

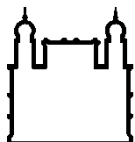
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Medicina Tropical

O PAPEL DOS MÉTODOS MOLECULARES NO DIAGNÓSTICO
PRECOCE DA HANSENÍASE E MONITORAMENTO DE
COMUNICANTES NO CONTEXTO DA ESTRATÉGIA DE
DESCENTRALIZAÇÃO DO PROGRAMA DA DOENÇA

RAQUEL RODRIGUES BARBIERI

Rio de Janeiro
Fevereiro de 2019



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

RAQUEL RODRIGUES BARBIERI

O papel dos métodos moleculares no diagnóstico precoce da hanseníase e monitoramento de comunicantes no contexto da estratégia de descentralização do programa da doença

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical – Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Medicina Tropical

Orientadores: Dra. Euzenir Nunes Sarno
Dr. Milton Ozório de Moraes
Laboratório de Hanseníase/IOC – Fiocruz

RIO DE JANEIRO
FEVEREIRO DE 2019

Barbieri, Raquel Rodrigues.

O papel dos métodos moleculares no diagnóstico precoce da hanseníase e monitoramento de comunicantes no contexto da estratégia de descentralização do programa da doença / Raquel Rodrigues Barbieri. - Rio de Janeiro, 2019.

128 f.; il.

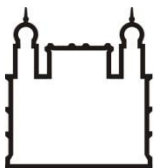
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2019.

Orientadora: Euzenir Nunes Sarno.

Co-orientador: Milton Ozório Moraes.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Hanseníase Paucibacilar. 2. Diagnóstico. 3. PCR. 4. Monitoramento dos comunicantes. 5. Demanda do centro de referência. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

RAQUEL RODRIGUES BARBIERI

O PAPEL DOS MÉTODOS MOLECULARES NO DIAGNÓSTICO PRECOCE DA HANSENÍASE E MONITORAMENTO DE COMUNICANTES NO CONTEXTO DA ESTRATÉGIA DE DESCENTRALIZAÇÃO DO PROGRAMA DA DOENÇA

ORIENTADORES: Dra. Euzenir Nunes Sarno
Dr. Milton Ozório Moraes

Aprovada em: 21/02/2019

EXAMINADORES:

Profa. Dra. Maria Leide Wan-Del-Rey de Oliveira
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

Prof. Dr. Mauricio Lisboa Nobre
Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grande do Norte – SESAP/RN

Prof. Dr. Adalberto Rezende Santos
Laboratório de Biologia Molecular Aplicada a Micobactérias / Instituto Oswaldo Cruz

Profa. Dra. Sandra Maria Barbosa Durães
Universidade Federal Fluminense – UFF

Profa. Dra. Fernanda Carvalho de Queiroz Mello
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

SUPLENTE:

Prof. Dra. Verônica Schmitz Pereira- LAHAN – Instituto Oswaldo Cruz-IOC
Prof. Dra. Nádia Cristina Duppre – Laboratório de Hanseníase- IOC

Rio de Janeiro, 21 de fevereiro de 2019

Para Catarina e Antônio

AGRADECIMENTOS

À Dra. Euzenir Sarno, orientadora, pelos ensinamentos e acolhimento.

Ao Dr. Milton Ozório Moraes, orientador, pelos conhecimentos partilhados, confiança e incentivo constantes.

Ao Dr. José Augusto da Costa Nery por dividir seus conhecimentos e pela inspiração pelo modo generoso com que cuida dos pacientes de hanseníase.

À Dra. Anna Maria Sales, que apesar de não ser minha orientadora oficial, mais uma vez me guiou por todo o caminho. Muito obrigada!

À Dra. Alice de Miranda Machado, pelo apoio, discussões enriquecedoras e pela realização de todas as análises histopatológicas desta tese.

À Dra. Nádia Cristina Duppre, pelas sugestões e discussões que tanto me ajudaram neste trabalho.

À Dra. Fernanda Manta, pelo apoio e colaboração nos artigos. À Suelen Moreira, pela realização dos PCRs deste estudo.

Ao Dr. Maurício Lisboa Nobre, por ter se dedicado a detalhada revisão desta tese.

Ao João Vitor Galo Esteves pela ajuda na formatação da tese.

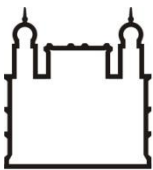
À Lílian, Cristiane, Juliana, Alex, Wellington, Cíntia, Edval, Ana, Daniel e todos os funcionários do Ambulatório Souza Araújo e do Laboratório de Hanseníase.

Aos meus queridos tios e tias que foram fundamentais para que eu chegasse até aqui.

Às minhas queridas irmãs, pelo amor e apoio de todas as horas.

À minha mãe, Maria de Lourdes, e ao meu pai, José Geraldo, pelo amor incondicional. Nesta altura, percebo que isto fez toda a diferença!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

O PAPEL DOS MÉTODOS MOLECULARES NO DIAGNÓSTICO PRECOCE DA HANSENÍASE E NO MONITORAMENTO DE COMUNICANTES NO CONTEXTO DA ESTRATÉGIA DE DESCENTRALIZAÇÃO DO PROGRAMA DA DOENÇA

RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM MEDICINA TROPICAL

Raquel Rodrigues Barbieri

O diagnóstico precoce da hanseníase e a vigilância dos contatos são consideradas importantes pilares para o controle da endemia. Nos últimos anos, a reação em cadeia da polimerase (PCR), tem despontado como uma importante ferramenta para o diagnóstico das formas paucibacilares (PB) da doença assim como para a identificação de contatos com infecção subclínica. **Objetivos:** Analisar o perfil dos casos com suspeita de hanseníase referenciados ao ambulatório de hanseníase da Fiocruz no contexto da descentralização do programa de controle da doença; avaliar o papel da PCR no diagnóstico da hanseníase PB e na identificação de infecção subclínica em contatos. **Métodos:** este trabalho foi conduzido no Centro de Referência de hanseníase do IOC – Fiocruz-RJ e está dividido em três partes. No estudo 1 foram analisadas as mudanças na demanda do ambulatório da Fiocruz no período de 2010-2014 comparado com 2005-2009. As informações foram obtidas do banco de dados do Laboratório de Hanseníase e do SINAN. Os aspectos clínicos e epidemiológicos dos pacientes foram analisados. No estudo 2, os pacientes foram avaliados por um dermatologista em três momentos. Na primeira visita, o exame clínico e as amostras foram coletadas. Na segunda visita, os resultados do exame histopatológico e da PCR (gen alvo-16S) foram analisados, e uma decisão terapêutica foi tomada. Um ano depois foi estabelecido um diagnóstico de consenso utilizado como padrão de referência para definir a sensibilidade e a especificidade da qPCR no diagnóstico das formas PB. No estudo 3, os contatos atendidos no ambulatório de 2011 a 2017 que tiveram raspado dérmico colhido para qPCR foram acompanhados para avaliação da relação do resultado da qPCR com o risco de adoecimento. **Resultados:** o estudo 1 mostrou que entre os 1.845 casos estudados 1.380 (75%) apresentavam outras dermatoses. Houve diminuição na proporção de casos novos de hanseníase em relação aos 5 anos anteriores ao período do estudo e 40% deles apresentavam algum grau de incapacidade no diagnóstico. No estudo 2 foi observado que dos 172 casos estudados 58% (100/172) tinham histologia inconclusiva e em 30% (30/100) deles a qPCR era positiva. A sensibilidade da histologia para o diagnóstico das formas PB foi de 35%, da qPCR 57% e com a combinação dos 2 testes a sensibilidade foi de 65%. No estudo 3 do total de 1,381 contatos incluídos a qPCR detectou apenas 20% dos que progrediram para doença sugerindo que, para este grupo, não foi um bom marcador preditivo de hanseníase. **Conclusão:** a qPCR aumenta a precisão do diagnóstico das formas PB da hanseníase.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

