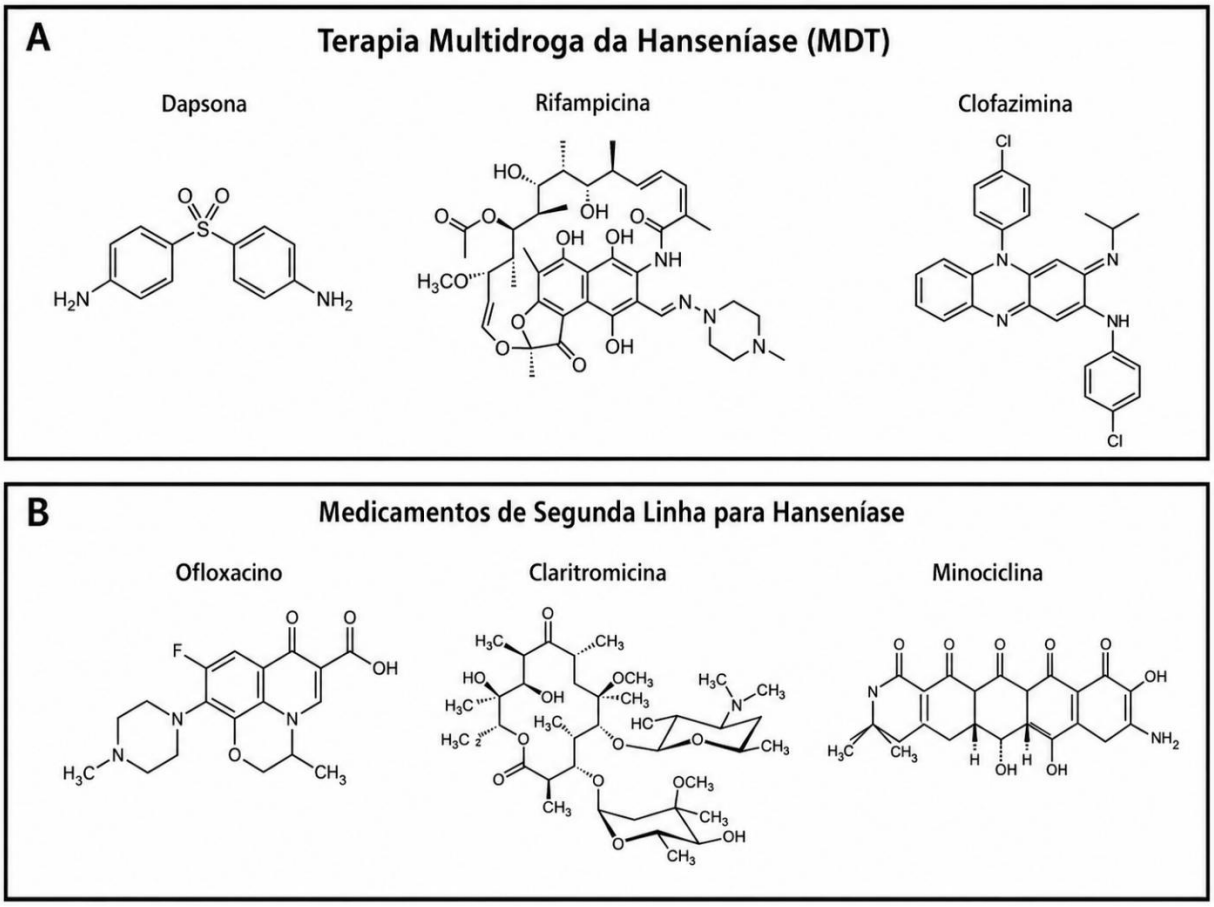
Figura 5 – Sequência do fragmento do gene *gyrA de M. leprae* destacando os códons que podem sofrer mutações



Fonte: Adaptado de Matsuoka *et. al.* (2008)

Estudos realizados por Avanzi *et. al.* (2016) demonstraram que, após a queda inicial da taxa de transmissão da hanseníase com a implementação da PQT, a incidência estagnou em 2005, o que sinaliza a continuidade da transmissão ativa. Diante da persistência da transmissão, a manutenção de regimes terapêuticos eficazes torna-se importante. Nesse contexto, a Dapsona, a Rifampicina e a Clofazimina (Figura 6) permanecem como medicamentos de primeira linha para o tratamento de M. leprae, enquanto a Ofloxacina, a Minociclina e a Claritromicina constituem a segunda linha. Entretanto, a ineficácia dos medicamentos alternativos e a resistência aos fármacos de primeira escolha podem comprometer seriamente os programas de controle da hanseníase e a interrupção da cadeia de transmissão. Além disso, os medicamentos alternativos utilizados no tratamento da hanseníase também são empregados como primeira escolha em outras infecções, especialmente as respiratórias e urinárias, o que reforça a importância do uso criterioso desses fármacos e a necessidade de atenção ao surgimento de resistência.

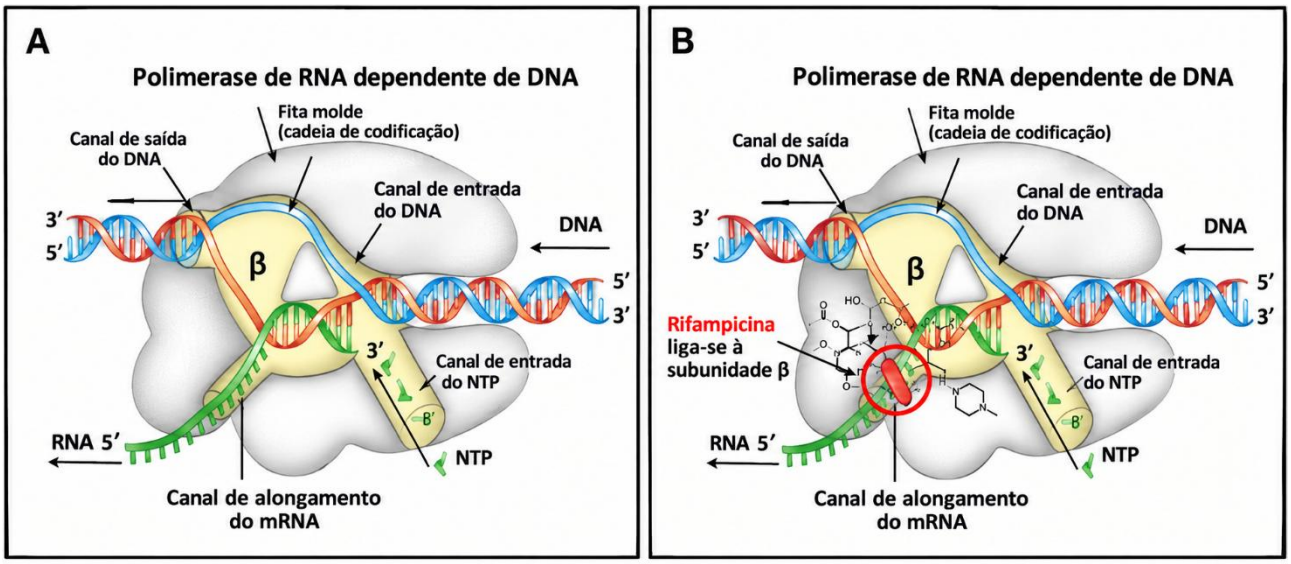
Figura 6 - Estruturas químicas dos medicamentos usados no tratamento da hanseníase



Fonte: Adaptado de Cambau; Williams (2019).

A rifampicina, um derivado da rifamicina, é o principal componente bactericida da PQT recomendada pela OMS, para o tratamento da hanseníase. O alvo da rifampicina nas bactérias é a subunidade β da RNA polimerase dependente de DNA (composta por um dímero de subunidades α e β e uma subunidade ω). A rifampicina liga-se à subunidade β da RNA polimerase dependente de DNA, bloqueando a elongação da cadeia de RNA nascente e inibindo a transcrição, o que resulta na morte do bacilo, como ilustra a Figura 7. A rifampicina apresenta rápida atividade bactericida contra *M. leprae* em camundongos e em humanos, resultando na ausência de bacilos viáveis detectáveis após um mês de tratamento (Li *et. al.*, 2022; Froes Junior; Sotto; Trindade, 2025).

Figura 7 - Ilustração da inibição da RNA polimerase dependente de DNA por Rifampicina



Fonte: Adaptado de Cambau; Williams (2019).

O surgimento de bactérias resistentes à medicação utilizada no tratamento da hanseníase ocorre a partir de uma cepa já resistente (resistência primária) ou por mutação genética em uma cepa selvagem (virgem de tratamento). Os primeiros relatos de resistência à dapsona e à rifampicina foram identificados na África Ocidental (Avanzi *et. al.*, 2016). A resistência à dapsona não é considerada uma grande preocupação no controle da hanseníase. Entretanto, a resistência à rifampicina é preocupante, pois se trata de um medicamento bactericida essencial no controle da doença.

Alzate *et. al.* (2016), observaram mutações em amostras de pacientes recidivados, que incluíam *folP1* em Treonina (Thr) 88 para Prolina (Pro), em *rpoB* Alanina (Ala) 426 para Thr, Arginina (Arg) 505 para Triptofano (Trp), e no gene *gyrA* Ala 107 para Leucina (Leu).

Estas informações, associadas às evidências clínicas, podem auxiliar na escolha de um tratamento alternativo para o paciente, como a combinação de Rifampicina, Ofloxacina e Minociclina. Apesar de sua importância, os testes de resistência a medicamentos não estão disponíveis de forma rotineira nos programas de controle da hanseníase devido a problemas logísticos e financeiros.

De acordo com Lavania *et. al.* (2018), os estudos realizados na Índia mostraram que pacientes que apresentaram recidiva após administração da PQT, estavam infectados com cepa de *M. leprae,* com mais de duas mutações indicativas de resistência a múltiplas drogas. E, ainda, uma das amostras apresentou mutações em três genes que conferem resistência a Rifampicina, Dapsona e Ofloxacino. Apesar de apresentarem o gene de resistência, o trabalho não detectou a resistência *in vivo.*

Em trabalho realizado com 1932 casos de hanseníase, Cambau *et. al.*, (2018), verificaram que 154 indivíduos (8,0%) apresentaram cepas de *M. leprae* com gene de resistência a PQT. Nesse estudo, foram identificados 74 genes de resistência à Rifampicina, 87 à Dapsona e 21 à Ofloxacina.

A Dapsona é um inibidor competitivo do ácido para-aminobenzóico (PABA), um substrato crítico na biossíntese do folato. A Dapsona bloqueia a condensação do PABA e 7,8-diidro-6-hidroximetilpeterina-pirofosfato, formando o 7,8-di-hidrofólico. A enzima-chave nesta etapa é a dihidropteroato sintase (DHPS) codificada pelo gene *folP1*. A Dapsona inibe competitivamente essa condensação e, em última análise, resulta na diminuição da produção de tetra-hidrofolato, um componente essencial para a biossíntese de ácidos nucleicos em *M. leprae* (Cambau; Williams, 2019).

A Clofazimina é um composto lipofílico derivado da fimonofenazina com atividade antimicobacteriana. No entanto, o mecanismo não foi plenamente elucidado. A ligação do fármaco ao DNA parece ocorrer principalmente em sequências de bases contendo guanina, o que pode explicar a preferência da clofazimina pelos genomas de micobactérias ricos em guanina e citosina em relação ao DNA humano. O acúmulo de lisofosfolipídios (agentes detergentes, com propriedades disruptivas de membranas das células bacterianas) parece mediar a atividade antibacteriana da clofazimina em algumas bactérias Gram-positivas, porém, sua contribuição para a atividade contra o *M. leprae* permanece incerta (Islam *et. al.*, 2024).

As Fluoroquinolonas foram testadas contra *M. leprae* após demonstrarem atividade inibitória e eficácia clínica contra *M. tuberculosis*. Seu modo de ação é inibir a

topoisomerase do tipo II, o que leva à formação de quebras de fita dupla no DNA e à inibição da replicação. Enquanto a maioria das bactérias abriga duas topoisomerases do tipo II, a girase do DNA e a topoisomerase IV, *M. tuberculosis* e *M. leprae* não parecem possuir a última. Consequentemente, em *M. leprae* e M. *tuberculosis*, o alvo das fluoroquinolonas é a girase do DNA, um tetrâmero composto por duas subunidades A (*gyrA*) e duas subunidades B (*gyrB*). Demonstrou-se que as fluoroquinolonas inibem a *gyrA* do DNA do *M. leprae* (Chhabra *et. al.*, 2023; Li *et. al.*, 2022).

Dados de Rosa *et. al.* (2019), mostraram que três dos quatro alelos identificados nos genes de resistência não foram associados a resistência anteriormente conhecida do *M. leprae*, caso 1: CTA 470 CAA (Leucina – Glicina) em *rpoB*, detectado em uma recidiva, caso 2: CGG 100 TGG (Arginina – Triptofano) no *folP1*, também em um paciente com recidiva e caso: 3 TTA 97 TTT (Leucina – Fenilalanina) em *gyrA*, detectado em uma recidiva e um novo caso. Inocularam todas as cepas com mutações na pata de camundongo, e apenas a rpoB CTA 470 CAA (Leucina – Glicina) apresentou crescimento positivo, com sensibilidade à Dapsona e à Rifampicina *in vivo*.

As mutações genéticas ocorrem ao longo do tempo como consequência da adaptação do microrganismo. No caso da hanseníase, os bacilos sofreram mutações, o que resultou em resistência a alguns antibióticos, possivelmente devido ao uso de monoterapia. As mutações que conferem resistência a alguns antibióticos já foram identificadas. Para a Dapsona, Rifampicina e Ofloxacina, o mecanismo de resistência foi atribuído a mutações de troca de aminoácido (*missense)*, regiões determinantes dos genes *folP1, rpoB e gyrA*, respectivamente (Benjak *et. al.,* 2018; Rosa *et. al.,* 2019).

Nas investigações de resistência quanto ao tipo de material utilizado, Jouet *et. al.* (2024) verificaram que os resultados e limites de detecção eram semelhantes em termos de valores de Ct RLEP quando avaliados DNA de 33 biópsias e 74 raspados intradérmicos. Entretanto, o material de DNA sequenciado, extraído por raspado intradérmico, pareceu ligeiramente inferior.

Atualmente, Sardana *et. al.* (2024) discutem a crescente preocupação com a resistência antimicrobiana em pacientes com hanseníase, especialmente em casos de recidiva e de reações hansênicas. O estudo destaca a importância de realizar testes de sensibilidade antes de iniciar o tratamento com drogas de segunda linha, como ofloxacina, minociclina e claritromicina, a fim de evitar o desenvolvimento de resistência adicional. A resistência é frequentemente associada a mutações nas regiões determinantes de

resistência (DRDR) dos genes *folP1, rpoB* e *gyrA*, que conferem resistência a medicamentos essenciais, como dapsona, rifampicina e ofloxacina. Além disso, os autores sugerem que a vigilância inadequada da resistência em casos de reações hansênicas, como o eritema nodoso leproso (ENL), pode favorecer a multiplicação de bacilos resistentes, agravando o quadro clínico e dificultando o controle da hanseníase. Portanto, a implementação de estudos multicêntricos e a revisão das diretrizes de manejo, para incluir o monitoramento da resistência em casos de reações crônicas e de recidivas, são fundamentais.

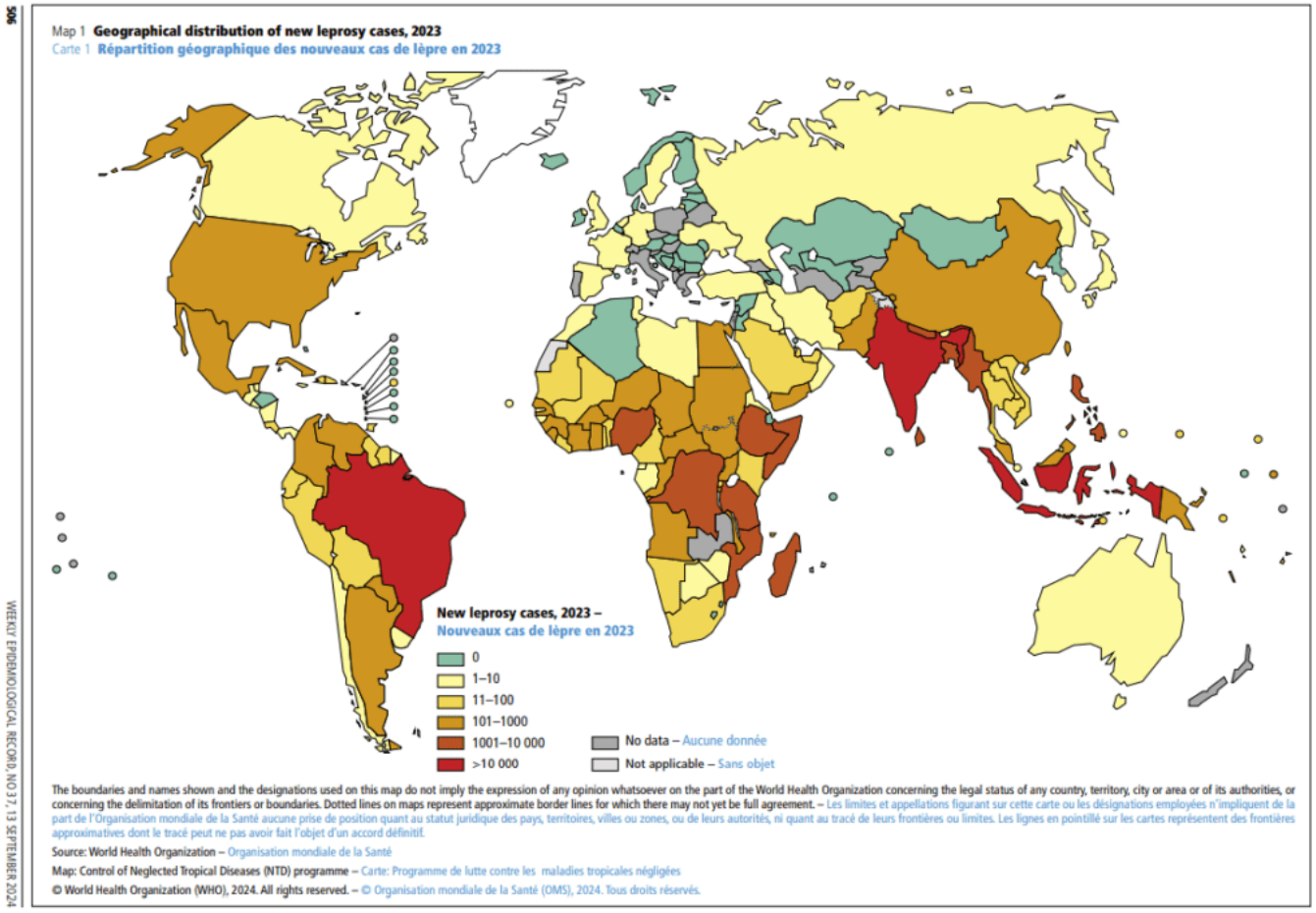
2.5 TRANSMISSÃO E EPIDEMIOLOGIA DA HANSENÍASE

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 (Pescarini *et. al.,* 2020; Vieira *et. al.,*2014). O tempo para manifestação clínica da hanseníase varia entre 2 e 7 anos; o método de transmissão, possivelmente, é a via respiratória; e para contágio é necessário contato próximo e prolongado, além de susceptibilidade individual (Carvalho *et. al.*, 2018; Fonseca *et. al.*, 2017; Gillini *et. al.,* 2017; Montoya; Alzate; Castro*,* 2017).

A transmissão da hanseníase permanece ativa no mundo, visto que 62 países relataram novos casos em menores de 15 anos (OMS, 2021). No decorrer de 2020, 8.629 novos casos foram diagnosticados, o que corresponde a 6,8% do total de casos. O acometimento de menores de 15 anos pressupõe a presença de adultos doentes, sem diagnóstico e/ou sem tratamento, que convivem com crianças e adolescentes e lhes transmitem a hanseníase (OMS, 2021; Brasil, 2022).

Em 2024, foram notificados à OMS 172.717 novos casos da doença no mundo. Desses, 22.129 foram notificados no Brasil, o que corresponde a mais de 90% dos casos novos registrados nas Américas, conforme mostra a Figura 8. Nesse contexto, o Brasil ocupa o segundo lugar entre os países com maior número de casos no mundo, atrás apenas da Índia (OMS, 2024).

Figura 8 - Distribuição de novos casos de hanseníase no mundo



Fonte: Organização Mundial de Saúde (2024).

Dados recentes revelam a magnitude desse problema. No período de 2015 a 2024, o Brasil notificou um total de 301.475 casos de hanseníase, dos quais 238.204 foram classificados como novos. Essa cifra representa uma média anual de aproximadamente 23.820 novos diagnósticos, o que indica uma incidência persistente da doença na população. Em 2024, foram registrados 22.129 casos novos, o que corresponde a uma taxa de detecção de 10,41 por 100 mil habitantes. Este índice classifica a endemicidade do país no patamar "alto", conforme os parâmetros epidemiológicos estabelecidos. A relevância do cenário brasileiro é ainda mais acentuada ao considerarmos que o país concentra a vasta maioria dos casos de hanseníase nas Américas, o que sublinha sua posição central na epidemiologia global da doença. Adicionalmente, o ano de 2024 destacou-se pela maior proporção de casos detectados por meio do exame de contatos (13,3%) e pela maior proporção de recidivas (5,6%) em toda a série histórica analisada, sugerindo tanto uma

melhoria na vigilância quanto a persistência de desafios no tratamento e acompanhamento (Brasil, 2026).

No Brasil, a análise da proporção de casos novos com GIF 2 tem revelado uma tendência preocupante de aumento. Em 2015, essa proporção era de 7,5%, mas em 2024 atingiu 11,5%. Esse incremento não apenas consolida a manutenção do parâmetro de endemicidade do país em nível alto (considerando o parâmetro de 10,0% para GIF 2), mas também aponta para falhas persistentes na detecção precoce e no acesso oportuno ao tratamento, e a distribuição regional da proporção de GIF 2 evidencia disparidades significativas. Em 2024, a Região Sul apresentou a maior proporção (14,5%), seguida pelo Centro-Oeste (13,7%) e pelo Sudeste (12,5%). Entre as Unidades da Federação, o Acre (18,8%), o Rio Grande do Sul (17,4%) e Roraima (16,2%) registraram os maiores índices de incapacidade severa no momento do diagnóstico. Tal cenário reforça a necessidade de intervenções direcionadas e personalizadas nas regiões e estados mais afetados, visando fortalecer a capacidade diagnóstica e o acompanhamento dos pacientes desde os primeiros sinais da doença. A persistência de altos índices de GIF 2 sublinha a urgência de aprimorar as políticas de saúde pública para garantir que os pacientes recebam tratamento antes que as sequelas se tornem irreversíveis, minimizando o impacto social e econômico da hanseníase (Brasil; 2026).

2.5.1 Hanseníase em Minas Gerais

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, por meio da reestruturação da Rede de Atenção à Pessoa com hanseníase (RAPH), de acordo com as especificidades regionais e municipais (Minas Gerais, 2019).

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 (2019), 62,75% dos municípios da SRS/GV eram hiperendêmicos para hanseníase e 78,43% estão no grupo de prioridade 3, o que indica que merecem atenção devido à alta endemicidade. Dos 50 municípios que compõem este território administrativo de saúde, 13 (25,5%) registraram casos novos em crianças entre

2013 e 2017 e 23 (45,1%) registraram casos novos já com incapacidade física de grau 2. Em todos estes indicadores, o Município de Governador Valadares apresentou as maiores taxas e integra o grupo de municípios prioritários no estado de Minas Gerais (Minas Gerais, 2019).

Em estudo realizado por Leite *et. al.* (2019), o Estado de Minas Gerais notificou, nos últimos oito anos, índices que variam entre 1524 e 1035 casos novos por ano. Em 2018, foram notificados 1.035 novos casos, o que corresponde a 4,92 novos diagnósticos por 100 mil habitantes, dos quais 5,6% (58) ocorreram em menores de 15 anos. Do total de casos novos notificados em 2018, 11,9% foram diagnosticados com deformidade, o que indica um alto percentual de diagnósticos tardios. Os autores descreveram os resultados de uma série histórica para avaliar a proporção de municípios silenciosos (sem novos casos diagnosticados 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).

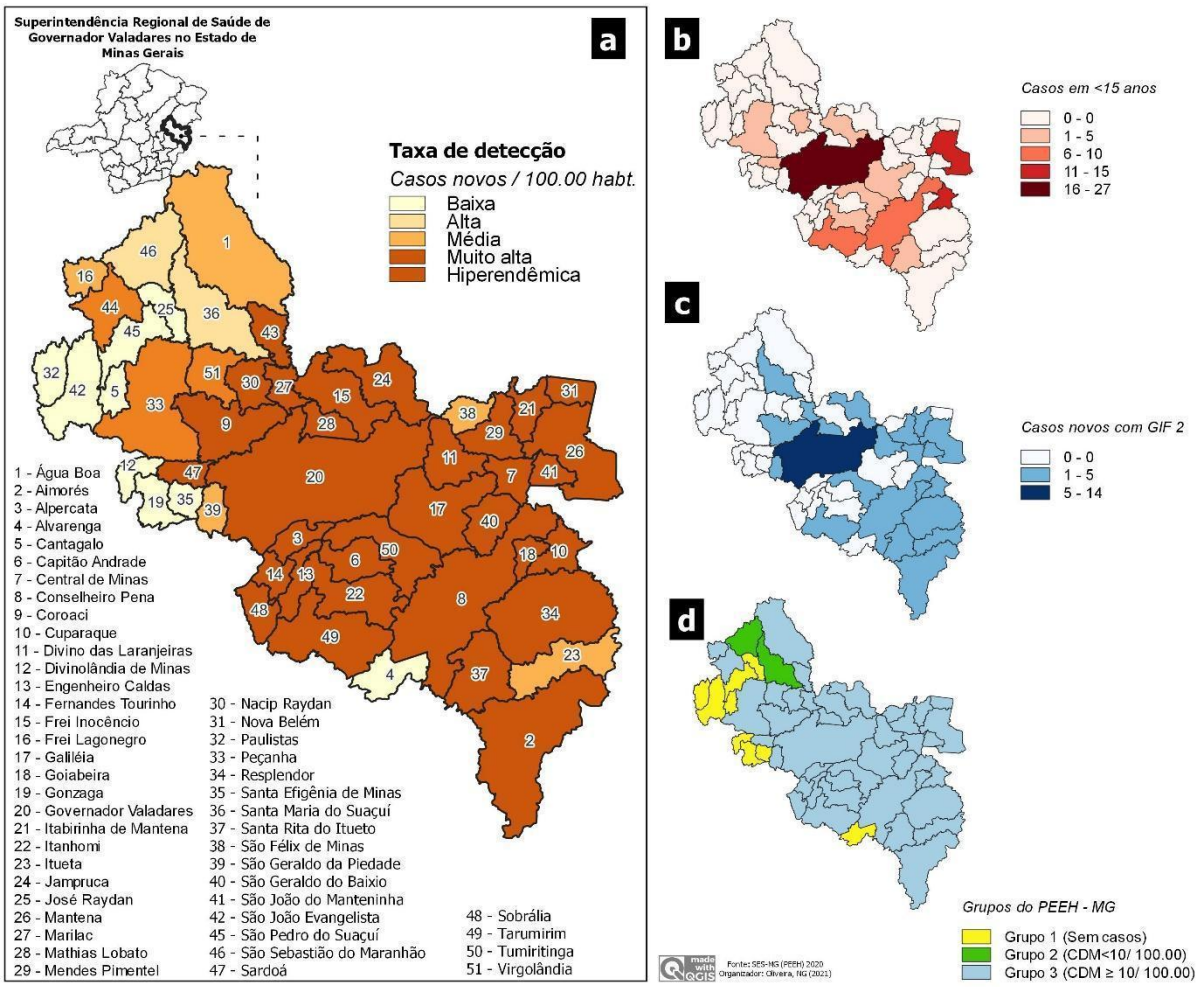
Diante disso, a Superintendência Regional de Saúde de Governador Valadares (SRS/GV) configura-se como um território de alta prioridade epidemiológica, com indicadores que demandam intervenções específicas e contínuas. Enquanto a média de detecção do estado se mantém em patamares moderados, a SRS/GV tem registrado, predominantemente, taxas de detecção classificadas como "altas", com valores entre 10,00 e 19,99 por 100 mil habitantes na maior parte do período entre 2021 e 2025. Esse cenário posiciona a região como um dos principais bolsões de transmissão ativa no território mineiro, em contraste com o silêncio epidemiológico observado em outras macrorregiões do estado (Minas Gerais; 2026).

A situação epidemiológica de Governador Valadares evidencia a manutenção da transmissão ativa da hanseníase, especialmente ao se analisar o indicador de detecção em menores de 15 anos, considerado um marcador sensível de infecção recente por *M. leprae*. Dados do boletim estadual indicam que SRS/GV apresentou, em determinados períodos, taxas classificadas como altas e muito altas nessa faixa etária, sugerindo a presença de focos ativos de transmissão que ultrapassam o ambiente domiciliar e atingem a comunidade. Esse cenário torna-se ainda mais relevante quando associado ao diagnóstico tardio na região, uma vez que a ocorrência de casos em crianças e adolescentes frequentemente reflete a presença de indivíduos adultos bacilíferos não diagnosticados ou

tratados tardiamente, o que contribui para a manutenção da cadeia de transmissão no território (Leite, *et. al.*; 2019; Minas Gerais; 2026).

A Figura 9 apresenta a localização dos municípios que compõem a SRS-GV e a situação endêmica no período do estudo.

Figura 9 - Localização e caracterização dos cenários dos municípios que compõem a SRS de Governador Valadares no período de 2019 – 2022.



Fonte: adaptado de Pinheiro, 2022.

Indicadores epidemiológicos da hanseníase na Superintendência Regional de Saúde de Governador Valadares, Minas Gerais. a) Taxas de detecção de casos novos de hanseníase 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 CDM* - Coeficiente de Detecção Médio (PEEH – MG 2019).

2.5.2 Situação atual da hanseníase no município de Governador Valadares

De acordo com o IBGE, Governador Valadares tinha um PIB per capita de R$ 22.278,79 em 2020 (IBGE, 2023). O índice de desenvolvimento humano (IDH) em 2010 era de 0,727, o que classificava o município na posição 96 entre os municípios do Estado, considerado de alto nível e com faixa de desenvolvimento humano de 0,8 (IBGE, 2023). As atividades econômicas mais relevantes no município são desenvolvidas por cerca de 11 mil micro e pequenas empresas estabelecidas na cidade, sendo 43% no setor de comércio, 38% no setor de serviços, 16% no setor industrial e 3% no setor agropecuário (BDMG, 2021).

De acordo com o Plano Municipal de Saúde de Governador Valadares 2022-2025 (PMS) (Governador Valadares, 2021a), o município contava com a Atenção Primária à Saúde (APS), organizada em equipes com alta capilaridade territorial na malha urbana e na zona rural, composta por 59 Estratégias de Saúde da Família (ESF) e 5 Unidades Básicas de Saúde (UBS).

A Unidade Regional de Saúde de Governador Valadares, localizado no leste do Estado, apresenta taxas classificadas como altas com valores de detecção que variam entre 10,0 e 19,99/100 mil habitantes na maior parte do período (Minas Gerais, 2026). A cidade possui uma população estimada de 279.885 habitantes e registra novos casos entre menores de 15 anos (IBGE, 2023; Minas Gerais, 2020). O município é referência no enfrentamento da hanseníase há décadas. Apresenta marcos históricos, como, por exemplo, estabelecimento da sede da Fundação SESP desde a década de 40, a implantação da PQT nos anos 80, a fundação do Centro de Referência em Doenças Endêmicas e Programas Especiais (CREDEN-PES) em 2001, a tentativa de descentralização, a capacitação e a campanha em 2002, o campo de formação de mestres a partir de 2010, com dissertações no tema, e a atuação de grupos inclusivos de autocuidado, que merecem destaque (Governador Valadares; 2021a).

De acordo com a Secretaria Municipal de Saúde (SMS), no Plano Municipal de Enfrentamento à Hanseníase (PMEH), a tendência temporal da detecção de casos de hanseníase no município, de 2002 a 2020, foi a diminuição do número de diagnósticos na população geral, acompanhada também de redução na detecção de casos em menores de 15 anos. Entretanto, a partir da análise da ocorrência de novos casos em menores de 15 anos, é possível afirmar que ainda há transmissão ativa no município, já que o longo período

de incubação da doença pode indicar a convivência de uma criança com um adulto doente sem tratamento (Governador Valadares, 2021b).

Ainda, segundo a SMS (Governador Valadares, 2021b), a proporção de contatos de casos novos examinados entre os registrados aumentou significativamente, de 50,4% em 2010 para 76,2% em 2020, o que evidencia uma melhora expressiva nesse parâmetro.

3. OBJETIVOS

Nesta seção serão apresentados os objetivos do presente trabalho.

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a detecção molecular de *Mycobacterium leprae* e investigar a resistência à poliquimioterapia em indivíduos classificados como casos e com suspeição de hanseníase no Leste de Minas Gerais

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar o acompanhamento longitudinal dos indivíduos com qPCR positiva para monitorar a evolução clínica e identificar precocemente adoecimento para a hanseníase;
2. Caracterizar o perfil sociodemográfico e a distribuição espacial dos indivíduos com qPCR positiva para *M. leprae*;
3. Avaliar o raspado intradérmico como fonte de DNA para realização do sequenciamento dos genes *folP1, rpoB e gyrA* do *M. leprae* de amostras de indivíduos casos e com suspeição de hanseníase;
4. Sequenciar os genes *folP1, rpoB e gyrA* para identificar mutações associadas à resistência aos principais fármacos da poliquimioterapia dos indivíduos casos e com suspeição de hanseníase para investigação de resistência primária e secundária.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção serão apresentados os materiais e métodos utilizados para atingir os objetivos do presente estudo.

4.1 ÁREA DE ESTUDO

O Centro de Referência em Doenças Endêmicas (CREDEN-PES) é uma unidade de saúde cuja finalidade é oferecer atendimento especializado e vigilância integrada a agravos endêmicos, incluindo hanseníase, tuberculose e leishmaniose tegumentar e visceral.

Os pacientes atendidos são referenciados por unidades de atenção primária à saúde, por outras unidades de referência, por profissionais do setor privado ou encaminhados de outros municípios. A unidade também acolhe pacientes que buscam atendimento por iniciativa própria.

Para os casos em tratamento, há um acolhimento contínuo e integral dos familiares, realizado por uma equipe multiprofissional. O CREDEN-PES presta serviços ao Município e possui uma pactuação para atender às microrregiões de Governador Valadares e de Resplendor. Além disso, o CREDEN-PES funciona como unidade de referência para o diagnóstico e o suporte ao manejo da hanseníase, abrangendo tanto o atendimento médico quanto o apoio diagnóstico por meio do raspado intradérmico e da avaliação dos contatos domiciliares dos casos diagnosticados.

4.2 DESENHO EXPERIMENTAL

Nesta seção será apresentado o desenho experimental do presente estudo.

4.2.1 Mestrado – Identificação Molecular e classificação inicial

O estudo teve início durante o mestrado, quando foram avaliadas 411 amostras provenientes de indivíduos investigados para hanseníase. As amostras foram submetidas à reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR), tendo como alvo a região específica repetitiva do genoma de *M. leprae* (RLEP). Para a classificação dos resultados moleculares,

foram considerados positivos aqueles que apresentaram valor de *cycle threshold* (Ct) inferior a 37 (Pinheiro, 2022; Pinheiro *et. al.*, 2023).

Das 411 amostras analisadas, 278 (67,6%) apresentaram *Ct* inferior 37, sendo consideradas positivas para o alvo RLEP, enquanto 133 (32,4%) apresentaram resultado indeterminado.

Entre as 278 amostras positivas para RLEP, 158 (56,8%) pertenciam a indivíduos que apresentavam registro de notificação de hanseníase no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) da Superintendência Regional de Saúde de Governador Valadares (SRS-GV). Esses indivíduos foram classificados como casos de hanseníase, de acordo com o registro de notificação disponível na base de dados utilizada no estudo.

As outras 120 (43,2%) amostras positivas para RLEP pertenciam a indivíduos que não apresentavam registro de notificação de hanseníase no SINAN da SRS-GV. Esses indivíduos foram classificados, naquele momento, como indivíduos com suspeição de hanseníase, constituindo um grupo distinto dos casos previamente notificados (Pinheiro, 2022; Pinheiro *et. al.*, 2023).