THE ROLE OF MOLECULAR METHODS IN EARLY LEPROSY DIAGNOSIS AND HOUSEHOLD CONTACTS MONITORING UNDER A DECENTRALIZED DISEASE PROGRAM POLICY

ABSTRACT

PHD THESIS IN TROPICAL MEDICINE

Raquel Rodrigues Barbieri

Early diagnosis of leprosy and contact surveillance are considered essential for disease control. In recent years, polymerase chain reaction (PCR) has emerged as an important tool for the diagnosis of paucibacillary forms (BP) as well as for the identification of contacts with subclinical infection. **Objectives:** To analyze the profile of suspected cases of leprosy referred to the Fiocruz leprosy outpatient clinic in the context of the decentralization of the disease control program; to evaluate the role of PCR in the diagnosis of PB leprosy and in the identification of subclinical infection in contacts. **Methods:** This study was conducted at the Reference Center of Fiocruz-RJ and is divided into three parts. In study 1, we analyzed the changes in Fiocruz's outpatient demand in the period 2010-2014 compared to 2005-2009. The information was obtained from the database of the Leprosy Laboratory and SINAN. The clinical and epidemiological aspects of the patients were analyzed. In study 2, the patients were evaluated by a dermatologist at three different times. On the first visit the clinical examination and collected samples were performed. On the second visit, the results of the histopathological and PCR assay (DNA-based *Mycobacterium leprae* qPCR-targeting 16S gene) were analyzed, and a decision regarding treatment was made. A year later, a consensus diagnosis was established, and it was used as a reference standard to define the sensitivity and specificity of qPCR in the diagnosis of PB forms of the disease. In study 3, contacts seen at the outpatient clinic from 2011 to 2017 who had slit smear skin collected for qPCR were followed up to evaluate the risk to progress towards the disease. **Results:** study 1, showed that among the 1,845 cases studied, 1,380 (75%) had other dermatoses. There was a decrease in the proportion of new cases of leprosy in relation to the 5 years prior to the study period and 40% of them had some degree of incapacity at diagnosis. In study 2, it was observed that of the 172 cases studied 58% (100/172) had inconclusive histology and in 30% (30/100) of them the qPCR was positive. The sensitivity of the histology for the diagnosis of PB forms was 35%, of the qPCR 57% and the combination of the 2 tests showed sensitivity of 65%. In the study 3, of the total of 1,381 contacts included, qPCR detected only 20% of those who progressed to disease suggesting that, for this group, it was not a good predictive marker of leprosy. **Conclusion:** qPCR increases the accuracy of the diagnosis of PB forms of leprosy.

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Hanseníase	15
1.1.1 Epidemiologia	15
1.1.2 Agente etiológico, transmissão e susceptibilidade genética ...	16
1.1.3. Imunopatologia e Classificação	18
1.1.4 Manifestações clínicas e diagnóstico diferencial	21
1.1.5. Diagnóstico.....	27
1.1.6 Tratamento	35
1.1.7 Prevenção e controle.....	38
2 JUSTIFICATIVA	41
3 OBJETIVOS	42
3.1 Objetivo geral	42
3.2 Objetivos específicos	42
4 MÉTODOS	43
4.1 Artigo 1: Impact of a Reference Center on Leprosy Control under a Decentralized Public Health Care Policy in Brazil	43
4.2 Artigo 2: Quantitative polymerase chain reaction in paucibacillary leprosy diagnosis: a follow-up study	44
4.3 Artigo 3: Quantitative PCR for leprosy monitoring and diagnosis among household contacts	45
5 RESULTADOS	46
5.1 Artigo 1	46
5.2 Artigo 2	58
5.3 Artigo 3	71
6 DISCUSSÃO	72
7 CONCLUSÕES	98

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100
9 ANEXOS	119
ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	119
ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO 122	
ANEXO C - TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DOS PACIENTES COM HANSENÍASE PAUCIBACILAR	124
ANEXO D - TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DOS PACIENTES COM HANSENÍASE PAUCIBACILAR DE 12 A 17 ANOS DE IDADE.....	127

LISTA DE FIGURAS

Introdução

Quadro 1: critérios de avaliação de grau de incapacidade e da função neural.....	29
Quadro 2: Escala logarítmica de Ridley.....	30

Discussão

Figura 1: Fluxograma de conduta para contatos de pacientes com hanseníase e casos suspeitos	89
---	----

Artigo 1

Fig 1. Annual number of new leprosy cases, 2005–2014.....	51
Fig 2. Annual proportion of newly-diagnosed leprosy cases compared to other diseases at the Fiocruz Outpatient Clinic, from 2005 to 2014.....	51
Fig 3. Annual proportion of number of health services prior to patients being referred to the Fiocruz Outpatient Clinic from 2005 to 2014.....	52

Artigo 2

Figure 1. clinical evaluations of the cases.....	62
Figure 2. Flow chart of quantitative polymerase chain reaction results, histopathological results, and consensus diagnosis.....	67
Figure 3. Examples of cases diagnosed as other dermatoses via histology and for which polymerase chain reaction was decisive in the leprosy diagnosis.....	68

Artigo 3

Figure 1. Flowchart of HHCs consultation in ASA between 2011-2017.....	83
--	----

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Table 1. Evaluated cases of leprosy and other diseases with and without biopsies at the Fiocruz Outpatient Clinic from 2010 to 2014.....	52
Table 2. Association between the origin and outcomes of cases referred to Fiocruz Outpatient Clinic from 2010 to 2014.....	53
Table 3. Epidemiological and clinical aspects of leprosy cases diagnosed at Fiocruz Outpatient Clinic from 2010 to 2014.....	53
Table S1: Percentagem of other diseases diagnosed without biopsy at the Fiocruz Outpatient Clinic from 2010 to 2014.....	55

Artigo 2

Table 1: Clinical-epidemiological characteristics: N = 172.....	66
Table 2: Proportions for histological diagnosis and polymerase chain reaction results..	66
Table 3: Histological and quantitative polymerase chain reaction (qPCR) sensitivity, specificity, and accuracy, and the combination of these two diagnostic methods.....	69

Artigo 3

Table 1. The clinical and epidemiological characteristics of household contacts of leprosy patients at Oswaldo Cruz Foundation clinic in Rio de Janeiro, 2011-2017.....	84
---	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ASA	Ambulatório Souza Araújo
BAAR	Bacilo Álcool-Ácido Resistente
BB	Hanseníase <i>Borderline Borderline</i>
BL	Hanseníase <i>Borderline</i> Lepromatosa
BT	Hanseníase <i>Borderline</i> Tuberculóide
CFZ	Clofazimina
DDS	Dapsona
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay / Ensaio imunoenzimático
ESF	Estratégia de Saúde da Família
ENH	Eritema Nodoso Hansênico
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
FTA-ABS	Fluorescent Treponemal Antibody Absorption Test/ Teste de absorção fluorescente do anticorpo do treponema
Hab.	Habitantes
HI	Hanseníase Indeterminada
IB	Índice Baciloscópico
IFN- γ	Interferon Gama
IgA	Imunoglobulina A
IL	Interleucina
LL	Hanseníase Lepromatosa
IM	Índice Morfológico
M. leprae	<i>Mycobacterium leprae</i>
MB	Multibacilar
ML Flow	Teste de Fluxo Lateral para anticorpos anti-PGL-I
NP	Hanseníase Neural Pura
NK	Natural Killer / Células Exterminadoras Naturais
OMS	Organização Mundial de Saúde
OR	Odds Ratio / Razão de chances
PB	Paucibacilar
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase

PGL-I	Antígeno Glicolípídeo Fenólico
PSF	Programa de Saúde da Família
PQT	Poliquimioterapia
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa
RFM	Rifampicina
RNA	Ácido Ribonucleico
RR	Reação Reversa
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SMS	Secretaria Municipal de Saúde
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF- β	Transforming Growing Factor / Fator de Transformação de Crescimento
Th1	Linfócitos T helper1
Th2	Linfócitos T helper2
TNF	Tumor Necrosis Factor / Fator de Necrose Tumoral
TT	Hanseníase Tuberculóide
VDRL	Venereal Disease Research Laboratory
WHO	World Health Organization / Organização Mundial de Saúde

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hanseníase

1.1.1 *Epidemiologia*

A hanseníase persiste como um relevante problema de saúde pública em diversos países, entre eles o Brasil, que atualmente é o segundo colocado no mundo em número de casos absolutos da doença (WHO, 2018a). Em 1991, a Organização Mundial de Saúde (OMS) adotou a meta de eliminação da hanseníase como problema de saúde pública até o ano 2000 (WHO, 1991). Desde então, a doença é considerada eliminada nos países que alcançaram a taxa de prevalência de menos de 1 caso por 10.000 habitantes. A implementação do tratamento com a poliquimioterapia (PQT) foi uma das medidas que colaborou muito para a redução global da prevalência nas últimas duas décadas, mas a queda da detecção de novos casos tem sido menor do que o esperado (WHO, 2018a).

A estratégia mais recente da OMS tem mudado de “eliminação da hanseníase como um problema de saúde pública” para a redução do ônus da doença, medido através da queda na detecção de casos com grau 2 de incapacidade (GI2) entre casos novos e redução da detecção da doença em crianças menores de 15 anos (WHO, 2016). Assim, a detecção de casos novos, o grau de incapacidade avaliado no momento do diagnóstico e a incidência de casos entre crianças são considerados os principais indicadores para avaliação do controle da endemia.

Nos últimos 10 anos a queda na detecção de casos novos da doença foi modesta, de 249.007 em 2008 para 210.671 em 2017 (queda de 3,4%). No último ano, Índia, Brasil e Indonésia registraram as maiores incidências e juntos contabilizaram 80,2% dos 210.671 novos casos diagnosticados. Nas Américas foram 29.101 casos, 92,3% deles no Brasil (WHO, 2018) que registrou taxa de detecção de 12,94/100.000 habitantes em 2017 considerada alta (Brasil, 2018).

Uma queda gradativa na porcentagem de casos diagnosticados com grau 2 de incapacidade tem sido observada no mundo, mas em alguns países, entre eles o Brasil, houve elevação deste indicador. Em 2016 foram registrados 1.736 casos novos com GI 2 entre nós e em 2017 foram 1.949 (WHO, 2018). De 2008 a 2017 a frequência de GI 2 entre os casos diagnosticados subiu na região sudeste de 9,9% para 11,9% e no Estado

do Rio de Janeiro de 8,3% em 2008 para 13,2% em 2017 (Brasil, 2018). A porcentagem de casos com grau de incapacidade 2 é considerada alta quando maior ou igual a 10% (Brasil, 2016). A presença de incapacidades no momento do diagnóstico reflete diretamente a detecção tardia de casos. Os fatores relacionados a este atraso incluem o estigma que acompanha o diagnóstico de hanseníase, a falta de conscientização da comunidade sobre os sintomas da hanseníase, a pouca sintomatologia das lesões de evolução recente, a capacidade do sistema de saúde em reconhecer a doença nos estágios iniciais e em certa medida, a cobertura dos serviços de saúde (WHO, 2018).

1.1.2 Agente etiológico, transmissão e susceptibilidade genética

1.1.2.1 Agente etiológico

O *M leprae* é um patógeno intracelular obrigatório, que infecta preferencialmente as células de Schwann humanas e fagócitos, como macrófagos teciduais e células dendríticas. Afeta principalmente a pele e os nervos periféricos mas pode acometer mucosas, olhos, linfonodos, medula óssea, vísceras abdominais e testículos (Job *et al.*, 1994).

O *M. leprae* é um bacilo gram positivo, que apresenta parede celular rica em lipídeos complexos, que lhe conferem a propriedade de ser um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR), ou seja, cora-se pela fuccina e não descora pelos ácidos e alcoóis quando corado pelo método de Ziehl-Neelsen. Por este método, os bacilos viáveis são visualizados em forma de bastonetes, que se coram uniformemente em vermelho e que se apresentam isolados ou agrupadas em globias. (Hunter e Brennan, 1981; Brennan e Nikaido, 1995)

A temperatura ideal de crescimento do bacilo é entre 27° C e 33° C, por isso é mais freqüente nas áreas mais frias do corpo humano (extremidades e face: orelhas e nariz) (Truman e Krahenbuhl, 2001). O bacilo pode se replicar em coxim plantar de camundongos e produzir infecção disseminada em tatus de nove bandas, que possui temperatura corporal ideal de 33° C (Lahiri e Adams, 2005).

O genoma do *M. leprae* é o menor entre as micobactérias (3,3 Mb) com 1614 genes codificadores de proteínas e 1300 pseudogenes (Cole *et al.*, 2001). Essa evolução redutiva é uma característica das bactérias que mudaram de um estilo de vida livre para um estritamente associado a um hospedeiro (Moya *et al.*, 2008). Sua incapacidade de

cultivo em meios artificiais provavelmente ocorre por causa desta perda de genes, (Cole *et al.*, 2001) o que dificulta o estudo de suas vias metabólicas e de fatores de virulência e o diagnóstico das formas paucibacilares da doença. O *M. leprae* foi considerado o único agente causador de hanseníase até 2008, quando uma nova espécie, *Mycobacterium lepromatosis*, foi identificada em pacientes com hanseníase lepromatosa difusa (Han *et al.*, 2008).

1.1.2.2 Transmissão

O modo exato de transmissão da hanseníase é desconhecido, mas acredita-se que a principal via seja as vias aéreas superiores. O contato próximo com doentes não tratados é considerado um fator de alto risco de transmissão (Sales *et al.*, 2011; Pedley, 1978). Há um consenso de que os pacientes com a forma multibacilar são considerados a principal fonte de infecção, mas o risco de desenvolver hanseníase entre contatos domiciliares de pacientes paucibacilares é comprovadamente maior do que o da população geral (Fine *et al.*, 1997; Bees *et al.*, 1999). Além disso, a presença de DNA de *M. leprae* na mucosa nasal de indivíduos saudáveis foi demonstrada em populações de áreas endêmicas para hanseníase (Bees *et al.*, 1999). Estudo utilizando PCR em amostras nasal têm mostrado evidências de que pessoas infectadas (carreadores saudáveis ou portadores de infecção subclínica) podem passar por um período de excreção nasal (Hatta *et al.*, 1995). Não pode, portanto, ser excluída a possibilidade de transmissão pelos portadores sãos e por aqueles com infecção subclínica (Cree e Smith, 1998; Araújo *et al.*, 2012; Araújo *et al.*, 2016).

A evolução da infecção é lenta e o período de incubação da hanseníase é longo. Somente 10% dos indivíduos infectados desenvolvem sintomas (Lockwood e Suneetha, 2005). Apesar de ser um parasita intracelular obrigatório, o bacilo pode permanecer viável no meio ambiente por até nove dias, dependendo das condições ambientais (Desikan, 1977).