Assim, a etapa desenvolvida no mestrado permitiu a identificação de dois grupos entre os indivíduos com resultado positivo para RLEP: 158 indivíduos com registro de hanseníase no SINAN e 120 indivíduos com resultado positivo para RLEP, porém sem registro de notificação de hanseníase no SINAN. A identificação e caracterização desses grupos constituíram a base amostral para as análises subsequentes desenvolvidas no doutorado.

4.2.2 Doutorado – Seguimento clínico, análise espacial e investigação molecular de resistência

A base amostral estabelecida durante o mestrado constituiu o ponto de partida para as investigações desenvolvidas no doutorado. Entre os indivíduos identificados na etapa inicial, foram selecionados para acompanhamento longitudinal os 120 indivíduos que apresentaram resultado positivo para o alvo RLEP (Ct inferior 37), que não possuíam registro de notificação de hanseníase no SINAN da SRS-GV e apresentavam baciloscopia de raspado intradérmico negativa.

A inclusão desses indivíduos no doutorado teve como objetivo investigar sua evolução clínica e epidemiológica ao longo do período definido no protocolo da tese,

particularmente quanto à ocorrência posterior de sinais e sintomas compatíveis com hanseníase e à eventual confirmação diagnóstica durante o acompanhamento. Dessa forma, embora a identificação dos 120 indivíduos tenha ocorrido na etapa do mestrado, o acompanhamento longitudinal e a avaliação de sua evolução clínica constituíram procedimentos específicos do doutorado.

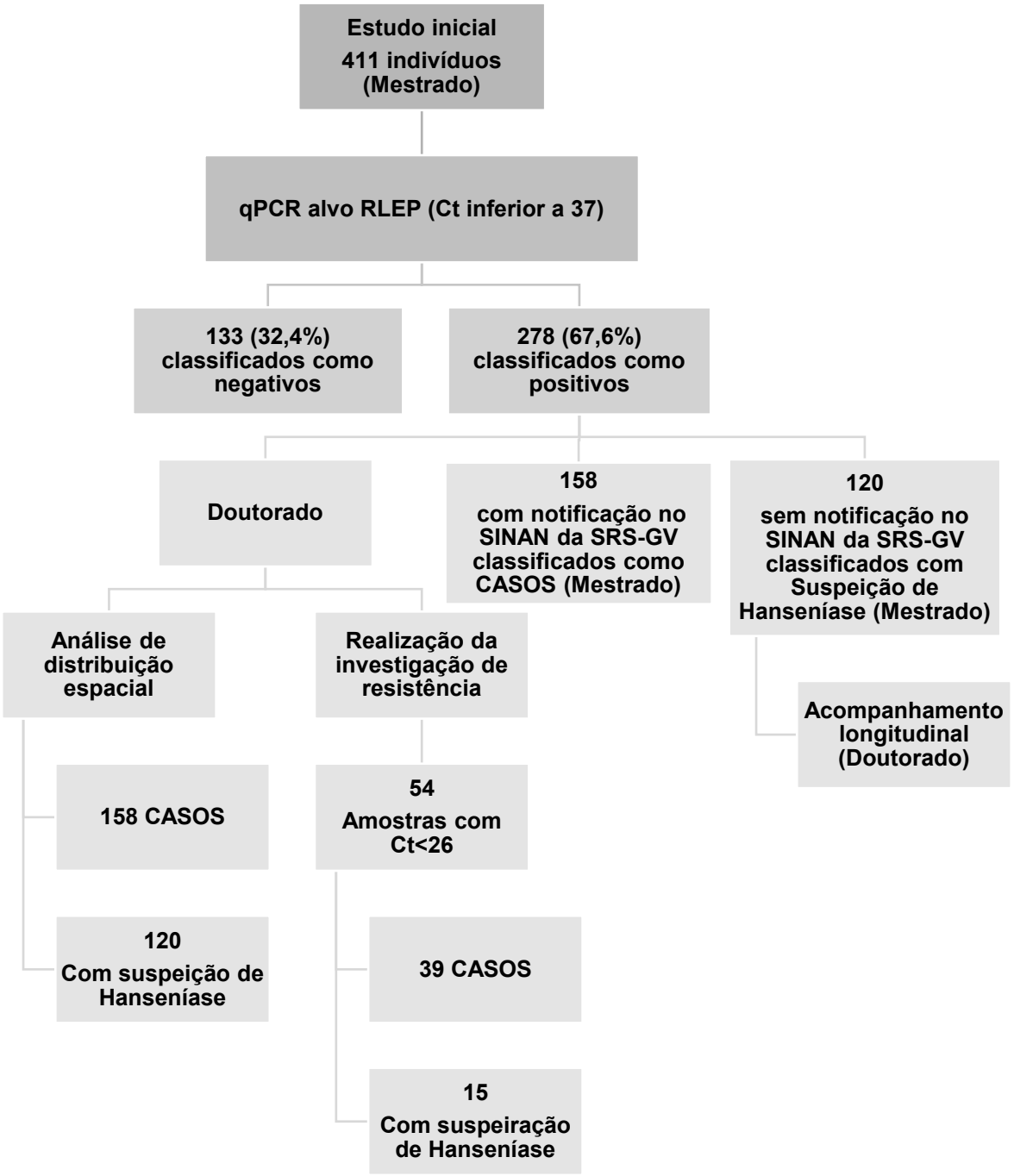
Paralelamente, os 158 indivíduos com registro de hanseníase no SINAN, identificados na etapa inicial, foram utilizados como população de referência para a análise da distribuição espacial. No doutorado, foram realizados o georreferenciamento dos indivíduos, a elaboração da representação cartográfica e a avaliação da distribuição espacial e da possível sobreposição territorial entre os 120 indivíduos acompanhados e os 158 casos previamente notificados.

Além disso, nesta segunda etapa, foi realizada a investigação molecular de mutações potencialmente associadas à resistência aos antimicrobianos utilizados no tratamento da hanseníase. Para essa análise, foram consideradas as amostras que apresentaram *Ct* inferior a 26 na qPCR do alvo RLEP, critério estabelecido para selecionar amostras com maior quantidade de DNA de M. leprae e, consequentemente, maior potencial para a obtenção de produtos adequados ao sequenciamento. Foram selecionadas 54 amostras, sendo 39 de indivíduos classificados como casos de hanseníase e 15 de indivíduos com suspeição de hanseníase. As regiões dos genes *rpoB*, *folP1* e *gyrA* foram investigadas por meio de sequenciamento, com o objetivo de identificar mutações potencialmente associadas à resistência a rifampicina, dapsona e fluoroquinolonas, respectivamente.

Portanto, o mestrado correspondeu à etapa de identificação molecular e à classificação inicial da população estudada, enquanto o doutorado correspondeu à continuidade da investigação, envolvendo o acompanhamento longitudinal dos 120 indivíduos sem notificação, a análise espacial desses indivíduos em comparação com os 158 casos previamente identificados e a investigação molecular de marcadores associados à resistência antimicrobiana.

A Figura 10, apresenta o fluxograma do desenho experimental realizado nas fases do mestrado e doutorado.

Figura 10 - Desenho experimental e fluxo metodológico do estudo: da identificação molecular realizado no mestrado e às análises clínicas, espaciais e de resistência realizado no doutorado



Fonte: Elaborado pelo autor (2026)

4.2.3 Técnica de coleta, armazenamento e extração de DNA.

Os procedimentos de coleta, extração e quantificação do DNA de *M. leprae* aqui descritos foram desenvolvidos e executados durante o mestrado do autor (Pinheiro, 2022). A presente tese constituiu a continuidade dessa linha de investigação: partindo do protocolo então validado, o estudo avançou para a análise de marcadores genotípicos de resistência do *M. leprae* aos fármacos da poliquimioterapia, de modo que a etapa metodológica anterior serviu de base para a investigação aqui apresentada.

4.2.4 Ensaio de Pré-PCR para amplificação dos genes *folP1, rpoB* e *gyrA*.

O protocolo de amplificação para os três genes seguiu o sistema Taq, tendo como alvo os genes *rpoB* (aproximadamente 300 a 400 pb) e *folP1* e *gyrA* (entre 200 e 300 pb), utilizando os iniciadores (*primers*) indicados no Quadro 1.

Quadro 1- Sequência dos *primers* utilizados na PCR para amplificação e posterior sequenciamento dos genes *folP1*, *rpoB* e *gyrA*.

Nome do oligonucleotídeo	Sequência
folP1 F	CCACCAGACACATCGTTGAC
folP1 R	CTGACAATTCGTTCTCAGATGG
rpoB F	CAGATCCGGGTCGGTATGTC
rpoB R	ACTTTGCGGTACGGTGTTTC
gyrA F	GGTCTTGTACGCGATGTTAGACT
gyrA R	GAATTTCCTGACACACAATAACG

Fonte: FIOCRUZ/INSTITUTO LAURO DE SOUZA LIMA

As reações foram otimizadas para um volume final de 28 µL, contendo água 6 µl, tampão 1x 2,5 µl, *Qsolution* 5 µl, MgCl2 2,0 nM com 1 µl, dNTPs 0,2 nM com 1,6 µL, *primers Forward* e *Reverse*, com 10 nM e 1 µl de cada, TaqDNA 1 U e 0,5 µl, *Template* (DNA) 10 µl. Foram realizados 45 ciclos, conforme o procedimento descrito na Tabela 1 a seguir.

Tabela 1 - Parâmetros da PCR, para amplificação dos genes *folP1, rpoB* e *gyrA*

Parâmetros de Ciclagem – 45 ciclos		
Ativação	95ºC – 5 minutos	
Desnaturação	94ºC – 30 segundos	
Anelamento	62ºC – 45 segundos	15X
Extensão	72ºC – 1 minuto	
Ir para (*Go to*)	Desnaturação	15X
Desnaturação	94ºC – 30 segundos	
Anelamento	58ºC – 45 segundos	20X
Extensão	72ºC – 1 minuto	
Ir para (*Go to*)	Desnaturação 20X	
Extensão final	72ºC 10 minutos	
∞	4ºC	

Fonte: FIOCRUZ/INSTITUTO LAURO DE SOUZA LIMA

4.2.5 Procedimentos para eletroforese e isolamento do *amplicon* para sequenciamento

Foi confeccionado gel de agarose a 1,5% e utilizado o tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X. A preparação das amostras consistiu em 20 µL de produto amplificado, 3,5 µL de GelRed e 3 µL de tampão de carreamento. A corrida eletroforética foi realizada com voltagem de 90 V, corrente de 500 A e tempo de corrida de 1 h. Após esse procedimento, levou-se o gel ao transiluminador para verificar a amplificação e a integridade das bandas.

Para o recorte das bandas, cobriu-se a superfície do transiluminador com filme plástico e colocou-se o gel sobre o filme. Com o apoio de um bisturi higienizado com álcool, recortaram-se as bandas e armazenaram-se em microtubos, ressaltando que, a cada banda recortada.

4.2.6 Procedimentos para purificação de bandas amplificadas

Para a purificação das bandas, utilizou-se o kit QIAEX Gel *Extraction* (QIAGEN), seguindo o protocolo do fabricante, conforme descrito a seguir.

Os géis colocados em microtubos foram pesados e os valores anotados; para a dissolução, adicionaram-se 3 volumes de tampão QG para cada volume de gel. Posteriormente, as amostras foram incubadas a 50 °C por 10 minutos (ou até que o gel

estivesse totalmente dissolvido) e, a cada 2 a 3 minutos, foram homogeneizadas no vórtex para facilitar a dissolução.

Após o processo de dissolução, foi adicionado um volume de isopropanol correspondente ao peso do gel e a mistura foi homogeneizada. Posteriormente, em uma coluna QIAquick de 2 mL (fornecida pelo fabricante), todo o conteúdo do tubo foi aplicado e a coluna foi centrifugada por um minuto. O processo foi repetido para amostras com volume superior a 800 µl, descartando sempre o líquido do fluxo e devolvendo a coluna ao mesmo tubo.

Em seguida, conforme orientação do Kit, para o sequenciamento, foram adicionados 500 µL de tampão QG à coluna, que foi centrifugada por 1 minuto, descartando-se o líquido e devolvendo-se a coluna ao mesmo tubo. Para a lavagem das amostras, adicionaram-se 750 µL do tampão PE à coluna; deixou-se em incubação por 2 a 5 minutos; seguiu-se com centrifugação por 1 minuto.

Colocou-se a coluna em um novo microtubo de 1,5 mL e, para eluição, utilizou-se o tampão EB, o que resultou em maior recuperação de DNA. Seguiu-se o procedimento, adicionando-se 50 µL do tampão EB e centrifugando-se por 1 minuto. Repetiu-se o processo com 30 µL do tampão EB, resultando em um volume final da amostra de 80 µL no mesmo tubo.

4.2.7 Reação de Sequenciamento dos genes *folP1, rpoB e gyrA*

A PCR pré-sequenciamento é um passo crucial para amplificar as regiões de interesse antes do sequenciamento, garantindo que o DNA amplificado esteja em quantidade suficiente e em condições adequadas para a etapa subsequente. A precisão nesta fase é essencial para assegurar que os fragmentos de DNA correspondentes sejam representativos e livres de contaminantes que possam comprometer a análise final.

Deste modo, seguiram-se os passos, conforme demonstrado na Tabela 2, com o protocolo de PCR de pré-sequenciamento apresentado a seguir.

Tabela 2 - Protocolo do sequenciamento

Reagente	Volume (µL)
Big Dye	1
Master Mix HotStar Taq (2x)	1,5
Primer F (3,2µM)	1
Primer R (3,2µM)	1
Amostra	3,0
Água	3,5
Volume final	10 µL

Fonte: FIOCRUZ/INSTITUTO LAURO DE SOUZA LIMA

Para esse procedimento, foram utilizados os *primers* descritos no Quadro 1, seguindo-se 40 ciclos com 94°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos.

No processo de precipitação, centrifugou-se brevemente (tipo *spin)* a placa (tipo spin), adicionaram-se 30 µL de isopropanol a 75% em cada poço, homogeneizaram-se as amostras e armazenaram-se ao abrigo da luz por 15 minutos. Subsequentemente, as placas foram centrifugadas por 45 minutos a 4.000 RPM. Após esse processo, descartou-se o sobrenadante, vertendo a placa sobre papel-toalha e realizando movimentos circulares, apoiada sobre uma bancada. No passo seguinte, foram adicionados 50 µL de etanol a 75% a cada poço da placa; repetiu-se a centrifugação por 15 minutos; descartou-se o sobrenadante; repetiu-se a secagem em papel-toalha. Assim que esse passo foi realizado, executou-se um "*spin*" com a placa invertida sobre um papel-toalha seco, permitindo que a centrífuga atingisse, no máximo, 600 RPM e interrompendo a aceleração.

Para o sequenciamento, as amostras foram ressuspendidas em 25µL de Formamida (Hi-Di) homogeneizando-as posteriormente, aqueceu-se as amostras a 96ºC por 3 minutos e imediatamente resfriadas em gelo por 2 minutos e levadas para o sequenciador Analisador Genético ABI 3730xL (fabricado pela Applied Biosystems / Thermo Fisher Scientific).

4.2.8 Análise de sequências dos genes *folP1*, *rpoB* e *gyrA* de *M. leprae*: investigação de mutações associadas à resistência aos fármacos da poliquimioterapia

Os *amplicons* correspondentes aos genes *folP1, rpoB e gyrA* foram submetidos à análise de sequências para investigar a presença de mutações associadas à resistência do *M. leprae* aos fármacos da poliquimioterapia (PQT). As sequências obtidas foram alinhadas e comparadas com a sequência de referência da cepa Thai-53, reconhecidamente sensível à PQT, utilizando-se o *software* MEGA 12 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis,* versão 12) para o alinhamento e a análise comparativa.

A identificação de substituições nucleotídicas nas regiões codificadoras desses genes, em relação à cepa de referência, foi utilizada como critério para investigar a possibilidade de mutações associadas à resistência.

4.3 COLETA E ORGANIZAÇÃO DOS DADOS SOCIODEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS

Os dados sociodemográficos e de identificação dos participantes foram obtidos retrospectivamente a partir do Sistema Vivver ®, o prontuário eletrônico de saúde adotado pela Secretaria Municipal de Saúde da Prefeitura de Governador Valadares, Minas Gerais. Foram extraídas as variáveis de interesse para caracterização da população do estudo, a saber: sexo, idade e cor/raça autodeclarada. Após a extração, os dados brutos foram exportados, tabulados e organizados no Microsoft Excel. Nessa etapa, realizaram-se a limpeza do banco de dados, a padronização das nomenclaturas, a exclusão de duplicatas e a categorização da variável idade em faixas etárias. Esses dados sociodemográficos foram vinculados aos resultados laboratoriais de qPCR e de sequenciamento de cada indivíduo, gerando uma matriz de dados consolidada para as etapas subsequentes de análise espacial e estatística.

4.4 GEOPROCESSAMENTO E ANÁLISE ESPACIAL

A análise da distribuição espacial foi realizada no âmbito do doutorado e contemplou exclusivamente dois grupos previamente identificados na etapa inicial do estudo: 158 indivíduos com registro de notificação de hanseníase no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) da Superintendência Regional de Saúde de Governador Valadares

(SRS-GV) e 120 indivíduos inicialmente classificados como suspeitos de hanseníase, com resultado positivo para o RLEP (Ct < 37), sem registro de notificação no SINAN e com baciloscopia de raspado intradérmico negativa.

Os 158 indivíduos com registro de notificação foram considerados o grupo de referência para a distribuição espacial, enquanto os 120 indivíduos RLEP positivos e sem notificação constituíram o grupo de interesse do doutorado. Dessa forma, a análise espacial foi realizada sobre o conjunto de 278 indivíduos, correspondente à soma dos dois grupos. Cabe ressaltar que, na construção cartográfica (mapas), foram considerados apenas os indivíduos residentes na área urbana da sede do município de Governador Valadares, sendo excluídos da análise espacial os residentes em distritos, na zona rural do município ou em outros municípios.

Na caracterização da origem municipal da população inicialmente suspeita, foram considerados 253 indivíduos classificados como suspeitos de hanseníase, provenientes de 317 municípios.

Os endereços dos indivíduos incluídos na análise espacial foram organizados em planilhas eletrônicas e, posteriormente, georreferenciados no Google Earth, obtendo-se as respectivas coordenadas geográficas de latitude e longitude. As coordenadas obtidas foram utilizadas para a elaboração da base espacial do estudo.