Alguns estudos demonstraram a presença do bacilo na água, no solo, em plantas e em insetos mas não foi possível concluir se essas fontes de infecção ambientais desempenham um papel na contaminação do ser humano (Bratschi *et al.*, 2015). Em algumas regiões dos Estados Unidos a infecção natural de tatus (*Dasypus novemcinctus*) foi demonstrada, a doença é considerada uma zoonose e há relato de

casos em humanos a partir do contato com esses animais (Job *et al.*, 1986; Truman *et al.*, 2011). Outros animais como chimpanzé, macaco mangabey, macaco verde africano e esquilos têm sido diagnosticados com hanseníase adquirida naturalmente, mas esses animais não parecem atuar como fontes de infecção para o homem (Stinear e Brosch, 2016). Além da secreção nasal, bacilos foram encontrados na pele de indivíduos aparentemente saudáveis em áreas endêmicas (Bratschi *et al.*, 2015) mas, de fato, apesar da lacuna que ainda existe no conhecimento que temos sobre o transmissão do *M. leprae*, considera-se até o momento que o Bacilo de Hansen é transmitido predominantemente a partir das vias aéreas superiores de um doente não tratado para um indivíduo susceptível com quem mantém contato próximo (Moet *et al.*, 2004).

1.1.2.3 Susceptibilidade genética

Além do fato de que a convivência com um portador de hanseníase aumenta o risco de adoecimento, estudos constataram que o grau de parentesco entre os doentes e seus contatos também é um fator importante no processo de transmissão (Fine *et al.*, 1997; Sales *et al.*, 2011). O avanço da genômica tornou possível a identificação de polimorfismos genéticos que podem conferir susceptibilidade ou resistência à hanseníase. Esses estudos vêm apontando genes nos quais pequenas variações estruturais codificam proteínas com alterações funcionais que podem interferir na defesa contra o *M. leprae*. Destacam-se os polimorfismos nos genes *PARK2* e *PARCRG* que podem inibir a ativação do macrófago conferindo susceptibilidade à doença (Mira *et al.*, 2004).

1.1.3. Imunopatologia e Classificação

1.1.3.1 Imunopatologia

A habilidade do hospedeiro em desenvolver diferentes graus de resposta imune celular ao *M. leprae* é o que define a grande variedade de manifestações clínicas e histopatológicas da hanseníase e o que determina o conceito espectral da doença. A primeira barreira à infecção pelo *M. leprae* é a imunidade inata, representada pela integridade dos epitélios, secreções e imunoglobulina de superfície A (IgA). As células natural killer (NK), os linfócitos T citotóxicos e os macrófagos ativados também podem

participar da destruição de bacilos, independentemente da ativação da imunidade adaptativa. A resposta imune inata efetiva em combinação com a baixa virulência do *M. leprae*, pode ser a base para a resistência ao desenvolvimento de manifestações clínicas da hanseníase (Scollard *et al.*, 2006). Nos casos em que há instalação da infecção, a resposta imune do hospedeiro é indefinida na fase inicial. A regulação de citocinas inflamatórias pode levar à proliferação de linfócitos T helper 1 (Th1) ou T helper 2 (Th2), que promoverão resposta imune celular ou humoral ao *M. leprae*, respectivamente. Isso determinará a evolução da doença para uma das formas clínicas do espectro (Modlin e Bloom, 1993; Mendonça *et al.*, 2008).

Apesar de ser ineficaz para evitar o desenvolvimento da doença, a imunidade celular dos indivíduos que desenvolvem a forma tuberculóide da hanseníase limita a proliferação dos bacilos, o que se reflete clinicamente em um pequeno número de lesões cutâneas. Na resposta Th1 o interferon gama (IFN- γ), ativa macrófagos enquanto a interleucina-2 (IL-2) estimula a proliferação de células T antígeno-específicas, resultando em doença mais branda (Cher e Mosmann, 1987). Na histologia observa-se formação de granuloma tuberculóide onde os bacilos são muito raros ou ausentes. No outro extremo, ocorre a diferenciação de linfócitos Th2 que produzem IL-4 e IL-10. Essas citocinas inibem a ativação de macrófago (Sieling e Modlin, 1994) aumentando a resposta humoral que, por sua vez, é incapaz de controlar a replicação de patógenos intracelulares resultando em infecção progressiva (Stevens *et al.*, 1988). Estes indivíduos desenvolvem hanseníase lepromatosa com produção de altos títulos de anticorpos IgM contra o antígeno específico do *M. leprae*, o glicolípido fenólico (PGL-I). Na histopatologia é possível visualizar a formação de células vacuoladas com múltiplos bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR). Entre essas duas formas da doença encontram-se as formas intermediárias, *borderline*, classificadas em *borderline* tuberculóide (BT), *borderline borderline* (BB) e *borderline* lepromatosa (BL), que se caracterizam por intensidade decrescente da imunidade celular de BT para BL com bacilos em quantidade inversamente proporcional (Ridley and Jopling, 1966).

1.1.3.2 Classificação

O espectro de manifestações clínicas decorrentes da interação entre *M. leprae* e a resposta imunológica do ser humano, fez surgir algumas classificações no decorrer da

história da doença. No VII Congresso Internacional de Leprologia, realizado em Madri em 1953, estabeleceu-se a classificação polar da hanseníase. Considerou-se as duas formas polares tuberculóide e virchowiana, que são estáveis e os grupos indeterminado e dimorfo considerados instáveis (Madri, 1953). Nesta classificação, a hanseníase indeterminada (HI) é considerada a forma inicial da doença que pode evoluir para um dos dois polos. Esta é a classificação usada pelo programa de controle da hanseníase no Brasil (Brasil, 2016).

Na década seguinte, Ridley e Jopling (1966) adaptaram a Classificação de Madri dando ênfase aos aspectos imuno-histopatológicos das lesões. A definição das formas clínicas para estes autores estava relacionada à frequência de células vacuoladas, células epitelióides, células gigantes tipo Langhans, linfócitos, fibroblastos, infiltração de ramos nervosos, presença de faixa subepidérmica, presença de globias e índice baciloscópico no fragmento de biópsia. Descreveram duas formas estáveis, nos extremos do espectro, que são a tuberculóide e a lepromatosa e entre elas as formas *borderline* que são imunologicamente instáveis. Os casos de hanseníase tuberculóide (TT) apresentam poucas lesões, raros bacilos detectáveis e intensa resposta imune celular, enquanto no outro extremo, a forma lepromatosa (LL), a doença é difusa, com intensa multiplicação bacilar e ativação da imunidade humoral em detrimento da resposta celular. Os indivíduos que apresentam respostas intermediárias desenvolvem as formas *borderline*, que se caracterizam por aspectos clínicos e imunológicos também intermediários, e são subdivididas em *borderline tuberculóide* (BT), *borderline-boderline* (BB) e *borderline lepromatosa* (BL), de acordo com a proximidade a cada um dos extremos do espectro (Ridley e Jopling, 1966). Os pacientes classificados como BB e BL podem caminhar no espectro em direção a um dos polos enquanto os pacientes BT são mais estáveis.

A partir da implementação do tratamento com poliquimioterapia (PQT), a OMS propôs uma classificação visando uma melhor operacionalização do programa no campo, a classificação operacional, definida inicialmente pelo índice baciloscópico (IB) no momento do diagnóstico (WHO, 1982). A princípio, os casos com IB de até 2+ eram considerados paucibacilares e IB > ou = 2+ multibacilares. Desde de 1988, os pacientes com baciloscopia positiva em qualquer sítio de coleta são classificados e tratados como multibacilares (MB), e aqueles com IB negativo recebem o esquema terapêutico para paucibacilares (PB). Posteriormente, considerando que nem sempre é possível a

realização da baciloscopia, a OMS criou uma classificação mais simples, baseada na extensão da doença, dividindo os pacientes em PB quando apresentam até cinco lesões cutâneas e em MB quando apresentam seis ou mais lesões (WHO, 1998).

1.1.4 Manifestações clínicas e diagnóstico diferencial

1.1.4.1 Hanseníase Indeterminada

A forma indeterminada da hanseníase caracteriza-se clinicamente pela presença de máculas hipocrômicas ou discretamente eritematosas. Nas lesões iniciais a alteração da sensibilidade pode ser duvidosa ou haver diminuição da sensibilidade térmica. Eventualmente a manifestação clínica pode ser somente uma área hipoestésica sem lesão visível. Na medida em que as manchas evoluem poderá surgir redução da sudorese e rarefação dos pelos. Não há espessamento de troncos nervosos e portanto não há deformidades. A evolução natural da hanseníase indeterminada (HI), sem tratamento, poderá ser para cura espontânea ou para as formas clínicas tuberculóide, lepromatosa ou *borderline*, de acordo com a resposta imune do indivíduo (Ridley, 1966, Azulay, 1971). A duração da fase inicial é, em média, de um a cinco anos (Talhari *et al*, 2006).

De acordo com alguns autores (Talhari *et al*, 2006, Azulay, 1997) as principais doenças dermatológicas que devem ser consideradas no diagnóstico diferencial da HI são:

Pitíriase Versicolor: é uma micose superficial crônica, causada por leveduras do gênero *Malassezia spp.* comensais das camadas queratinizadas da pele e que, sob determinadas condições se tornam patogênicas, determinando as manifestações clínicas. Caracteriza-se pelo surgimento de manchas hipocrômicas, hiperocrômicas ou eritematosas, assintomáticas, que apresentam descamação quando atritadas. As máculas são de tamanho variado e podem coalescer. Acometem principalmente tronco, pescoço, face e membros superiores. A sensibilidade nas lesões é sempre normal.

Pitíriase Alba (eczemátides): clinicamente se caracteriza pela presença de máculas hipocrômicas assintomáticas, em grande ou pequeno número, localizadas principalmente na face, tronco e membros superiores. Pode apresentar a superfície descamativa ou áspera pela presença de ceratose folicular, mas quando esta característica está ausente há grande dificuldade do diagnóstico diferencial com HI. A

sensibilidade está preservada. Pode estar associada à dermatite atópica.

Dermatite seborreica: caracteriza-se por máculas hipocrômicas ou eritematosas, isoladas ou confluentes, assintomáticas que acometem principalmente a face e a área central do tronco. As lesões podem apresentar descamação. Não há alteração de sensibilidade.

Hipocromia residual: são áreas hipopigmentadas secundárias a dermatose preexistente ou traumas cutâneos que tendem a regredir espontaneamente.

Nevo hipocrômico: máculas hipocrômicas presentes desde o nascimento ou surgem nos primeiros meses de vida. Frequentemente apresentam contorno irregular (geográfico). São assintomáticos e a sensibilidade está preservada.

Vitiligo: dermatose de provável etiologia autoimune que caracteriza-se pela presença de manchas acrômicas, assintomáticas. Acometem principalmente a face, dorso das mãos, cotovelos, joelhos, tornozelos, virilhas e axilas. Assintomáticas.

A alteração da sensibilidade é o principal sinal clínico para diagnóstico diferencial entre as dermatoses que se apresentam sob a forma de máculas hipocrômicas e hanseníase indeterminada.

1.1.4.2 Hanseníase Tuberculóide

A hanseníase tuberculóide (TT) na maioria das vezes surge a partir de uma mácula de HI que gradativamente vai se tornando infiltrada. As lesões cutâneas apresentam distribuição assimétrica, são do tipo placa, em geral única ou em pequeno número. Estas placas podem ser eritematosas ou apresentarem hipopigmentação no centro e bordos eritematosos, bem definidos e elevados. A inflamação de ramos neurais intradérmicos levam a alterações sensitivas e autonômicas que resultam em hipoestesia, pele seca, hipohidrose e rarefação de pêlos. Pode haver acometimento de troncos nervosos periféricos com consequentes deformidades incapacitantes decorrentes da perda da sensibilidade nas mãos ou pés e da paralisia de grupos musculares. Os casos em que as manifestações neurais ocorrem na ausência de lesões cutâneas são denominados hanseníase neural pura. Em seguida estão descritas as principais dermatoses que fazem diagnóstico diferencial com a hanseníase tuberculóide (Talhari *et al*, 2006).

Dermatofitose: micose superficial causada por fungos dermatófitos e adquirida

através do contato com pessoas, animais ou solo contaminado. Assim como as lesões de HT, se caracteriza pela presença de placas com bordos elevados e área central com tendência a cura. A descamação, as escoriações e a queixa de prurido são importantes para definir o diagnóstico de dermatofitose.

Esclerodermia em placa: de causa desconhecida, se caracteriza por lesões em placa, únicas ou múltiplas. A princípio as lesões são eritematosas e se tornam hipercrômicas com áreas esbranquiçadas. As placas são endurecidas e pode haver diminuição da sensibilidade e da sudorese. Muitas vezes a biópsia para exame histopatológico é necessária para o esclarecimento diagnóstico.

Granuloma anular: de causa desconhecida, pode estar relacionada a diabetes, se caracteriza pela presença de placas anulares muito semelhantes as lesões de HT. Não há perda de sensibilidade nas lesões, mas a biópsia com exame histopatológico pode ser necessária para o diagnóstico diferencial.

Sífilis: doença sexualmente transmissível causada pelo *Treponema pallidum*. Algumas lesões cutâneas em placa das fases secundárias e terciárias podem simular HT. A história de presença de lesão de cancro duro, característico da fase primária, pode orientar o diagnóstico. A sensibilidade é normal. Os exames laboratoriais esclarecem o diagnóstico (VDRL, FTA-ABS e histopatologia).

Sarcoidose: doença de causa desconhecida que além da pele pode acometer os pulmões. Na pele se caracteriza pela presença de placas que são clínica e histologicamente semelhantes à HT.

Tuberculose cutânea: também causada por uma micobactéria, quando se manifesta por lesão em placa pode ser confundida com HT. O exame histopatológico e a cultura podem esclarecer o diagnóstico.

Leishmaniose tegumentar: doença causada por protozoário do gênero *Leishmania* e transmitida ao homem através da picada do mosquito do gênero *Lutzomia* infectado. Se caracteriza por surgimento de lesões do tipo placa que evoluem para úlcera. O exame histopatológico e a cultura ajudam na definição do diagnóstico.

Necrobiose lipóidica: doença de causa desconhecida frequentemente associada a diabetes. Se caracteriza pela presença de uma ou poucas placas violáceas com centro deprimido localizadas preferencialmente na face anterior das pernas em geral simétricas. A história de diabetes e a histologia ajudam esclarecer o diagnóstico.

No diagnóstico diferencial entre as dermatoses que cursam com o surgimento de

placas e hanseníase tuberculóide a alteração de sensibilidade também é um sinal clínico decisivo.