O processamento dos dados geográficos e a elaboração da representação cartográfica foram realizados no *software* QGIS 3.44 Solothurn, utilizando bases cartográficas e territoriais do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2022). A análise teve como finalidade caracterizar a distribuição territorial dos 158 casos notificados e dos 120 indivíduos RLEP positivos não notificados, permitindo avaliar a distribuição espacial dos grupos e a possível sobreposição territorial entre eles.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis categóricas da população de interesse foram apresentadas em frequências absolutas (n) e relativas (%). Para avaliar a associação entre a positividade para *M. leprae* na reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) e as características sociodemográficas categóricas, foram realizadas análises de associação por meio do teste do qui-quadrado de Pearson (χ^2). Esse teste foi utilizado para verificar se a distribuição das frequências observadas em uma variável categórica diferia entre os grupos definidos pelo

resultado da qPCR (positivo ou negativo), sendo aplicado às variáveis sexo, cor/raça e grupo etário.

A variável escolaridade não foi incluída nas análises de associação por não atender aos pressupostos do teste do qui-quadrado de Pearson. Essa exclusão decorreu do elevado percentual de registros classificados como "não informada" para essa variável, o que reduziria substancialmente o número de observações válidas e comprometeria a validade do teste, uma vez que a presença de uma grande proporção de dados ausentes poderia resultar em frequências esperadas inferiores a 5 em um número excessivo de caselas, violando os pressupostos do teste. Dessa forma, optou-se por apresentar a escolaridade apenas de forma descritiva, por meio de frequências absolutas e relativas.

Para as variáveis quantitativas, utilizou-se o teste de Mann-Whitney; a descrição foi realizada com medidas de tendência central e de dispersão, de acordo com a distribuição dos dados. Essa análise teve como objetivo verificar se a classificação dos indivíduos como casos ou com suspeição de hanseníase estava associada a diferenças na distribuição dos valores de Ct nas amostras selecionadas para amplificação e sequenciamento. Considerando que as amostras foram obtidas por raspado intradérmico, o valor de Ct foi considerado um indicador indireto da quantidade relativa de DNA de *M. leprae* presente no material clínico, sendo avaliado quanto à sua possível relação com a disponibilidade de DNA-alvo para a obtenção de *amplicons* adequados ao sequenciamento pelo método de Sanger.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* JASP, versão 0.98.1. O nível de significância adotado foi de 5% ($\alpha = 0,05$), considerando estatisticamente significativos os valores de $p < 0,05$.

4.6 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O presente estudo faz parte de um projeto intitulado “*Marcadores de resistência à Poliquimioterapia e indicadores de infecção subclínica por meio da Reação em cadeia da polimerase para Mycobacterium leprae”,* cujo protocolo de Pesquisa e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo A) foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFJF (CEP/UFJF), credenciado pelo CONEP, sob o CAAE 67528922.6.1001.5147, parecer nº 6.468.745.

5 RESULTADOS

Nesta seção serão apresentados os resultados obtidos no presente estudo.

5.1 PERFIL SOCIODEMOGRÁFICO DOS PARTICIPANTES SEGUNDO OS RESULTADOS DA QPCR

Foram avaliados 253 participantes, dos quais 120 (47,4%) apresentaram resultado positivo para RLEP na qPCR e 133 (52,6%) apresentaram resultado negativo. As características sociodemográficas dos participantes foram descritas quanto ao sexo, ao grupo etário, à cor/raça e à escolaridade. Para essa análise, os registros sem informações foram classificados como “Ignorado”. A distribuição dos resultados da qPCR segundo essas características é apresentada na Tabela 3.

Tabela 3 - Distribuição dos resultados da qPCR segundo as características sociodemográficas dos participantes avaliados, entre 2017 e 2021

Variável	Categoria	qPCR positivo n (%)	qPCR negativo n (%)	Total	χ^2 de Pearson	gl	p-valor
Sexo	Feminino	61 (45,2)	74 (54,8)	135	0,585	1	0.444
	Masculino	59 (50,0)	59 (50,0)	118			
Grupo etário	0–14	2 (50,0)	2 (50,0)	4	4,388	8	0,820
	15–19	5 (55,6)	4 (44,4)	9			
	20–29	7 (58,3)	5 (41,7)	12			
	30–39	16 (53,3)	14 (46,7)	30			
	40–49	19 (48,7)	20 (51,3)	39			
	50–59	32 (51,6)	30 (48,4)	62			
	60–69	23 (43,4)	30 (56,6)	53			
	70–79	8 (40,0)	12 (60,0)	20			
	>80	6 (75,0)	2 (25,0)	8			
	Ignorado	2 (12,5)	14 (87,5)	16			
Cor/raça	Amarela	1 (33,3)	2 (66,7)	3	3.387	3	0.276

Variável	Categoria	qPCR positivo n (%)	qPCR negativo n (%)	Total	χ^2 de Pearson	gl	p-valor
	Branca	11 (45,8)	13 (54,2)	24			
	Parda	85 (55,9)	67 (44,1)	152			
	Preta	8 (36,4)	14 (63,6)	22			
	Ignorado	15 (28,8)	37 (71,2)	52			
Escolaridade	Ensino fundamental	44 (88,0)	6 (12,0)	50	—	—	—
	Ensino médio	14 (77,8)	4 (22,2)	18			
	Ensino superior	2 (100,0)	0 (0,0)	2			
	Sem alfabetização	5 (100,0)	0 (0,0)	5			
	Ignorado	55 (30,9)	123 (69,1)	178			

Fonte: Elaborado pelo autor (2026)

Nota: Os valores são apresentados como frequências absolutas e relativas por categoria. O teste de qui-quadrado de Pearson foi bilateral. A categoria “Ignorado” reúne registros sem informação ou com resposta equivalente a “não informado”. gl: Grau de liberdade

Quanto à variável sexo, entre os participantes do sexo feminino, foram observados 61 resultados positivos para qPCR (45,2%) e 74 resultados negativos (54,8%), totalizando 135 participantes. Entre os participantes do sexo masculino, foram identificados 59 resultados positivos (50,0%) e 59 negativos (50,0%), totalizando 118 indivíduos. Para essa variável, o teste do qui-quadrado de Pearson apresentou $\chi^2 = 0,585$, com grau de liberdade (gl) 1 e $p = 0,444$.

Já em relação ao grupo etário, foram identificados 2 resultados positivos e 2 negativos entre os participantes de 0 a 14 anos, totalizando 4 indivíduos. Na faixa etária de 15 a 19 anos, foram observados 5 resultados positivos e 4 negativos, totalizando 9 participantes. Entre aqueles de 20 a 29 anos, foram registrados 7 resultados positivos e 5 negativos, totalizando 12 indivíduos. No grupo de 30 a 39 anos, foram identificados 16 resultados positivos e 14 negativos, totalizando 30 participantes. Na faixa etária de 40 a 49 anos, foram observados 19 resultados positivos e 20 negativos, totalizando 39 indivíduos.

Entre os participantes de 50 a 59 anos, foram identificados 32 resultados positivos e 30 negativos, totalizando 62 participantes. No grupo de 60 a 69 anos, foram registrados 23 resultados positivos e 30 negativos, totalizando 53 indivíduos. Entre os participantes de 70 a 79 anos, foram observados 8 resultados positivos e 12 negativos, totalizando 20 indivíduos. Na faixa etária de 80 anos ou mais, foram identificados 6 resultados positivos e 2 negativos, totalizando 8 participantes. Entre aqueles com idade registrada como ignorada, observaram-se 2 resultados positivos e 14 negativos, totalizando 16 indivíduos. Para o grupo etário, o teste do qui-quadrado de Pearson apresentou $\chi^2 = 4{,}388$, com 8 graus de liberdade e $p = 0{,}820$.

Ao avaliar a variável cor/raça, entre os participantes autodeclarados amarelos, foram identificados 1 resultado positivo e 2 negativos, totalizando 3 indivíduos. Entre os participantes brancos, observaram-se 11 resultados positivos e 13 negativos, totalizando 24 participantes. No grupo autodeclarado pardo, foram registrados 85 resultados positivos e 67 negativos, totalizando 152 indivíduos. Entre os participantes autodeclarados pretos, foram identificados 8 resultados positivos e 14 negativos, totalizando 22 participantes. Na categoria “Ignorado”, foram observados 15 resultados positivos e 37 negativos, totalizando 52 indivíduos. Para essa variável, o teste do qui-quadrado de Pearson apresentou $\chi^2 = 3{,}387$, com 3 graus de liberdade e $p = 0{,}276$.

Na avaliação da variável escolaridade, entre os participantes com ensino fundamental, observaram-se 44 resultados positivos e 6 negativos, totalizando 50 indivíduos. Entre os participantes com ensino médio, foram identificados 14 resultados positivos e 4 negativos, totalizando 18. Os 2 participantes com ensino superior apresentaram resultados positivos. Entre os participantes sem alfabetização, foram registrados 5 resultados positivos e nenhum negativo. Na categoria “Ignorado”, foram observados 55 resultados positivos e 123 negativos, totalizando 178 participantes.

Em relação à variável escolaridade, verificou-se a ausência de informação em 178 dos 253 participantes (70,4%). Diante da elevada proporção de dados ausentes, a variável foi considerada inadequada para a análise inferencial, uma vez que a inclusão de um número reduzido de registros válidos poderia comprometer a representatividade dos resultados e a interpretação das associações. Dessa forma, a escolaridade foi apresentada exclusivamente de forma descritiva, não sendo incluída no teste do qui-quadrado de Pearson.

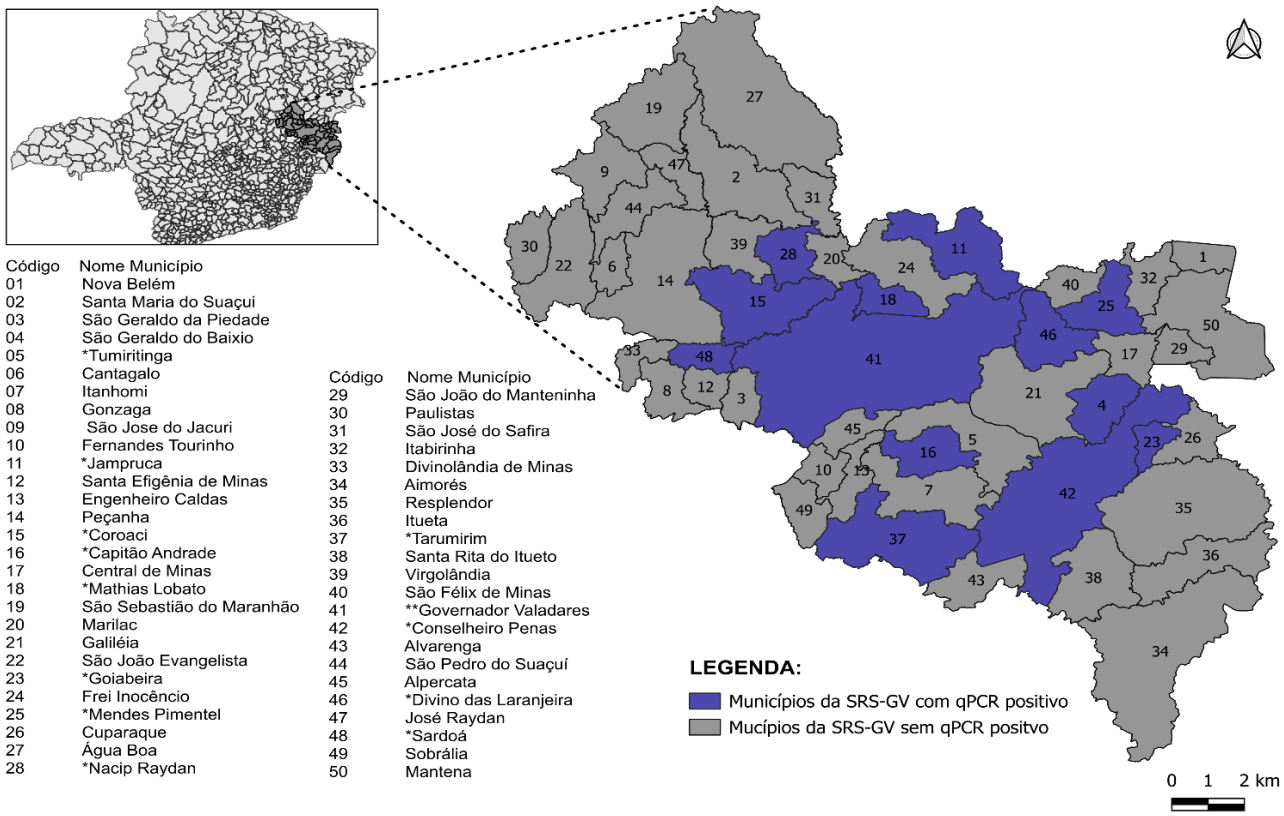
5.2 DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DE INDIVÍDUOS COM SUSPEIÇÃO DE HANSENÍASE E RESULTADO POSITIVO PARA QPCR RLEP

Conforme apresentado na caracterização dos participantes, foram avaliados 253 indivíduos, cujas amostras foram obtidas em 31 municípios, no período de 2017 a 2021. Desses municípios, 29 pertenciam à área de abrangência da Superintendência Regional de Saúde de Governador Valadares (SRS-GV), enquanto dois estavam fora dessa área.

Considerando como critério de positividade a detecção do alvo RLEP por qPCR com Ct < 37, verificou-se que 13 dos 31 municípios de origem apresentaram pelo menos uma amostra positiva. Esses 13 municípios foram responsáveis pela procedência das 120 amostras que apresentaram resultado positivo no teste qPCR-RLEP. Os demais 18 municípios não apresentaram amostras positivas entre os participantes avaliados.

A distribuição espacial dos municípios que compõem a SRS-GV e dos que apresentam amostras positivas é apresentada na Figura 11.

Figura 11 - Distribuição dos indivíduos com teste de qPCR positivo para hanseníase nos municípios da Superintendência Regional de Saúde de Governador Valadares, Minas Gerais.



Fonte: Elaborado pelo autor (2026) com base na malha territorial do IBGE (2022), utilizando o *software* QGIS.

Nota:Os municípios identificados com (*) compõem a área de abrangência deste estudo. Na imagem o destaque em roxo para os municípios com indivíduos com qPCR positivo para *Mycobacterium leprae*

Na Figura 11, os municípios com pelo menos um indivíduo com qPCR positivo estão destacados em roxo, enquanto os demais aparecem em tons de cinza. Essa representação evidencia que a positividade não se distribui de forma homogênea no território da SRS-GV, concentrando-se em determinados municípios da região.

Dos 31 municípios que encaminharam amostras para testagem, 13 (42%) apresentaram ao menos um indivíduo com resultado positivo na qPCR, o que corresponde a 26% dos 50 municípios que compõem a regional. A representação cartográfica desses resultados permite observar que a distribuição dos municípios com qPCR positivo não é homogênea no território da SRS-GV, concentrando-se mais frequentemente nas porções centrais.

Verifica-se, ainda, que Governador Valadares (código 41) posiciona-se centralmente nessa configuração espacial, sendo circundado por outros municípios com registros de positividade. Esse padrão espacial evidencia a presença de agrupamentos territoriais de municípios com detecção molecular positiva no contexto regional analisado. Observa-se, ainda, que Governador Valadares é sede da SRS-GV e concentra serviços de referência para diagnóstico e acompanhamento de casos, atendendo pacientes de diferentes municípios da região.

Dada a relevância de Governador Valadares como polo regional e município com a maior densidade de serviços de saúde, realizou-se uma análise da distribuição dos casos no perímetro urbano. Esta etapa permitiu correlacionar os indivíduos com qPCR positivo (com suspeição de hanseníase) aos casos já confirmados e em tratamento no município.

Considerando os indivíduos com resultado positivo no teste de qPCR para o RLEP, detalhou-se a distribuição desses participantes por município de residência. A Tabela 4 apresenta os dados dos indivíduos com teste de qPCR positivo sem notificação (com suspeição de hanseníase).

Tabela 4 - Detalhamento dos 120 indivíduos com teste qPCR positivo para RLEP e com suspeição de hanseníase

Categoria	Descrição	Nº de Indivíduos
qPCR positivo	Indivíduos com resultado positivo no teste qPCR para RLEP	120 (100%)
Outros municípios	Indivíduos residentes em outros municípios	22 (18,34%)
Governador Valadares	Indivíduos residentes em Governador Valadares	98 (81,66%)

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Entre os 120 indivíduos com resultado positivo de qPCR para RLEP identificados no estudo, 98 (81,66%) eram residentes do município de Governador Valadares, enquanto 22 (18,34%) eram provenientes de outros municípios da região, para os quais Governador Valadares atua como referência na atenção secundária à saúde (Tabela 4).