1.1.4.3 Hanseníase Lepromatosa

As lesões cutâneas da hanseníase lepromatosa (LL) são múltiplas e simétricas; podem ser do tipo máculas, pápulas, nódulos (hansenomas) e/ou infiltração. Muitas vezes a LL é a evolução da hanseníase indeterminada não tratada em indivíduos sem resistência ao bacilo. Nestes casos, as máculas hipocrômicas vão se tornando eritematosas e infiltradas com bordos imprecisos. A LL pode também iniciar com infiltração difusa da pele. Pode haver cianose de extremidades e edema das mãos e membros inferiores com aspecto endurecido das pernas, com pele lisa e brilhante. Gradativamente vai ocorrendo espessamento difuso da face com proeminência dos sulcos naturais da pele, espessamento do nariz e orelhas, levando à facies leonina. Pode haver infiltração da mucosa nasal e surgimento de lesões na orofaringe. Posteriormente, podem ocorrer ulceração e desabamento do nariz, alterações visuais, e alterações ósseas nas mãos e pés. Com a evolução da doença, múltiplos troncos nervosos se tornam espessados, simetricamente, levando à perda sensitiva e motora. É comum que haja xerodermia e queda de cílios e sobrancelhas (madarose).

Deve-se considerar algumas doenças no diagnóstico diferencial da hanseníase lepromatosa (Azulay, 1997, Talhari *et al*, 2006).

Sífilis secundária: caracteriza-se pelo surgimento de placas e/ou pápulas disseminadas. Pode haver infiltração da face e madarose. A história de úlcera genital alerta para o diagnóstico de sífilis. O VDRL pode ser positivo na LL e por isso o FTA-ABS e a baciloscopia negativa para BAAR ajudam definir o diagnóstico.

Leishmaniose anérgica: A variedade anérgica da leishmaniose é rara e se caracteriza pela presença de grande número de lesões do tipo pápulas e placas, isoladas ou confluentes distribuídas pelo tegumento. O aspecto clínico pode ser muito semelhante ao da LL. A baciloscopia e a pesquisa de leishmânia no exame direto ou na histologia são fundamentais para o diagnóstico.

Xantomatoses: doenças raras que ocorrem em decorrência da deposição de lipídios na pele, mais precisamente no interior de histiócitos. Se manifestam na pele como nódulos amarelados ou amarelo-avermelhados que são os xantomatos. Estão

associadas a erro genético do metabolismo lipídico. Representam a expressão dermatológica das hiperlipidemias familiares. Podem ocorrer xantomas não-familiares com lipídios séricos normais. A histopatologia define o diagnóstico.

Linfomas: neoplasias malignas de linfócitos B, T ou histiócitos. Podem se manifestar como lesões eritemato-infiltradas, lesões pápulo-tuberosas ou nodulares.

Neurofibromatose: doença genética que se caracteriza clinicamente pela presença de neurofibromas que são tumores dérmicos ou subcutâneos de consistência amolecida, cor da pele ou acastanhados que surge em número variado a partir do final da infância. A presença de manchas café com leite e a história familiar auxiliam o diagnóstico.

1.1.4.4 Hanseníase Borderline

Nas formas *borderline* as lesões cutâneas têm aspecto variável de acordo com a proximidade a um dos extremos do espectro da doença, de modo que as lesões de hanseníase *borderline* tuberculóide (BT) assemelham-se à forma TT, mas geralmente as lesões são menos limitadas e ocorrem em maior número. A forma *borderline borderline* (BB) é extremamente instável e caracteriza-se pela presença de placas de bordos externos infiltrados e pouco definidos, que podem ser muito grandes, conhecidas como lesões foveolares (Azulay,1997). A hanseníase *borderline* lepromatosa (BL) se caracteriza pela presença de numerosas lesões cutâneas tipo máculas, pápulas, placas, tubérculos e/ou nódulos. Algumas placas são muito grandes, outras têm aspecto foveolar e alguns nódulos podem estar presentes. O quadro clínico assemelha-se ao da forma LL, com acometimento menos difuso e mais assimétrico. O comprometimento da sensibilidade das lesões cutâneas é nítido na forma TT e menos evidente ao longo do espectro clínico, sendo às vezes imperceptível na forma LL (Talhari *et al.*, 2006).

No diagnóstico diferencial das formas *borderline* deverão ser consideradas as dermatoses citadas para a hanseníase tuberculóide e lepromatosa.

1.1.4.5 Estados Reacionais

As reações são eventos inflamatórios agudos que podem surgir antes, durante ou após o tratamento específico com poliquimioterapia. Acometem principalmente a pele e

nervos, mas manifestações sistêmicas podem surgir. As reações são responsáveis por dano neural, morbidade e internação dos pacientes de hanseníase. Existem, principalmente, dois tipos de reações: Reação Reversa (RR) e Eritema Nodoso Hansênico (ENH) (Kumar, 2004).

A Reação Reversa se caracteriza por uma reatividade mediada por linfócitos T direcionada aos antígenos do *M. leprae*, que acontece principalmente nos pacientes BT, BB ou BL. Clinicamente caracteriza-se pelo aumento da inflamação nas lesões pré-existentes que já apresentavam sinais de regressão após início do tratamento que se tornam eritematosas, edematosas, descamativas e muitas vezes, com hiperestesia. Frequentemente surgem novas lesões com aspecto inflamatório semelhante às anteriores. Sintomas sistêmicos podem estar presentes e quando ocorrem representam condição clínica grave com mal-estar, febre, dores ósseas, linfadenomegalias, artralgias e edema generalizado (Sehgal, 1987, Naafs, 1994). Oliveira *et al.* (1996) descreveram o aparecimento de lesões maculares em pacientes multibacilares após a alta terapêutica, denominadas reação reversa macular pós alta.

Entre as doenças cutâneas que simulam a reação reversa estão: urticária; angioedema; erisipela; eritema girado; eritema multiforme; lupus eritematoso subagudo e agudo e erupções medicamentosas (Moschella, 2016). Essas dermatoses têm características histológicas específicas.

O ENH ou reação tipo 2 ocorre principalmente nos pacientes “borderline-lepromatosos” (BL) e nos lepromatosos-lepromatosos (LL). Sua fisiopatogenia não está completamente esclarecida, a participação da imunidade mediada por células tem sido demonstrada por diversos autores (Laal, Bhutani e Nath, 1985; Rao e Rao, 1987; Sarno *et al.*, 1991) e a reação mediada por anticorpos também está envolvida. Clinicamente o ENH caracteriza-se pelo aparecimento de nódulos eritematosos na derme profunda, com características inflamatórias, que ao involuïrem podem deixar máculas hiperocrômicas. As lesões acometem principalmente a face e extremidades, mas podem aparecer em qualquer região do corpo. Além dos nódulos característicos, as lesões dermatológicas podem ser placas que quando coalescem formam placas profundas de paniculite (Tolentino, 1965). Nas reações mais graves, as lesões tipo placas e nódulos podem ulcerar caracterizando o chamado eritema nodoso necrótico. Além das lesões cutâneas pode haver linfadenomegalias, glomerulonefrite, hepatoesplenomegalia, episclerite e iridociclite, epididimite, orquite, artrite e edema de extremidades.

Entre as doenças que podem se assemelhar às do espectro do ENH estão a Doença de Sweet e eritema nodoso de outras etiologias. Dentre as condições que simulam a paniculite hansênica do ENH estão o eritema endureado, vasculites como poliarterite nodosa, lúpus profundo, infecções micobacterianas típicas e atípicas e linfomas cutâneos (Moschella, 2016).

A neurite pode surgir durante as reações e é a principal causa das incapacidades e deformidades na hanseníase. Segundo Pearson e Ross (1975), a lesão neural resulta da resposta imunológica do hospedeiro à presença de antígeno derivados do *M. leprae* dentro dos nervos. De acordo com Job (1989), grande parte das lesões neurais acontece devido ao aumento da pressão intraneural causada pelo processo inflamatório e à alteração vascular intraneurais. Clinicamente, a neurite é caracterizada por dor espontânea ou à palpação do tronco nervoso acometido, espessamento neural e sinais de piora da neuropatia periférica prévia (sensitivos, motores e autonômicos) podem ainda estar presentes. A neurite pode acompanhar os episódios reacionais tipo RR ou ENH. Os episódios de neurite podem ser extremamente agudos, às vezes insidiosos, ou até indolores (neurite silenciosa) (Fritschi, 1987; Rose e Waters, 1991). O tratamento da neurite é feito com corticoides e os pacientes com dano neural recente (menos de 6 meses de duração), apresentam melhor resposta que aqueles com acometimento tardio (Becx-Bleumink e Berhe, 1992).

1.1.5. Diagnóstico

Garantir que todos os casos de hanseníase sejam identificados é uma das principais estratégias da Organização Mundial de Saúde (OMS) para alcançar a meta de controle da doença. Ainda hoje, não existe uma técnica que possa ser denominada de padrão ouro para o diagnóstico da hanseníase, já que *M. leprae* não é cultivável (Avanzi, 2018).

O *guideline* publicado pela OMS em 2018 reafirma os critérios para o diagnóstico de hanseníase:

“the diagnosis of leprosy remains based on the presence of at least one of three cardinal signs: (i) definite loss of sensation in a pale (hypopigmented) or reddish skin patch; (ii) thickened or enlarged peripheral nerve with loss of sensation and/or weakness of the muscles supplied by that nerve; or (iii) presence of acid-fast bacilli in a slit-skin smear. The clinical diagnosis of early leprosy and PB leprosy can be a

challenge” (WHO, 2018b page xii:).”.

Em tradução livre:

“O diagnóstico da hanseníase permanece baseado na presença de pelo menos um de três sinais cardinais: (i) perda da sensibilidade em uma lesão de pele hipocrômica ou eritematosa; (ii) nervo periférico espessado com perda de sensibilidade e / ou fraqueza dos músculos supridos por esse nervo; ou (iii) presença de bacilos álcool-ácido resistentes em esfregaço de pele de raspado dérmico. O diagnóstico clínico das formas iniciais da hanseníase e dos casos PB pode ser um desafio” (WHO, 2018b page xii)”.

1.1.5.1 Clínico

Na prática clínica, esta definição de um caso de hanseníase muitas vezes não é suficiente para o diagnóstico daqueles pacientes que apresentam doença de evolução recente e dos paucibacilares, casos que de fato representam um desafio (WHO, 2018b) até para experientes dermatologistas de um centro de referência. Isto porque as máculas hipocrômicas e placas, presentes nestas formas da doença, são semelhantes às lesões de muitas outras dermatoses e os sinais cardinais descritos acima nem sempre podem ser observados.

O caderno de Atenção Básica do Ministério da Saúde orienta que o diagnóstico de hanseníase é essencialmente clínico e se baseia na identificação de lesões ou áreas de pele com alteração de sensibilidade e/ou comprometimento de nervos periféricos (sensitivo, motor e/ou autonômico). O exame dermatológico consiste na inspeção de toda a superfície corporal do paciente e realização de pesquisa de sensibilidade térmica, dolorosa e tátil nas lesões e/ou áreas suspeitas para verificar qualquer alteração. O profissional deverá orientar o paciente como os testes serão realizados, certificando-se de sua compreensão para que haja maior colaboração. Para avaliar a sensibilidade ao calor deve-se usar um tubo com água quente e fria, para a sensibilidade a dor, usar um alfinete e para a sensibilidade ao tato, um chumaço de algodão. A sensibilidade térmica é a mais precocemente alterada seguida da dolorosa e por último a tátil (Brasil, 2016).

Os testes para a avaliação da diminuição da sensibilidade são subjetivos, pois dependem da técnica do examinador e da colaboração e bom entendimento do paciente (Chen *et al.*, 2006; Van Brakel *et al.*, 1996). Além disso, dermatoses que cursam com placas muito infiltradas ou edemaciadas podem apresentar alguma alteração de

sensibilidade por compressão dos filetes nervosos sem que haja infecção pelo bacilo de Hansen. Neuropatias periféricas de qualquer etiologia também dificultam esta avaliação. Por outro lado, lesões cutâneas de hanseníase localizadas em regiões como a face e lesões recentes podem ter sensibilidade normal (Ustianowski e Lockwood, 2003). Assim, as alterações de sensibilidade devem ser cuidadosamente interpretadas.

Nos casos em que a pesquisa da sensibilidade é duvidosa outros testes que avaliam o comprometimento das ramificações nervosas podem ser realizados. Um deles é a prova da histamina que consiste em pingar uma gota desta substância na área de pele com lesão suspeita e em uma área de pele sã e em seguida fazer uma punção com uma agulha nestes locais. Na pele em que os filetes nervosos estão íntegros observa-se a tríplice reação de Lewis: o eritema primário no local da punção, o eritema reflexo secundário em torno dela e a formação da pápula. Nas lesões de hanseníase em que as ramificações estão comprometidas o eritema secundário está ausente. Este teste só deve ser realizado em máculas hipocrômicas já que avalia o eritema. O teste da pilocarpina é mais trabalhoso e avalia se a sudorese está normal ou se há anidrose característica das lesões de hanseníase (Talhari *et al.*, 2006).

O espessamento de nervos periféricos deve ser avaliado, mas a progressão da doença é lenta e por isso na fase inicial os nervos podem ainda apresentar espessura normal. Os principais nervos acometidos pela hanseníase são: o ramo zigomático do nervo facial e ramo oftálmico do nervo trigêmeo; nos membros superiores: ulnar, mediano e radial; nos membros inferiores: nervo fibular comum e tibial posterior (Brasil, 2016).

O exame neurológico compreende a inspeção, palpação, avaliação funcional (sensibilidade e força muscular) dos nervos.

Na palpação dos troncos nervosos periféricos deve ser observado se há queixa de dor espontânea no trajeto do nervo, queixa de choque ou dor à palpação, simetria da espessura (comparar sempre o lado direito com o esquerdo), a consistência (duro ou mole) e a presença de nódulos (Brasil, 2016).

Os olhos são acometidos na hanseníase em decorrência de episódios de reação reversa ou da resposta inflamatória desencadeada pela presença do bacilo nos nervos (Talhari *et al.*, 2006). As principais alterações encontradas são: lagoftalmo (que leva a exposição corneana), hipoestesia corneana, iridociclite e catarata. Assim o exame dos olhos deve incluir, além da acuidade visual, a avaliação da força nas pálpebras e a sensibilidade da córnea (Brasil, 2016).

A sensibilidade protetora das mãos e pés pode ser avaliada com o estesiômetro, monofilamentos de nylon com peso variando de 0,05 gr (verde) a 300 gr (vermelho). A ausência de resposta ao monofilamento lilás indica perda da sensibilidade protetora (2,0 gr) e pode ser comparada à ponta da caneta esferográfica. O grau de incapacidade é determinado após a avaliação de 6 áreas do corpo: os olhos, as mãos e os pés e varia de 0 a 2 (Quadro 1) (Brasil, 2016).

Grau	Características
0	Nenhum problema com os olhos, mãos e pés devido à hanseníase
1	Diminuição ou perda da sensibilidade nos olhos. Diminuição ou perda da sensibilidade nas mãos e /ou pés (não sente 2g ou toque da caneta).
2	Olhos: lagofalmo e/ou ectrópio; triquíase; opacidade corneana central; acuidade visual menor que 0,1 ou não conta dedos a 6 m. Mãos: lesões tróficas e/ou lesões traumáticas; garras; reabsorção; mão caída. Pés: lesões tróficas e/ou traumáticas; garras; reabsorção; pé caído; contratura do tornozelo.