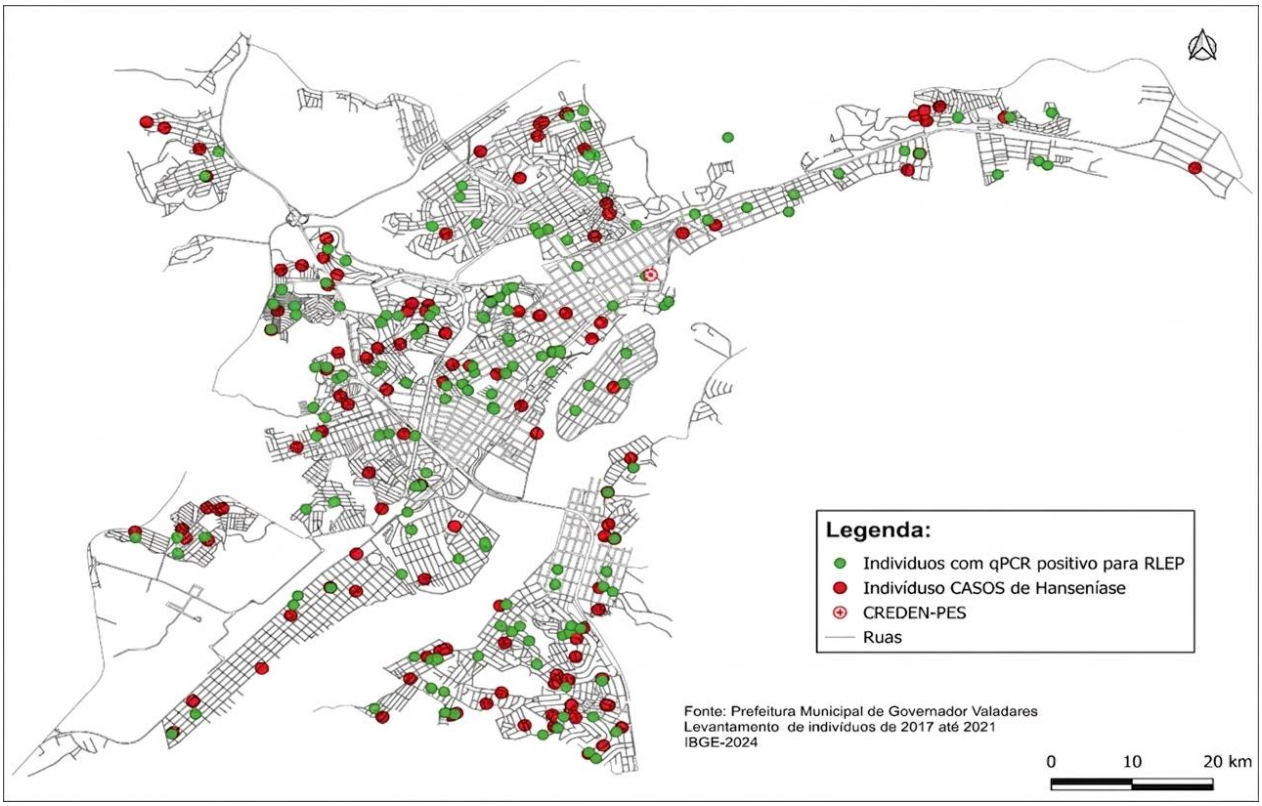
Nesse momento, os indivíduos residentes em outros municípios não foram incluídos no acompanhamento devido a fatores logísticos: o rastreio e o seguimento desses pacientes exigiriam deslocamentos da equipe de pesquisa entre diferentes municípios da regional, bem como a articulação com os serviços de saúde dos municípios de origem. Por esse motivo, o acompanhamento foi realizado, inicialmente, apenas com os indivíduos

residentes em Governador Valadares, onde o acesso ao serviço de referência e o rastreio territorial puderam ser viabilizados. Os demais indivíduos, avaliados quanto à caracterização molecular inicial (qPCR/RLEP), poderão ser contemplados em etapas futuras.

Diante da predominância de indivíduos residentes em Governador Valadares, procedeu-se à análise da distribuição espacial desses registros no território municipal. A Figura 12 apresenta o mapa aproximado da distribuição dos indivíduos com teste qPCR positivo entre os com suspeição de hanseníase de hanseníase no município, bem como a localização dos casos previamente confirmados da doença.

No mapeamento georreferenciado apresentado na Figura 12, os pontos verdes representam os indivíduos com resultado positivo no teste de qPCR para o RLEP, enquanto os pontos vermelhos indicam os casos de hanseníase previamente confirmados entre os indivíduos avaliados no período de 2017 a 2021.

Figura 12 - Distribuição espacial de indivíduos com teste de qPCR positivo e de casos confirmados de hanseníase em Governador Valadares.



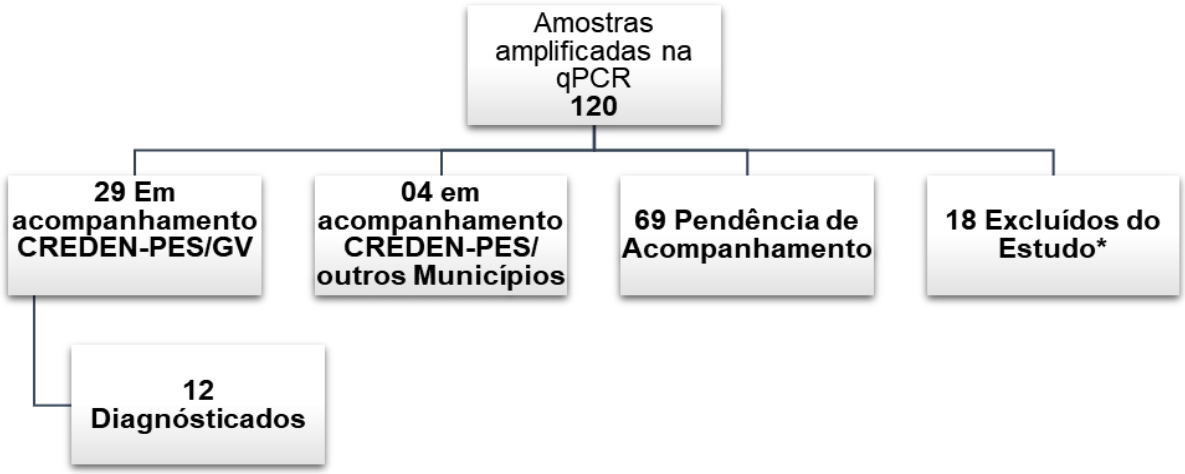
Fonte: Elaborado pelo autor (2026) com base na malha territorial do IBGE (2022), utilizando o *software* QGIS.

A distribuição espacial dos participantes com resultado positivo para qPCR-RLEP (pontos verdes) e dos casos confirmados de hanseníase (pontos vermelhos) evidenciou registros localizados em diferentes áreas do município. Observou-se proximidade espacial entre alguns indivíduos com resultado positivo para qPCR-RLEP e casos de hanseníase previamente registrados, conforme apresentado na Figura 12. A localização do CREDEN-PES também foi representada no mapa como ponto de referência para visualizar a distribuição espacial dos registros. A análise apresentada possui caráter descritivo, não tendo sido realizada análise estatística de autocorrelação ou de agrupamento espacial.

Para os indivíduos identificados com resultado positivo no teste qPCR para o RLEP e que não apresentaram diagnóstico prévio de hanseníase, foi realizado o acompanhamento ao longo do período do estudo. Esses indivíduos correspondem aos pontos representados em verde na Figura 12, que ilustra a distribuição espacial dos participantes com detecção molecular positiva no município de Governador Valadares.

Entre os 120 indivíduos que apresentaram resultado positivo para qPCR-RLEP e não possuíam diagnóstico prévio de hanseníase, foram avaliadas as respectivas situações clínicas e a realização de investigação diagnóstica. A partir desse grupo, foram identificados diferentes desfechos, incluindo seguimento no CREDEN-PES/GV, acompanhamento pelo serviço de indivíduos de outros municípios, pendência de avaliação e exclusão do estudo. A distribuição dos indivíduos segundo esses desfechos é apresentada na Figura 13.

Figura 13 - Distribuição de indivíduos sem diagnóstico prévio de hanseníase e com teste de qPCR positivo para o RLEP, para acompanhamento clínico.



Fonte: Elaborado pelo autor (2026)

Entre os residentes de Governador Valadares, 29 indivíduos foram acompanhados no CREDEN-PES, onde realizaram nova avaliação clínica, incluindo raspado intradérmico

e exames complementares conforme estabelecido no Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Hanseníase (BRASIL, 2022). Entre os indivíduos acompanhados, 12 (41,4%) receberam diagnóstico de hanseníase durante o período de seguimento, dos quais 11 foram classificados como forma clínica dimorfa e 1 como forma indeterminada. Entre esses 12 casos, três foram identificados, logo após o início do acompanhamento, e apresentavam baciloscopia positiva (IB de 1,5; 1,0 e 1,5). Esses três indivíduos tinham diagnóstico de hanseníase dimorfa, sendo dois do sexo feminino (58 e 56 anos, respectivamente) e um do sexo masculino (51 anos). A análise cronológica revelou uma amplitude considerável no intervalo entre a positividade molecular inicial e a confirmação clínica, com média de 6 anos até a conversão diagnóstica. Após o diagnóstico, todos iniciaram a poliquimioterapia.

Esses casos iniciais foram diagnosticados nas primeiras avaliações clínicas realizadas no serviço de referência. Considerando que parte dos participantes ainda permanece em acompanhamento clínico ou aguarda os resultados de exames adicionais, a identificação de novos casos poderá ocorrer ao longo do seguimento.

Entre os indivíduos provenientes de outros municípios, quatro foram acompanhados no CREDEN-PES, enquanto os demais permaneceram sob responsabilidade das redes municipais de origem.

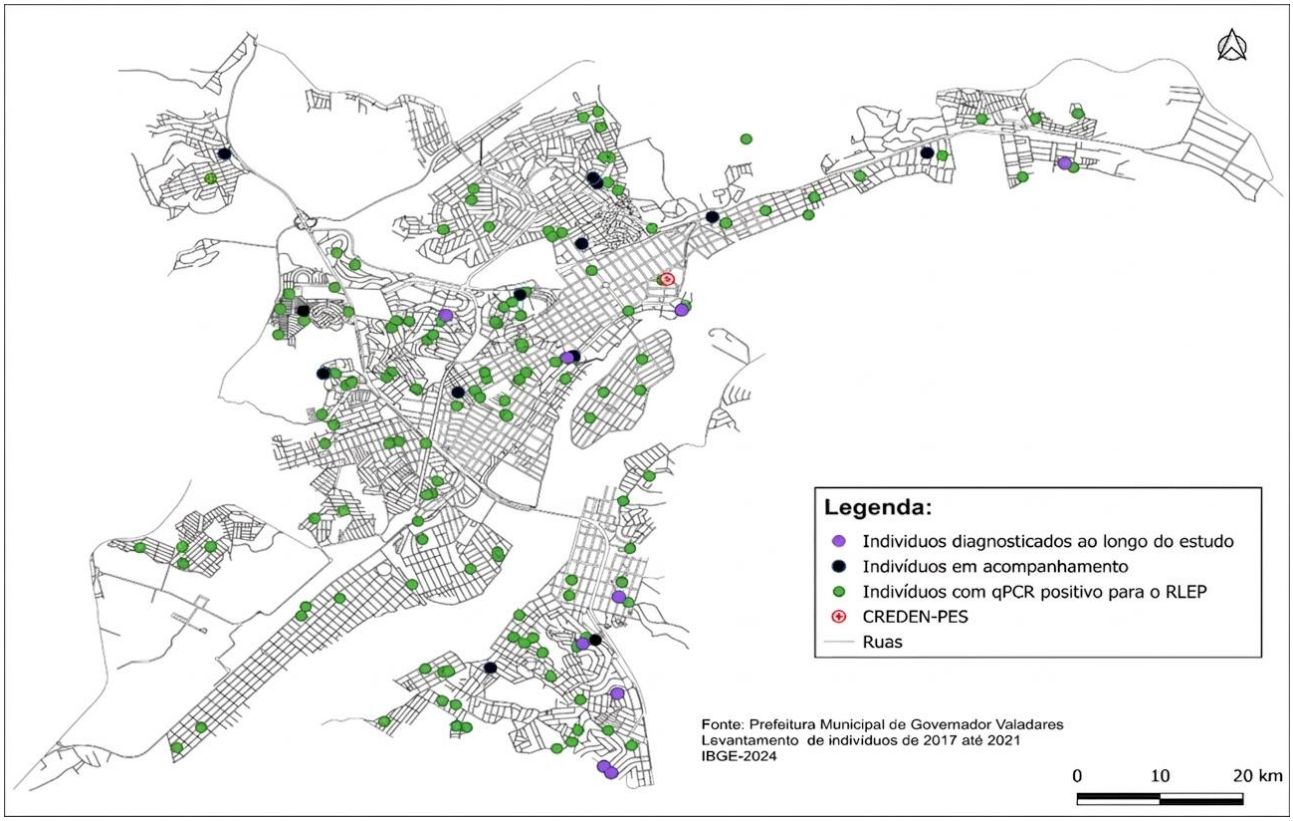
Durante o acompanhamento, 18 participantes não puderam continuar no estudo devido a diferentes intercorrências e, portanto, foram excluídos da análise de seguimento. Entre os fatores observados, destacaram-se quatro óbitos, duas intercorrências clínicas incapacitantes, nove mudanças de localidade e três desistências voluntárias.

Por fim, observa-se que 69 indivíduos com resultado positivo no teste de qPCR ainda não haviam sido submetidos à avaliação clínica no momento da consolidação dos dados. Esses participantes correspondem a indivíduos identificados no rastreamento inicial com detecção molecular positiva para *M. leprae*, que não realizaram acompanhamento clínico no serviço de referência. Considerando a ocorrência de novos diagnósticos entre os indivíduos acompanhados, o seguimento desse grupo torna-se relevante para o monitoramento clínico e epidemiológico da hanseníase na região.

A distribuição espacial desses grupos de interesse na área urbana de Governador Valadares é ilustrada na Figura 14. O mapa detalha a localização aproximada dos indivíduos diagnosticados com hanseníase ao longo do estudo (pontos roxos), os indivíduos atualmente em acompanhamento (pontos pretos) e os indivíduos com resultado positivo

para o RLEP por qPCR (pontos verdes). A localização do CREDEN-PES, o centro de referência para o tratamento e acompanhamento da hanseníase, é assinalada por um ponto vermelho dentro de um círculo, e a malha viária da cidade é apresentada para contextualização geográfica.

Figura 14 - Distribuição espacial dos indivíduos diagnosticados com hanseníase, em acompanhamento e com qPCR positivo para o RLEP na área urbana de Governador Valadares.



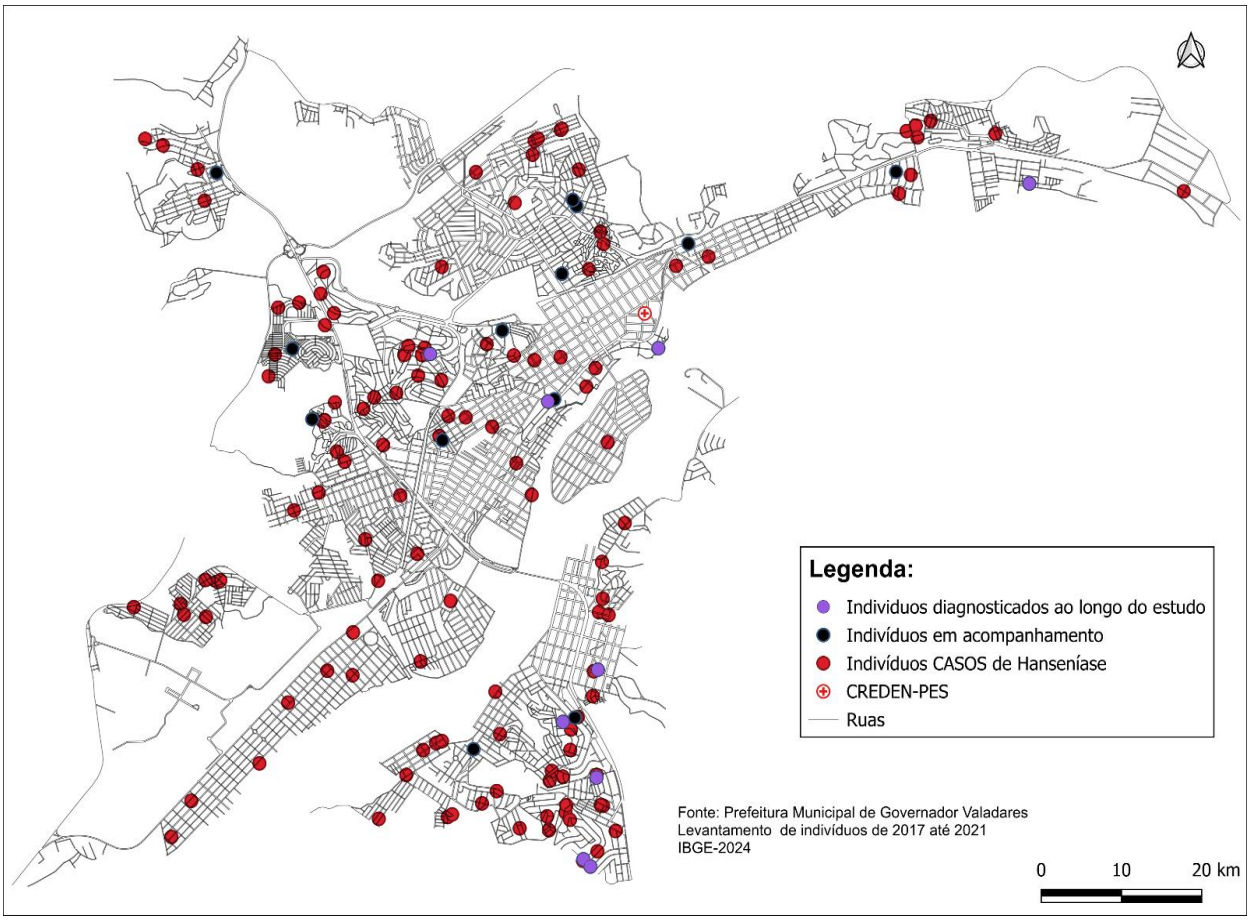
Fonte: Elaborado pelo autor (2026) com base na malha territorial do IBGE (2022), utilizando o *software* QGIS.

A Figura 14 mostra a dispersão heterogênea dos indivíduos diagnosticados ao longo do estudo (pontos em roxo) e dos indivíduos com teste de qPCR positivo para o RLEP em toda a área urbana. Os indivíduos diagnosticados ao longo do estudo e aqueles em acompanhamento (ponto em cor preta) mostram uma distribuição que, embora ampla, apresenta algumas aglomerações em bairros específicos, sugerindo focos de transmissão ou áreas com maior acesso ao diagnóstico e ao tratamento. A presença de indivíduos com qPCR positivo (pontos em verde) é notavelmente disseminada, abrangendo tanto áreas

com muitos casos diagnosticados quanto regiões aparentemente com menor densidade de casos conhecidos.

Nesse contexto, a Figura 15 apresenta a distribuição espacial dos indivíduos com resultado positivo para CASOS de Hanseníase no teste de qPCR para *M. leprae* no município de Governador Valadares, bem como dos participantes em acompanhamento clínico no estudo e daqueles que evoluíram para diagnóstico de hanseníase durante o período de seguimento. No mapa, também estão representados os casos previamente notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN).

Figura 15 - Distribuição espacial dos casos notificados de hanseníase e dos indivíduos com qPCR positivo para *M. leprae* em Governador Valadares



Fonte: Elaborado pelo autor (2026) com base na malha territorial do IBGE (2022), utilizando o *software* QGIS.

Nota: No mapa destacam-se os participantes em acompanhamento clínico, os diagnosticados durante o seguimento e a localização do CREDEN-PES.

A Figura 15 apresenta a distribuição espacial dos casos de hanseníase na área urbana, segundo a situação dos indivíduos e a fonte de identificação. Os pontos em vermelho representam os casos previamente notificados no SINAN. Os pontos pretos correspondem aos indivíduos que estavam em acompanhamento no estudo, enquanto os pontos roxos representam os indivíduos diagnosticados durante o período de realização da pesquisa.

Observa-se a distribuição dos três grupos de pontos em diferentes setores da área urbana, com ocorrência simultânea de pontos vermelhos, pretos e roxos em determinadas regiões. Em alguns trechos do mapa, os pontos em cor roxa encontram-se espacialmente

próximos aos pontos em cor vermelha, enquanto os pontos em cor preta também aparecem inseridos ou adjacentes a essas áreas de concentração.

Verificam-se, ainda, agrupamentos formados por pontos vermelhos, isolados ou associados a pontos pretos. A aproximação espacial entre os diferentes grupos é observada principalmente nos locais em que os pontos em cor roxa estão próximos ou intercalados aos pontos em cor vermelha e aos pontos em cor preta.

5.3 SEQUENCIAMENTO DOS GENES DE RESISTÊNCIA A PQT - CASOS E COM SUSPEIÇÃO DE HANSENÍASE

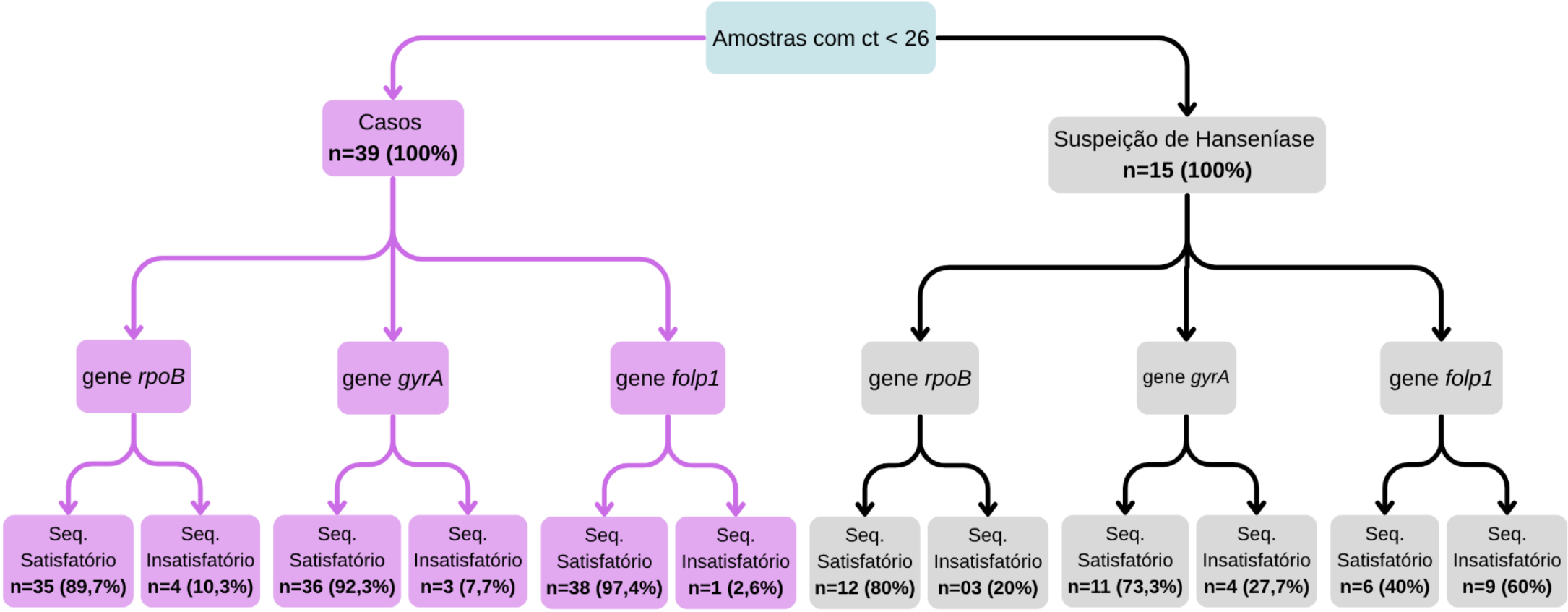
Foram selecionadas 54 amostras de DNA de *M. leprae*, obtidas entre 2017 e 2021, todas com valor de Ct inferior a 26 para RLEP, para as análises e o sequenciamento dos genes *rpoB*, *folP1* e *gyrA*.

Do total de amostras, 39 eram provenientes de indivíduos classificados como casos de hanseníase, que já apresentavam diagnóstico no período de coleta. As outras 15 amostras eram provenientes de indivíduos com suspeição de hanseníase, que, no momento da coleta, não possuíam diagnóstico confirmado e não haviam iniciado tratamento específico, sendo, portanto, consideradas amostras de indivíduos virgens de tratamento.

Entre os 15 indivíduos inicialmente classificados com suspeição de hanseníase, quatro receberam o diagnóstico da doença posteriormente, no período de 2017 a 2021, no decorrer do estudo. Desses quatro indivíduos, três apresentaram resultados de sequenciamento, enquanto uma amostra não apresentou produto sequenciado, não sendo obtida sequência para análise.

A Figura 16 apresenta a seleção e a classificação das 54 amostras, incluindo a distribuição entre casos e indivíduos com suspeição de hanseníase, bem como a classificação dos resultados do sequenciamento dos genes *rpoB*, *folP1* e *gyrA* em satisfatórios e insatisfatórios.

Figura 16– Caracterização das amostras de casos e indivíduos em suspeição de hanseníase segundo a qualidade do sequenciamento dos genes *rpoB, gyrA* e *folP1* de *M. leprae.*



Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

Nota: Seq. Insatisfatório: Sequenciamento Insatisfatório; Seq. Satisfatório: Sequenciamento Satisfatório.

A Figura 16 apresenta o fluxo de seleção das amostras e os resultados do sequenciamento dos genes *rpoB*, *folP1* e *gyrA*. Foram selecionadas 54 amostras com valor de Ct inferior a 26, sendo 39 provenientes de indivíduos classificados como casos de hanseníase e 15 de indivíduos com suspeição de hanseníase.

No grupo de casos, composto por 39 amostras, o sequenciamento do gene *rpoB* apresentou resultados satisfatórios em 35 amostras (89,7%) e insatisfatórios em 4 (10,3%). Para o gene *folP1*, foram obtidos resultados satisfatórios em 38 amostras (97,4%) e insatisfatórios em 1 (2,6%). Em relação ao gene *gyrA*, o resultado do sequenciamento foi satisfatório em 36 amostras (92,3%) e insatisfatório em 3 (7,7%).

No grupo de indivíduos com suspeição de hanseníase, composto por 15 amostras, o sequenciamento do gene *rpoB* apresentou resultados satisfatórios em 12 amostras (80,0%) e insatisfatórios em 3 (20,0%). Para o gene *folP1*, foram obtidos resultados satisfatórios em 6 amostras (40,0%) e insatisfatórios em 9 (60,0%). Para o gene *gyrA*, o sequenciamento foi satisfatório em 11 amostras (73,3%) e insatisfatório em 4 (26,7%).

Considerando o conjunto de 54 amostras, foram obtidos resultados satisfatórios em 47 (87,0%) para o gene rpoB e insatisfatórios em 7 (13,0%). Para o gene *folP1*, 44 amostras (81,5%) apresentaram resultado satisfatório e 10 (18,5%), resultado insatisfatório. Para o gene *gyrA*, foram observados resultados satisfatórios em 47 amostras (87,0%) e insatisfatórios em 7 (13,0%).

5.4 COMPARAÇÃO DOS VALORES DE CT ENTRE OS GRUPOS CASOS E COM SUSPEIÇÃO DE HANSENÍASE

Conforme apresentado no desenho experimental (Figura 10), o estudo inicial incluiu 411 indivíduos, dos quais 158 foram classificados como casos e 120 como indivíduos com suspeição de hanseníase e resultado positivo para o RLEP. Nesta etapa, foram analisadas 258 amostras com resultados de Ct disponíveis, sendo 138 pertencentes ao grupo Caso e 120 ao grupo de indivíduos com suspeição de hanseníase. Para comparar os valores de Ct obtidos por qPCR do RLEP entre os grupos, aplicou-se o teste U de Mann–Whitney. Os resultados dessa análise estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Comparação dos valores de Ct obtidos pela qPCR para RLEP entre os grupos Caso e com Suspeição, mediante o teste U de Mann–Whitney, no período de 2017 a 2021

Análise	Grupo	n	Média Ct ± DP	p-valor
Todas as amostras (Sequenciadas e não sequenciadas)	Casos	138*	28,08 ± 5,698	0,121
	Suspeição de hanseníase	120	29,79 ± 3,268	
Amostras sequenciadas	Casos	39	20,53 ± 3,221	<0,001**
	Suspeição de hanseníase	15	23,82 ± 2,095	

Fonte: Elaborado pelo autor (2026)

Nota: Ct = *cycle threshold*; DP = desvio-padrão; p = nível de significância no teste de Mann-Whitney. A análise incluiu 258 amostras (138 casos e 120 suspeitos). A análise de amostras sequenciadas incluiu 54 amostras (39 casos e 15 suspeitos), selecionadas pelo critério de Ct < 26.

* 20 amostras dos casos apresentaram valor de Ct indeterminado e, portanto, não foram consideradas na análise estatística. ** Valores que apresentaram diferença no teste de Whitney.

Conforme apresentado na Tabela 5, foram analisadas 258 amostras na avaliação, considerando as sequenciadas e não sequenciadas, das quais 138 pertencem ao grupo Caso e 120 ao grupo com suspeição de hanseníase. O grupo Caso apresentou média de Ct de 28,08 e desvio-padrão de 5,698, enquanto o grupo com suspeição de hanseníase apresentou média de Ct de 29,79 e desvio-padrão de 3,268. A comparação dos valores de Ct entre os grupos, realizada pelo teste de Mann–Whitney, não revelou diferença estatisticamente significativa (p = 0,121).

Considerando a ausência de diferença significativa na análise de todas as amostras (sequenciadas e não sequenciadas), foi realizada uma análise adicional restrita às amostras selecionadas para sequenciamento, que apresentavam Ct inferior a 26 para o RLEP. O objetivo foi comparar os valores de Ct entre os grupos nessa subamostra. Foram avaliadas 54 amostras, sendo 39 do grupo Caso e 15 do grupo com suspeição de hanseníase. O grupo Caso apresentou média de Ct de 20,53 e desvio-padrão de 3,221, enquanto o grupo com suspeição de hanseníase apresentou média de Ct de 23,82 e desvio-padrão de 2,095. Nessa análise, o teste de Mann–Whitney revelou uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos (p < 0,001).

6 DISCUSSÃO

O acompanhamento de indivíduos com qPCR positivo para o RLEP de *M. leprae* é de extrema importância, pois permite identificar pessoas com possível infecção subclínica e possibilita o início precoce do tratamento. Essa abordagem não só reduz a probabilidade de progressão da doença, mas também desempenha um papel fundamental na interrupção da cadeia de transmissão, contribuindo significativamente para o controle da hanseníase.

Os métodos moleculares têm demonstrado utilidade principalmente em situações em que a baciloscopia apresenta baixa sensibilidade. Kamal *et. al.* (2020) identificaram positividade por PCR em três dos quatro pacientes classificados com hanseníase neural pura e em 11 pacientes paucibacilares com raspado intradérmico negativo. Embora o estudo tenha utilizado PCR convencional, e não qPCR, seus resultados indicam que a detecção molecular pode acrescentar informações ao diagnóstico, especialmente em formas clínicas associadas à menor carga bacilar.

De forma semelhante, Lima *et. al.* (2022) observaram maior detecção por PCR do que por baciloscopia entre pacientes com hanseníase. Entre os indivíduos com índice baciloscópico igual a zero, parte apresentou resultado positivo na PCR, o que demonstra que a técnica pode identificar material genético de *M. leprae* mesmo quando o exame convencional não detecta o bacilo. Esses achados reforçam o papel da PCR como método complementar à avaliação clínica e à baciloscopia, particularmente em pacientes paucibacilares ou com suspeita de hanseníase e com resultados inconclusivos nos exames convencionais.

A utilização de amostras não invasivas também tem ampliado as possibilidades de aplicação da qPCR. Diana e Harish (2024) avaliaram amostras de urina e observaram positividade para o RLEP em pacientes com hanseníase, inclusive entre aqueles com índice baciloscópico negativo. No grupo de pacientes novos, não tratados e com a forma tuberculoide, a positividade urinária foi observada em 100% dos indivíduos. Esse resultado evidencia o potencial da urina como material complementar para a detecção molecular de *M. leprae*, sobretudo em situações em que a quantidade de bacilos é reduzida ou a coleta de amostras convencionais é limitada.

Warka *et. al.* (2024) investigaram a presença de DNA de *M. leprae* em swabs nasais de pacientes novos, em tratamento e após a conclusão da poliquimioterapia. Apesar de o estudo ter utilizado PCR convencional, os resultados demonstram que diferentes materiais

clínicos podem ser empregados na investigação molecular do bacilo. Entretanto, a detecção de DNA não deve ser interpretada isoladamente como evidência de viabilidade bacteriana, de cura, de recaída ou de resistência ao tratamento. Da mesma forma, a positividade no swab nasal não permite, por si só, confirmar a transmissão ativa.

Em conjunto, os estudos citados indicam que a PCR e a qPCR podem complementar a investigação da hanseníase, especialmente nas formas paucibacilares, neurais ou com baciloscopia negativa. A detecção molecular pode contribuir para a identificação de indivíduos que necessitam de acompanhamento clínico mais cuidadoso e para a seleção de amostras destinadas a análises complementares. Contudo, a interpretação dos resultados deve considerar o tipo de amostra, o método empregado e o contexto clínico do indivíduo. Assim, a positividade para o RLEP deve ser compreendida como evidência da detecção de material genético de *M. leprae* e analisada em conjunto com os achados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais.

A detecção de DNA de *Mycobacterium leprae* por qPCR, utilizando o alvo RLEP, evidencia a presença de material genético do bacilo, mas, isoladamente, não estabelece o diagnóstico clínico de hanseníase no Brasil. A confirmação diagnóstica requer avaliação clínica e dermatoneurológica, associada aos demais exames disponíveis. Nesse contexto, o acompanhamento longitudinal de indivíduos com resultado positivo para RLEP constitui uma estratégia relevante para a vigilância e a identificação precoce das manifestações da doença. No presente estudo, entre os 29 indivíduos com positividade molecular acompanhados, 12 (41,4%) evoluíram para o diagnóstico clínico de hanseníase durante o seguimento, com intervalo médio de aproximadamente 6 anos entre a coleta do material biológico e o diagnóstico. Esse resultado reforça a importância da associação entre a qPCR e o monitoramento clínico sistemático, especialmente em regiões endêmicas.

A utilização combinada de diferentes marcadores pode ampliar a identificação de indivíduos com maior probabilidade de adoecer. Silva *et. al.* (2021) observaram que a associação entre a detecção de DNA de *M. leprae* pelo alvo RLEP e a soropositividade para anti-PGL-I apresentou melhor desempenho do que a utilização isolada de cada marcador na avaliação de contatos. De forma semelhante, Figueira *et. al.* (2026), em revisão sistemática, identificaram resultados promissores para biomarcadores moleculares, sorológicos e imunológicos no monitoramento de contatos e na identificação precoce de indivíduos sob maior risco de desenvolver hanseníase. Esses achados são relevantes para o presente estudo, pois reforçam que a qPCR pode ser utilizada como ferramenta

complementar à avaliação clínica, epidemiológica e laboratorial, contribuindo para a definição de estratégias de acompanhamento mais direcionadas.

A superioridade da qPCR em relação a métodos convencionais também foi descrita por Mundada *et. al.* (2026), que compararam a qPCR direcionada ao RLEP com a baciloscopia e a histopatologia em pacientes com hanseníase. Os autores observaram sensibilidade de 86,4% e especificidade de 90,9% para o método molecular, com maior contribuição em pacientes paucibacilares e em casos em que os exames convencionais apresentaram resultados inconclusivos. Esses resultados corroboram o uso da qPCR como método auxiliar na investigação da hanseníase, especialmente quando os achados clínicos são sugestivos, mas a baciloscopia ou a histopatologia não permitem confirmar o diagnóstico.

No presente estudo, foram identificados 69 indivíduos residentes em Governador Valadares com resultado positivo para *M. leprae* por qPCR. Esse grupo constitui uma população de interesse para a vigilância clínica e epidemiológica, uma vez que parte dos indivíduos acompanhados posteriormente evoluiu para o diagnóstico de hanseníase. Esses achados indicam que a qPCR pode contribuir para a identificação de pessoas que requerem seguimento clínico sistemático, especialmente quando seus resultados são interpretados em conjunto com a avaliação dermatoneurológica, os dados epidemiológicos e os demais exames laboratoriais. Dessa forma, embora a detecção molecular não substitua o diagnóstico clínico, ela pode auxiliar na definição de prioridades para o acompanhamento e favorecer o reconhecimento oportuno de novos casos.

A análise espacial apresentada na Figura 12 amplia a interpretação desses achados ao demonstrar a importância de integrar as informações laboratoriais e territoriais às ações de vigilância da hanseníase. A distribuição dos indivíduos com resultado positivo para RLEP pode auxiliar na identificação de áreas prioritárias para busca ativa, avaliação clínica e seguimento dos casos. Nesse contexto, a utilização articulada da qPCR com as estratégias de vigilância e assistência pode contribuir para reduzir o intervalo entre a detecção do material genético de *M. leprae* e a avaliação clínica dos indivíduos, fortalecendo as ações de diagnóstico oportuno no município de Governador Valadares.

Nesse contexto, a ausência de avaliação clínica de parte dos indivíduos com resultado positivo no RLEP representa uma oportunidade para o aprimoramento das ações de vigilância epidemiológica. A realização de avaliações periódicas pode favorecer o reconhecimento de alterações compatíveis com a hanseníase e contribuir para o

diagnóstico oportuno, especialmente entre indivíduos residentes em áreas endêmicas. Assim, os resultados reforçam que a detecção molecular deve ser acompanhada de estratégias organizadas de busca, encaminhamento e seguimento clínico.

A relevância desse acompanhamento é apoiada por Pinheiro *et. al.* (2023), que observaram que indivíduos com qPCR positiva para RLEP apresentaram 5,14 vezes mais chances de desenvolver hanseníase quando comparados àqueles com resultado negativo. Esse achado reforça o potencial da detecção molecular para identificar indivíduos que possam necessitar de vigilância diferenciada. Considerando que o diagnóstico tardio está associado ao desenvolvimento de incapacidades físicas e a repercussões psicossociais relacionadas ao estigma da doença, o reconhecimento precoce dos casos permanece fundamental para o controle da hanseníase (Santos *et. al.*, 2024). Além disso, o diagnóstico oportuno e o início precoce da poliquimioterapia contribuem para reduzir o risco de incapacidades e para limitar a transmissão da doença na comunidade (Said, Mwanga e Hussein, 2024).

A importância do rastreamento molecular associado ao acompanhamento clínico também é destacada por estudos recentes. Em revisão sistemática, Vidal *et. al.* (2025) apontaram o potencial da qPCR em raspados dérmicos para a identificação de indivíduos com maior probabilidade de desenvolver hanseníase. De forma semelhante, Murtaza *et. al.* (2024) observaram que estratégias de rastreamento ativo podem favorecer a identificação de casos em estágios mais precoces do que a detecção baseada exclusivamente na demanda espontânea pelos serviços de saúde. Tahir *et. al.* (2026) também identificaram DNA de *M. leprae* em contatos domiciliares de pacientes em tratamento e ressaltaram a importância do acompanhamento longitudinal para compreender a relação entre a detecção molecular e o desenvolvimento da doença em áreas endêmicas.

Essas evidências são relevantes, pois indicam que a qPCR pode contribuir não apenas para a identificação do material genético de *M. leprae*, mas, também para o direcionamento das ações de vigilância. A integração dos resultados moleculares com as informações clínicas, epidemiológicas e territoriais pode permitir a priorização de indivíduos e áreas para avaliação, busca ativa e seguimento.

Além da identificação precoce, a investigação molecular pode contribuir para o monitoramento da resistência aos medicamentos utilizados no tratamento da doença. Bouth *et. al.* (2023) ressaltaram que a busca ativa de contatos pode identificar indivíduos com possíveis sinais de infecção subclínica que não seriam alcançados por estratégias

baseadas apenas na demanda espontânea. Os autores também destacaram a importância da vigilância molecular da resistência, considerando a ocorrência de mutações associadas à rifampicina, à dapsona e às fluoroquinolonas em diferentes regiões endêmicas.

Nesse contexto, Jouet *et. al*. (2023) demonstraram que técnicas de sequenciamento de nova geração podem detectar variantes minoritárias relacionadas à resistência antes que se tornem predominantes. Essa abordagem amplia as possibilidades de monitoramento da resistência e pode contribuir para o aprimoramento das estratégias terapêuticas e de controle da hanseníase. É importante destacar, contudo, que a detecção do RLEP por qPCR e a investigação de resistência são análises distintas. Enquanto o RLEP indica a presença de material genético de *M. leprae*, a avaliação da resistência requer a análise de alvos genéticos específicos associados aos mecanismos de ação dos medicamentos.

Dessa forma, o sequenciamento genômico de *M. leprae* constitui uma ferramenta relevante para a vigilância da resistência medicamentosa. Como o bacilo não é cultivável em meios de cultura artificiais, a avaliação de sua suscetibilidade aos fármacos não pode ser realizada rotineiramente por métodos fenotípicos convencionais. Nesse contexto, a investigação da resistência é conduzida principalmente por meio de métodos moleculares, por meio da identificação de mutações em genes associados à ação dos medicamentos. Essa abordagem complementa a detecção molecular do bacilo e pode fortalecer as estratégias de vigilância, contribuindo para o reconhecimento de variantes potencialmente associadas à resistência e para a prevenção de falhas terapêuticas. Entretanto, a qualidade dos resultados depende da quantidade e da integridade do material genético disponível, de modo que amostras degradadas ou com DNA insuficiente podem comprometer a amplificação, a análise e a interpretação do sequenciamento (Ferreira *et al*., 2025).

No presente estudo, o sucesso do sequenciamento foi maior entre os casos do que entre os indivíduos com suspeição de hanseníase, com comportamento semelhante nos genes *rpoB*, *folP1* e *gyrA*. Esse achado possivelmente reflete a maior carga bacilar nos casos, o que resulta em maior quantidade e melhor integridade do DNA disponível para amplificação. A análise dos valores de Ct corrobora essa interpretação (Tabela 5): embora não tenha havido diferença significativa entre os grupos quando todas as amostras foram consideradas ($p = 0,121$), na subamostra selecionada para sequenciamento, os casos apresentaram valores de Ct significativamente menores ($p < 0,001$), indicando maior carga bacilar nas amostras mais positivas. A associação entre Ct mais baixo e maior sucesso no

sequenciamento reforça o papel da carga bacilar como determinante da viabilidade da análise molecular.

A ausência de mutações associadas à resistência nas amostras sequenciadas neste estudo era um desfecho esperado, considerando que a resistência do *M. leprae* aos fármacos da poliquimioterapia permanece pouco frequente no Brasil. Conforme o Boletim Epidemiológico de Hanseníase, entre outubro de 2018 e setembro de 2023 foram registrados 84 casos de hanseníase com resistência antimicrobiana no país, correspondendo a 1,53% de resistência primária e 2,80% de resistência secundária, esta última predominando entre casos de recidiva e suspeita de falha terapêutica (Brasil, 2024).

Esses dados são consistentes com os achados de Andrade *et al.* (2022), que identificaram mutações associadas à resistência em 1,35% das 1.183 amostras avaliadas no Programa Sentinela entre 2018 e 2020. Nesse cenário, a ausência de mutações nas amostras sequenciadas neste estudo é plenamente compatível com o panorama epidemiológico nacional, no qual a resistência ainda é rara. Dessa forma, esse achado não deve ser interpretado como ausência de risco, mas reforça a importância de manter a vigilância molecular em regiões endêmicas, considerando que a pressão seletiva exercida pela poliquimioterapia pode favorecer o surgimento de variantes resistentes ao longo do tempo.

Por outro lado, estudos realizados na Índia, país com elevada carga da doença, demonstram frequências mais altas de resistência. Ahuja *et. al.* (2022) identificaram mutações associadas à resistência em 17,2% dos novos casos avaliados, incluindo resistência à ofloxacina em aproximadamente 10% das amostras. De forma semelhante, Patial *et. al.* (2023) observaram mutações relacionadas à resistência em 11,4% dos pacientes com lesões cutâneas persistentes. Essas diferenças provavelmente refletem particularidades epidemiológicas entre os países, incluindo a intensidade da transmissão, o histórico de exposição a esquemas terapêuticos e as distintas estratégias de vigilância da resistência aos antimicrobianos.

Os resultados obtidos neste estudo também demonstram a aplicabilidade do raspado intradérmico como fonte de DNA para o sequenciamento molecular. Por se tratar de uma amostra rotineiramente coletada nos serviços de referência, essa fonte de DNA representa uma alternativa operacionalmente viável para integrar o diagnóstico molecular e a vigilância da resistência em programas de controle da hanseníase, principalmente em locais onde o acesso à biópsia, que necessita exclusivamente do profissional médico para a realização,

é limitado (Girma, *et. al;* 2026). Corroborando os dados deste estudo, Ahuja *et. al.* (2022) demonstraram que amostras de raspado dérmico preservadas adequadamente possibilitam a amplificação e o sequenciamento dos principais genes associados à resistência, contribuindo para sua utilização em estudos epidemiológicos. Entretanto, os resultados do presente estudo evidenciam que o sucesso dessa abordagem depende diretamente da qualidade e da integridade do DNA extraído, uma vez que amostras com baixa carga bacilar ou com DNA degradado podem comprometer a obtenção de sequências de boa qualidade.

Dessa forma, a incorporação do sequenciamento molecular à investigação de indivíduos com positividade no RLEP representa uma etapa complementar ao diagnóstico por qPCR, ampliando a caracterização da infecção por *M. leprae*.

Nesse sentido, a qPCR permite identificar precocemente a presença de DNA bacteriano, e o sequenciamento dos genes *rpoB*, *folP1* e *gyrA* permite investigar mutações associadas à resistência aos principais fármacos utilizados na poliquimioterapia, fornecendo informações relevantes para o manejo clínico e a vigilância epidemiológica.

Braet *et. al.* (2022) demonstraram a aplicabilidade dessa abordagem integrada ao utilizar amostras previamente confirmadas por qPCR para posterior sequenciamento direcionado dos genes relacionados à resistência, evidenciando o potencial dessa estratégia para fortalecer programas de vigilância molecular. De forma semelhante, Andrade *et. al.* (2022) demonstraram que o Programa Sentinela no Brasil emprega o monitoramento molecular desses genes como ferramenta para acompanhar a circulação de cepas resistentes e subsidiar as ações de controle da hanseníase no país. Além disso, a metanálise conduzida por Li *et. al.* (2022) evidenciou que, embora as frequências de mutações em *folP1*, *rpoB* e *gyrA* permaneçam relativamente baixas em escala global, sua distribuição entre diferentes regiões reforça a necessidade de vigilância molecular contínua.

Embora nenhuma mutação tenha sido identificada nas amostras avaliadas neste estudo, os resultados demonstram a viabilidade do raspado intradérmico como fonte de DNA para sequenciamento, além de servir como ferramenta complementar à qPCR, contribuindo para o monitoramento precoce da resistência e para o fortalecimento das estratégias de vigilância da hanseníase em áreas endêmicas.

7 CONCLUSÃO

A realização do acompanhamento longitudinal demonstrou que a detecção de DNA de *Mycobacterium leprae* por qPCR pode contribuir para a identificação de indivíduos que necessitam de vigilância clínica sistemática. Embora a positividade para o alvo RLEP não estabeleça, isoladamente, o diagnóstico clínico de hanseníase, sua associação à avaliação dermatoneurológica permitiu o reconhecimento de casos que posteriormente evoluíram para a doença. Entre os indivíduos acompanhados, parte apresentou confirmação clínica ao longo do seguimento, evidenciando a relevância da integração entre a detecção molecular e o acompanhamento longitudinal para o reconhecimento oportuno de novos casos, sobretudo em áreas endêmicas.

A caracterização dos indivíduos com qPCR positiva permitiu identificar a distribuição desse marcador molecular no Leste de Minas Gerais e, em particular, no município de Governador Valadares. A ausência de associação significativa entre a positividade da qPCR e as variáveis sociodemográficas analisadas indica que a vigilância não deve ser restrita a um único perfil populacional. Por sua vez, a distribuição espacial dos participantes reforça a importância de incorporar o território às estratégias de controle da hanseníase. A utilização conjunta de informações laboratoriais, clínicas e geográficas pode auxiliar na definição de áreas prioritárias para a busca ativa, a avaliação clínica e o acompanhamento dos indivíduos identificados.

A ausência de mutações nos genes avaliados indica que não foram detectadas variantes associadas à resistência nas amostras analisadas, mas não permite excluir a ocorrência de resistência na população estudada, uma vez que parte das amostras não apresentou sequenciamento adequado e o número de amostras analisadas foi limitado. Considerando que *M. leprae* não é cultivável em meios artificiais, o sequenciamento molecular constitui uma estratégia fundamental para a investigação da resistência medicamentosa. Dessa forma, a análise dos genes associados à resistência pode contribuir para a vigilância molecular da hanseníase e para o reconhecimento de variantes genéticas com possível impacto na resposta aos medicamentos utilizados na poliquimioterapia.

O raspado intradérmico mostrou-se adequado como fonte de DNA para o sequenciamento dos genes relacionados à resistência, especialmente quando associado à seleção de amostras com valores de Ct mais baixos para o alvo RLEP. A obtenção de resultados satisfatórios na maioria das amostras indica que essa estratégia pode viabilizar

análises moleculares complementares em amostras clínicas de rotina. Entretanto, a qualidade do sequenciamento não depende exclusivamente da seleção pelo valor de Ct, mas também da quantidade, da integridade e das condições de conservação do material genético. Assim, o raspado intradérmico tem potencial para apoiar a investigação molecular de *M. leprae*, embora protocolos de coleta, armazenamento e processamento sejam essenciais para garantir a qualidade das sequências obtidas.

REFERÊNCIAS

AHUJA, M. *et. al.* Ofloxacin resistance in multibacillary new leprosy cases from Purulia, West Bengal: a threat to effective secondary line treatment for rifampicin-resistant leprosy cases. **Journal Of Global Antimicrobial Resistance**, v. 30, p. 282-285, 2022.

ALZATE, C. B. *et. al.*; Leprosy Drug Resistance Surveillance in Colombia: The Experience of a Sentinel Country; **PLoS. Negl. Trop. Dis**; v. 10, n.10, 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.

ANDRADE, E. S. N. *et. al.* Antimicrobial resistance among leprosy patients in Brazil: real-world data based on the National Surveillance Plan. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 66, n. 5, p. e02170-21, 2022.

ANDRADE, E. S. N. **Resistência aos antimicrobianos da hanseníase no Brasil**. 2022. 176 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-Graduação em Saúde Coletiva, Faculdade de Ciências da Saude, Universidade de Brasília, Brasília, 2022. Disponível em: http://repositorio2.unb.br/bitstream/10482/44967/1/2022_ElaineSilvaNascimentoAndrade.pdf. Acesso em: 20 fev. 2025.

AVANZI, C. *et. al.*; Transmission of Drug-Resistant Leprosy in Guinea-Conakry Detecting Using Molecular Epidemiological Approaches; **Clinical Infectious Disease**; v. 63, p. 1482-1484; 2016.

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.

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 abr.2025.

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

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

BIF, S. M. *et. al.* Hanseníase no Brasil: desafios e avanços na prevenção, diagnóstico e tratamento. **Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences**, v. 6, n. 1, p. 418–437, 2024.

BOUTH, R. C. *et. al.* Specialized active leprosy search strategies in an endemic area of the Brazilian Amazon identifies a hypermutated *Mycobacterium leprae* strain causing primary drug resistance. **Frontiers in Medicine**, v. 10, p. 1243571, 2023.

BRAET, S. M. *et. al.* Investigating drug resistance of *Mycobacterium leprae* in the Comoros: an observational deep-sequencing study. **The Lancet Microbe**, v. 3, n. 9, p. e693-e700, 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde**. Boletim Epidemiológico: Hanseníase**. Número especial, jan. 2023. 47 p. Brasília, 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde. Departamento de Gestão e Incorporação de Tecnologias e Inovação em Saúde. Coordenação de Gestão de Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Hanseníase**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2022. 152 p. ISBN 978-65-5993-387-7. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/h/hanseniase/publicacoes/protocolo-clinico-e-diretrizes-terapeuticas-da-hanseniase-2022. Acesso em: 3 jun. 2026.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. **Boletim epidemiológico de hanseníase: número especial, jan. 2026**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2026. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/especiais/2026/boletim-epidemiologico-de-hanseníase-numero-especial-jan-2026.pdf/@@download/file. Acesso em: 17 jun. 2026.

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 Transmissívesiveis. **Nota Técnica n° 16/2021**; Brasilia: Ministério da Saúde, 2021.

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

BRITO, M. *et. al.* Tuberculoid Leprosy Masquerading as Erythema Induratum. **HCA Healthcare Journal of Medicine**, v. 2, n. 2, p. 101-104, 2021.

CAMBAU, E. *et. al.*; Antimicrobial resistance in leprosy: results of the first prospective open survey conducted by a WHO surveillance network for the period 2009-15; **Clinical Microbiology and Infection**; v. 24, p. 1305-1310; 2018.

CAMBAU, E. *et. al.*; Multidrug-resistance to dapsone, rifampicin, and ofloxacin in *Mycobacterium leprae*; **Lancet**; v.349, p. 103-104; 1997.

CAMBAU, E; WILLIAMS, D. L. Anti-leprosy Drugs: Modes of Action and Mechanism of Resistance in *Mycobacterium leprae*; **International Textbook of Leprosy**; 2019. Disponível em: <https://internationaltextbookofleprosy.org/chapter/anti-leprosy-drugs-modes-action-and-mechanisms-resistance-mycobacterium-leprae. Acesso em: 26 abr. 2025.

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 D. B. *et. al.* Role of histopathological, serological and molecular findings for the early diagnosis of treatment failure in leprosy. **BMC Infectious Diseases**, v. 24, n. 1085, p. 1-13, 2024.

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**, v. 37, p. 1863-1867, 2018.

CHAUFFOUR, A. *et. al.* A systematic review of *Mycobacterium leprae* DNA *gyrA*se mutations and their impact on fluoroquinolone resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 27, n. 11, p. 1601-1612, 2021.

CHHABRA, S. *et. al.* High frequency of ofloxacin resistance patterns of *Mycobacterium leprae* from India: An indication to revisit second line anti-leprosy treatment regimen. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 35, p. 262-267, 2023.

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

CORRÊA, M. B. C. **Caracterização de variantes de genes do *Mycobacterium leprae***. 2022. 84 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2022.

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.

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.

DIANA, D.; HARISH, M. C. qPCR detection of *Mycobacterium leprae* DNA in urine samples of leprosy patients using the RLEP gene target. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 11, p. 1435679, 2024.

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

DORNELAS, B. C., *et. al.*; Role of histopathological, serological and molecular findings for the early diagnosis of treatment failure in leprosy. **BMC infectious diseases**, v. 24 ed. 01. 2024. https://doi.org/10.1186/s12879-024-09937-2

DUO FILHO, V. B. *et. al. Mycobacterium leprae*: aspectos da resistência aos fármacos na poliquimioterapia. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 25, n. 1, p. 79-85, 2021.

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; 2014a.

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.*; 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, C. O. *et. al.* Classic and new candidate markers for drug resistance in a large cohort of leprosy patients from the Amazon state, Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 69, n. 7, p. e01550-24, 2025.

FIGUEIRA, L. R. T., *et. al.* The Predictive Role of Biomarkers for Leprosy Prophylaxis in Contacts of Patients Who Are Indices of the Disease: A Systematic Review of the Literature. **Mediators of Inflammation**, v. 2026, n. 1, p. 6163972, 2026.

FIOCRUZ. **Fiocruz cria teste molecular para hanseníase inédito no Brasil**. 2021. Disponível em: https://www.unasus.gov.br/noticia/fiocruz-cria-teste-molecular-para-hanseníase-inedito-no-brasil. Acesso em: 7 dez. 2025.

FONSECA, A. B. L. *et. al.* The influence of innate and adaptative imune 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.

FROES JUNIOR, L. A. R; SOTTO, M. N; TRINDADE, M. A. B. Leprosy in the 21st century: a comprehensive review of immunological mechanisms, diagnosis, and treatment. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 67, p. e74, 2025.

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 is asymptomatic household contacts; **BMC Infectious Diseases**; v. 18, n. 153; 2018.

GAMA, R. S. *et al.* Prospects for new leprosy diagnostic tools, a narrative review considering ELISA and PCR assays. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, p. e20200197, 2020.

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

GIRMA, S. *et. al.* Diagnostic performance of real-time PCR for routine diagnosis of leprosy utilizing slit skin smear from clinically diagnosed patients in Ethiopia. **Leprosy Review**, v. 97, n. 1, p. 0-0, 2026.

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 ação para enfrentamento da hanseníase**; 2021b.

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

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; 2008b.

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; 2008a.

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

HESPANHOL, M. C. L., DOMINGUES, S. M., UCHÔA-FIGUEIREDO, L. R. Late diagnosis under the perspective of therapeutic itineraries: level 2 physical disabilities in Hansen's disease. **Interface-Comunicação, Saúde, Educação**, v. 25, p. e200640, 2021.

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

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Censo demográfico 2022**. Rio de Janeiro: IBGE, 2023. Disponível em: https://censo2022.ibge.gov.br/panorama/?localidade=BR. Acesso em: 12 mai. 2025.

ISLAM, M. M. *et. al.* Molecular mechanisms of resistance and treatment efficacy of clofazimine and bedaquiline against Mycobacterium tuberculosis. **Frontiers in Medicine**, v. 10, p. 1304857, 2024.

JACOBSON, R.R; HASTINGS, R.C.; Rifampin-resistant leprosy; **Lancet**; v. 2, p. 1304-1305; 1976.

JESUS, I. L. R *et. al.* Hanseníase e vulnerabilidade: uma revisão de escopo. **Ciência & saúde coletiva**, v. 28, n. 01, p. 143-154, 2023.

JOUET, A. *et. al.* Hi-plex deep amplicon sequencing for identification, high-resolution genotyping and multidrug resistance prediction of *Mycobacterium leprae* directly from patient biopsies by using Deeplex Myc-Lep. **EBioMedicine**, v. 93, 2023.

JUAN, C. *et. al.* Leprosy in Spain: A Descriptive Study of Admissions at Fontilles Sanatorium between 1909 and 2020. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 9, n. 6, 2024.

KAI, M. *et. al.;* Analysis of Drug-Resistant Strain of *Mycobacterium leprae* in an Endemic Ares of Vietnan; **Clinical Infectious Disease**; v. 52, n.5, p. 127-132; 2011.

KAMAL, N. M. M., *et. al.* Polymerase chain reaction versus slit skin smear in diagnosis of leprosy; a cross-sectional study. **International Journal of Medical Arts**, v. 2, n. 3, p. 650-654, 2020.

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.

LAVANIA, M. *et. al.*; Molecular detection of multidrug-resistant *Mycobacterium leprae* from Indian leprosy patients; **Journal of Global Antimicrobial Resistance**; v. 12, p. 214-219; 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.

LI, X. *et. al.* Drug resistance (dapsone, rifampicin, ofloxacin) and resistance-related gene mutation features in leprosy patients: a systematic review and meta-analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 20, p. 12443, 2022.

LIMA, F. R., *et. al.* Bacilloscopy and polymerase chain reaction of slit-skin smears and anti-phenolic glycolipid-I serology for Hansen's disease diagnosis. **Frontiers in Medicine**, v. 9, p. 972244, 2022.

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.

MAEDA, S. *et. al.*; Multidrug resistant *Mycobacterium leprae* from patients with leprosy; **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n.12, p. 3635-3639; 2001.

MANTA, F. S. N. *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, 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, n.5, 2018.

MARPAUNG, Y. M.; ERNAWATI, E.; DWIVANIA, A. T. Stigma towards leprosy across seven life domains in Indonesia: a qualitative systematic review. **BMJ Open**, v. 12, n. e062372, p. 1-9, 2022.

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 Clínical Microbiology**, v. 47, n. 7, p. 2124-2130, jul. 2009.

MATSUOKA, M. Drug resistance in leprosy. **Japanese Journal of Infectious Diseases,** v. 63, n.1; 2010.

MATSUOKA, M. *et. al.*; Anovel method for simple detection of mutations conferring drug resistance in *Mycobacterium leprae*, based on a DNA microarray, and its applicability in developing countries; **Journal of Medical Microbioloy**; v. 57, n.10, p. 1213-1219; 2008.

MINAS GERAIS. SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DE MINAS GERAIS. **Plano Estadual de Saúde 2020-2023**. 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. Acesso em: 05 abr. 2025.

MINAS GERAIS. Secretaria de Estado de Saúde. Coordenação Estadual de Hanseníase. **Boletim Epidemiológico: Hanseníase em Minas Gerais, 2026**. Belo Horizonte: SES-MG, 2026. v. 1. Disponível em: https://www.saude.mg.gov.br/hanseníase. Acesso em: 17 mai. 2026.

MINAS GERAIS. Secretaria de Estado de Saúde. Coordenadoria Estadual de Controle da Hanseníase. **Plano estadual de enfrentamento da hanseníase em Minas Gerais, 2019-2022.** Belo Horizonte: SES-MG, 2019. Disponível em: https://web.archive.org/web/20240126103756id_/https://saude.mg.gov.br/images/noticias_e_eventos/000_2019/jun-jul-ago/Plano%20Estadual%20versao%20definitiva%20julho%202019_02-07.pdf. Acesso em: 12 ago. 2025.

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.

MUNDADA, S. *et. al.* Comparative Study of Sensitivity and Specificity of RT-PCR, Histopathological Diagnosis and Slit Skin Smears in Detection of M leprae. **Indian J Lepr**, v. 98, p. 131-141, 2026.

MURTAZA, A. *et. al.* Challenges of delay in diagnosis and high disability rate among newly diagnosed leprosy patients in Karachi, Pakistan. **Leprosy Review**, v. 95, n. 4, p. 0-0, 2024.

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

OLIVEIRA, L. B. P. *et. al.* The landscape of chemokine and cytokine is associated with the distinct clinical status of leprosy patients and their respective household contacts. **Frontiers in Immunology**, v. 15, 2024.

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

PATIAL, M. *et. al.* Assessment of Clinical, histopathological, and bacteriological findings in treated Leprosy patients with persistent skin lesions: a retrospective cohort study. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 109, n. 6, p. 1260, 2023.

PEARSON, J. M.H., *et. al.* Primary dapsone-resistant leprosy; **Lepr Rev.**; v. 48, p. 1929-1932; 1977.

PERERA, G. *et. al.* Unraveling drug resistance in *Mycobacterium leprae*: Exploring genetic mutations to enhance treatment strategies for human leprosy—A narrative review. **International Journal of Microbiology**, v. 2025, n. 1, p. 7204337, 2025.

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 Brazilian Cohort: a quasi-experimental study. **The Lancet infectious diseases**, v. 20, n. 5, p. 618-627, 2020.

PETTIT J.H., REES R.J.; Sulphone resistance in leprosy. an experimental and clinical study; **Lancet**; v.2, p.673–674; 1964.

PINHEIRO, M. D. S. *et. al.* Impact of qPCR on the diagnostic evaluation of individuals with suspected leprosy. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 12, n. 3, p. e13312340549, 2023. DOI: 10.33448/rsd-v12i3.40549.

PINHEIRO, M. D. S. **Perfil clínico, sociodemográfico e laboratorial dos indivíduos com suspeição diagnóstica de hanseníase atendidos no CREDEN-PES no período de 2017 a 2021**. 2022. Dissertação (Mestrado Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2022. Disponível em: https://repositorio.ufjf.br/jspui/handle/ufjf/14114. Acesso em: 3 mai. 2026.

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.

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.

ROCHA, A. S., *et. al.* Drug and Multidrug Resistance among *Mycobacterium leprae* Isolates from Braziliam Relapsed Leprosy Patients; **Jornal of Clinical Microbiology**; v. 50, n.6, p. 1912-1917; 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.

SAID, A. H; MWANGA, H.; HUSSEIN, A. K. Trends in case detection rate for leprosy and factors associated with disability among registered patients in Zanzibar, 2018–2021. **Bulletin of the National Research Centre**, v. 48, n. 1, p. 98, 2024.

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

SANTOS, D. S., *et. al.*; Chemoprophylaxis of leprosy with rifampicin in contacts of multibacillary patients: study protocol for a randomized controlled trial; **Trial**, v. 19, p. 1-10, 2018.

SANTOS, G. M. C. *et. al.* Factors associated with delayed diagnosis of leprosy in an endemic area in Northeastern Brazil: a cross-sectional study. **Cadernos de saúde pública**, v. 40, p. e00113123, 2024.

SARDANA, K. *et. al.* Implications of drug resistance in leprosy: disease course, reactions and the use of novel drugs. **International Journal of Dermatology**, v. 64, n. 2, p. 302-312, 2024.

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

SHETTY, V. P., UPLEKAR, M. W.; ANTIA, N. H.; Primary resistance to single and multiple drug in leprosy – a mouse footpad study; **Lepr. Rev.**; v. 67, p. 280-286; 1996.

SILVA, M. B., *et. al.* Latent leprosy infection identified by dual RLEP and anti-PGL-I positivity: implications for new control strategies. **PLoS One**, v. 16, n. 5, p. e0251631, 2021.

SILVA, M. J. A. *et. al.*, Comparative analysis of the leprosy detection rate regarding tis clinical spectrum through PCR using 16S rRNA gene: a scientometrics and meta-analysis; **Frontiers Microbiology**; 2024. Disponível em: https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2024.1497319/full. Acesso em: 05 abr. 2025

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%20han

sen%C3%ADase%20pode%20causar%20no,de%20suas%20necessidades%20e%20desejos. Acesso em: 05 abr.2025

SINGH, P; COLE, S. T. *Mycobacterium leprae*: genes, pseudogenes and genetic diversity. **Future microbiology**, v. 6, n. 1, p. 57-71, 2011.

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.

TAHIR, H. *et. al.* Molecular Detection of *Mycobacterium leprae* in Household Contacts of Leprosy Patients in Barru Regency. **The International Journal of Mycobacteriology**, v. 15, n. 1, p. 26-30, 2026.

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.

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.* Molecular detection of *Mycobacterium leprae* and the process of infection and illness in contacts of leprosy patients: A systematic review. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 10, n. 2, p. 32, 2025.

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 V.D; BRENNAN P.J. The genome of *Mycobacterium leprae*: a minimal mycobacterial; **Geno Biology**; v. 2, n. 8; 2001.

WARKA, U. L., *et. al.* Molecular identification of *Mycobacterium leprae* in the leprosy patients. **The International Journal of Mycobacteriology**, v. 13, n. 3, p. 288-292, 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). A guide for surveillance of antimicrobial resistance in leprosy: 2017 update. Genebra: World Health Organization, 2017. 56 p. ISBN 978-92-9-022549-2. Disponível em: https://www.who.int/publications/i/item/9789290225492. Acesso em: 19 mai. 2025.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global leprosy (Hansen disease) update, 2023: elimination of leprosy disease is possible – time to act!. Weekly Epidemiological Record, Genebra, v. 99, n. 37, p. 501-521, 13 set. 2024. Disponível em: https://iris.who.int/server/api/core/bitstreams/4b0aea60-d4ec-4228-946e-773d864e1b2d/content. Acesso em: 19 mai. 2025.

YADAV, N. *et. al.* Leprosy elimination: a myth busted. **Journal of Neurosciences in Rural Practice**, v. 5, n. Suppl 1, p. S28 - 32, 2014.

YAN, W. *et. al.* Application of RLEP real-time PCR for detection of *M. leprae* DNA in paraffin-embedded skin biopsy specimens for diagnosis of paucibacillary leprosy. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 90, n. 3, p. 524-529, 2014.

.

ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Gostaríamos de convidar você a participar como voluntário (a) da pesquisa **"Marcadores de resistência a PQT e indicadores de infecção subclínica em não notificados/assintomáticos de hanseníase – qPCR positivo para DNA de *M. leprae*"**. O motivo que nos leva a realizar esta pesquisa é "Entender porque algumas pessoas, tendo contato com as pessoas que têm hanseníase podem desenvolver a doença e outras não, além disso, vamos estudar se a presença do DNA (material genético) da bactéria pode influenciar o desenvolvimento da hanseníase". Nesta pesquisa pretendemos realizar a vigilância, o acompanhamento e o diagnóstico dos indivíduos que possuem o micróbio da hanseníase. Estas ações poderão contribuir para o controle mais eficaz dessa doença. Caso você concorde em participar, vamos fazer as seguintes atividades com você:

1. Será realizado o exame clínico, por médicos e outros profissionais da saúde previamente treinados. Durante o exame clínico, será aplicado um questionário, com perguntas a respeito da hanseníase e hábitos.
2. Serão realizados testes no sangue para auxiliar no diagnóstico da doença. Para estes testes iremos coletar 60 mL de sangue da veia do seu braço. O sangue coletado por profissional treinado será levado aos laboratórios multiusuários da UFJF/GV para fazer testes que irão mostrar como o seu organismo se defende contra o micróbio que causa a hanseníase. Os testes serão, por exemplo, medir substâncias de defesa (tais como anticorpos, citocinas e outros metabólitos), identificar substâncias produzidas pelo corpo do indivíduo doente que indicam a presença de infecção ativa.
3. Serão realizados testes com o material biológico para estudo do DNA da bactéria causadora da hanseníase, com objetivo de identificar regiões que quando ocorre mutação conferem resistência aos medicamentos da Poliquimioterapia (PQT).

Esta pesquisa tem alguns riscos, por exemplo: na coleta de sangue você pode sentir leve dor local, podendo em alguns casos levar a formação de manchas roxas no local da entrada da agulha. Estas manchas desaparecerem em alguns dias. Mas, para diminuir a chance desses riscos acontecerem, realizaremos a coleta de modo mais confortável possível, com profissionais treinados e com experiência. O risco de quebra de confidencialidade será minimizado com a utilização de códigos alfanuméricos para identificar as amostras coletadas. As informações coletadas da entrevista com você, e os resultados da pesquisa incluídos no banco de dados estarão em um único computador com acesso protegido por senha onde somente os pesquisadores terão acesso. A pesquisa pode ajudar a identificar novas formas de hanseníase e reações associadas à doença.

Para tanto, pedimos a sua autorização para a coleta, o armazenamento, e a utilização do material biológico para realização dos testes descritos nesse TCLE. Informamos que somente após a sua assinatura no TCLE os testes serão realizados. Os testes para analisar anticorpos, citocinas e outros biomarcadores no sangue serão realizados nos Laboratórios Multiusuários da UFJF- Campus GV. Os outros testes para estudar o DNA

da bactéria, será realizado no Instituto Lauro de Souza Lima (ISLS) em Bauru - SP. Nos laboratórios da UFJF/GV e do ILSL, existem locais apropriados para a armazenamento/conservação do material biológico. Estes locais são chamados de biorrepositórios e ficam sob a responsabilidade dos pesquisadores.

Além das pesquisas que faremos nesse momento, as amostras biológicas armazenadas poderão ser utilizadas em pesquisas futuras, desde que previamente aprovadas pelo Sistema de Avaliação Ética do uso de material biológico humano chamado de CEP/CONEP. Portanto, a cada nova pesquisa a ser executada será feita apresentação de novo projeto de pesquisa para ser analisado e aprovado pelo CEP/CONEP e com o RECONSENTIMENTO do participante da pesquisa por meio de um TCLE específico referente ao novo projeto de pesquisa.

O sangue e seus derivados (soro, plasma, células e DNA) ficarão guardados em tubos, congelados em freezer na temperatura de -20ºC e -80ºC, no biorrepositório do laboratório Multiusuário da UFJF/GV. Após a realização dos testes, o descarte será realizado seguindo um protocolo onde os tubos depois de colocados em solução desinfetante, a solução descartada na pia e os tubos serão dispensados em lixo hospitalar.

Para participar deste estudo você não vai ter nenhum custo. Ficará garantido a você e ao seu acompanhante, se houver, o ressarcimento de despesas tais como o transporte, a alimentação, e outras que se fizerem necessárias, decorrentes da sua participação nos dias das consultas ou exames. Além disso, se você tiver algum dano por causa das atividades que fizermos com você nesta pesquisa, você tem direito à assistência integral e gratuita, além de acompanhamento pelo tempo que for necessário. Bem como será garantido a você a prestação de assistência imediata, sem ônus de qualquer espécie e seu acompanhamento.

Você terá todas as informações que quiser sobre esta pesquisa e estará livre para participar ou recusar-se a participar. Mesmo que você queira participar agora, você pode voltar atrás ou parar de participar a qualquer momento. A sua participação é voluntária e o fato de não querer participar não vai trazer qualquer penalidade ou mudança na forma em que você é atendido (a). O pesquisador não vai divulgar seu nome. Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão. Você não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar. Além disso, os resultados dos exames clínicos e laboratoriais serão informados e explicados a você. Caso os exames mostrem que você tem o micróbio você será encaminhado para tratamento médico adequado, sem ônus de qualquer espécie.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável e a outra será fornecida a você. Os dados coletados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 (cinco) anos. Decorrido este tempo, o pesquisador avaliará os documentos para a sua destinação final, de acordo com a legislação vigente. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira

(Resolução Nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde), utilizando as informações somente para os fins acadêmicos e científicos.

Declaro que concordo em participar da pesquisa e que me foi dada à oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas. Todas as páginas do TCLE deverão ser rubricadas pelo pesquisador responsável/pessoa por ele delegada e pelo participante/responsável legal.

Gov. Valadares, _____ de _____ de 20 .

_____ _____

Assinatura do Participante Assinatura do (a) Pesquisador (a)

Nome do Pesquisador Responsável: Lucia Alves de Oliveira Fraga
Universidade Federal de Juiz de Fora – Campus Governador Valadares
Departamento Ciências Básicas da Vida
Av. Dr. Raimundo Monteiros Rezende, 330, no Centro
CEP: 35010-173
Fone: (33) 98855-9849
E-mail: luciaalvesfraga@yahoo.com.br, luciaalves.fraga@ufjf.edu.br

CEP-Comitê de Ética em Pesquisa da UFJF- responsável pela avaliação das atividades do projeto principalmente com relação às questões Éticas de Pesquisa em seres humanos. Telefone: 032-21023788

CONEP. COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA: responsável para verificar se todas as Normas Vigentes no País em relação às questões éticas da Pesquisa em Seres Humanos estão sendo respeitadas no desenvolvimento da pesquisa. E-mail: conep@saude.gov.br Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar Asa Norte, DF, BRASILIA.