Quadro 1: critérios de avaliação de grau de incapacidade e da função neural. Fonte: Brasil, 2016

O teste de Mitsuda (lepromina) consiste na injeção intradérmica de *M.leprae* mortos pelo calor. É considerado positivo se após 28 dias surgir uma pápula maior do que 5 cm de diâmetro no local da injeção. Reflete a habilidade de um indivíduo de desenvolver uma resposta imune celular ao bacilo, mas não necessariamente infecção ou doença. Não tem utilidade diagnóstica mas auxilia na classificação clínica da hanseníase (Azulay, 1997).

1.1.5.2. Laboratorial

Baciloscópico

A baciloscopia de raspado dérmico é usada para detectar bacilos resistentes ao ácido e álcool (BAAR) em esfregaços cutâneos coletados de locais padronizados (lesões de pele, lóbulos das orelhas, cotovelos). É realizada utilizando a técnica de coloração de Ziehl Neelsen, que consiste em colorir bacilos com fucsina. A carga bacilar é expressa como um índice baciloscópico (IB) que reflete o número de bacilos por campo microscópico em escala logarítmica que varia de 0 a 6+ (Quadro 2). O cálculo do IB é obtido através da média aritmética dos IBs de cada sítio analisado (Brasil, 2010b).

Índice Baciloscópico	Descrição da baciloscopia
0	Ausência de bacilos em 100 campos examinados.
1+	Presença de 1 a 10 bacilos, em 100 campos examinados
2+	Presença de 1 a 10 bacilos, em cada 10 campos examinados
3+	Presença de 1 a 10 bacilos, em média, em cada campo examinado
4+	Presença de 10 a 100 bacilos, em média, em cada campo examinado
5+	Presença de 100 a 1.000 bacilos, em média, em cada campo examinado
6+	Presença de mais de 1.000 bacilos, em média, em cada campo examinado

Quadro 2: Escala logarítmica de Ridley. Fonte: Brasil. Guia de procedimentos técnicos, Brasil, 2010b

O índice morfológico (IM) avalia se o bacilo é viável ou não e é representado pela porcentagem de bacilos intactos em relação ao número total de bacilos analisados no estudo. Os bacilos intactos são observados antes do tratamento ou em casos de doença recidivante. Os bacilos fragmentados, com lacunas, representam microrganismos não viáveis ou mortos e são observados em pacientes tratados (Brasil, 2010b). Na forma tuberculóide a baciloscopia é geralmente negativa e fortemente positiva na forma lepromatosa. Desta forma, um resultado negativo no exame de baciloscopia não afasta o diagnóstico da hanseníase paucibacilar.

Exame Histopatológico

Para o exame histopatológico, a biópsia deve ser colhida da borda da lesão e deve incluir a hipoderme e ser fixada em formol a 10%. A coloração pela hematoxilina-eosina deve ser complementada pela coloração Wade-Klingmuller ou Fite Faraco para identificar os bacilos. Nos casos em que os bacilos não são visualizados a invasão de filetes nervosos pelo infiltrado inflamatório é a alteração histopatológica que sugere o diagnóstico de hanseníase (Ridley e Jopling, 1966).

De acordo com os critérios estabelecidos por Ridley e Jopling, na hanseníase indeterminada observa-se infiltrado inflamatório inespecífico, em geral discreto, constituído por linfócitos e histiócitos não diferenciados. A localização perianexial e perineural sugere o diagnóstico de HI quando bacilos não são encontrados, mas nestes casos o laudo será de compatibilidade. Somente a visualização de bacilos permite o diagnóstico histopatológico de hanseníase. Eventualmente o exame pode sugerir uma evolução em direção a um dos pólos, apesar do aspecto clínico ainda indeterminado (Ridley e Jopling, 1966).

A forma tuberculóide (TT) se caracteriza pela presença de granulomas tuberculóides bem definidos, constituídos por macrófagos com diferenciação epitelióide e células gigantes multinucleadas de Langhans circundados por um halo linfocitário. Os granulomas estendem-se desde a derme profunda até a camada basal, sem área clara subepidérmica (banda de Unna) e pode haver atrofia ou erosão da epiderme. Na derme os filetes nervosos podem estar alargados, envolvidos ou destruídos pelo infiltrado inflamatório granulomatoso (Ridley e Jopling, 1966). As doenças que apresentam granulomas epitelióides e que mais interessam para o diagnóstico diferencial histológico são: sarcoidose, granuloma anular, leishmaniose, esporotricose, granuloma por corpo estranho (Talhari *et al.*, 2006), tuberculose cutânea e rosácea granulomatosa.

Na forma lepromatosa (LL) observa-se macrófagos na derme profunda e hipoderme formando células espumosas vacuoladas ricas em bacilos, que podem se apresentar isolados ou dispostos em globias. Os linfócitos são escassos e esparsos. A epiderme é plana e separada do infiltrado inflamatório por uma faixa de fibras de colágeno conhecida como banda de Unna, correspondendo à derme papilar retificada. Os filetes nervosos da derme mostram pequeno edema do perinervo ou estão normais. O índice baciloscópico pode variar de 5 a 6 +. Na variedade históide as lesões apresentam semelhanças clínicas e histopatológicas com dermatofibromas e são ricas em bacilos. As doenças de maior interesse para o diagnóstico diferencial são: xantomas, histiocitomas, linfomas e leishmaniose anérgica.

A diferença entre o extremo do espectro com maior resistência e outro com menor resistência baseia-se na indiferenciação progressiva dos macrófagos, na diminuição do número de linfócitos e no aumento do número de bacilos nos granulomas e ramos nervosos de TT para LL. O subgrupo *borderline*-tuberculóide (BT) pode ser distinguido da forma TT pela presença de zona subepidérmica livre e nervos um pouco menos agredidos e como nos casos TT os bacilos raramente são visualizados. O subgrupo BB mostra células epitelióides bem desenvolvidas dispersas pelos granulomas. Linfócitos e células gigantes são escassos. As fibras nervosas podem ser facilmente identificadas, exibindo moderada proliferação de células de Schwann. O IB varia de 3 a 4 +. O subgrupo *borderline*-lepromatous (BL) mostra macrófagos indiferenciados e poucos linfócitos ou, mais comumente, histiócitos com tendência à vacuolização e poucas alterações nas fibras nervosas. Há um grande número de bacilos (4 a 5 +) e não muitas globias. A zona subepidérmica livre é mantida (Ridley and Jopling, 1966).

Apesar desta já bem estabelecida descrição dos aspectos histológicos das formas clínicas da hanseníase, a histologia tem limitações particularmente para o diagnóstico dos casos PB e lesões recentes. (Binford, 1971; Ridley, 1974; Chacko, 1993, Reja *et al.*, 2013). Outros estudos demonstram que na prática, o diagnóstico dos casos paucibacilares e a classificação das diferentes formas da doença dependem diretamente da interpretação do patologista e discordâncias são frequentemente descritas (Fine *et al.*, 1986; Lockwood *et al.*, 2008; Barbieri *et al.*, 2014). Sendo assim, nos casos PB, em que os bacilos não são visualizados no tecido, o diagnóstico diferencial com outras doenças de pele dependerá da experiência do patologista.

Sorológico/Imunológico

O teste sorológico padronizado e melhor avaliado para o diagnóstico de hanseníase utiliza o glicolípido fenólico-I (PGL-1), um antígeno específico do *M. leprae* inicialmente descrito em 1980 (Brennan e Barrow, 1980). Atualmente é utilizado por meio do ensaio imunoenzimático (ELISA) e teste de fluxo lateral rápido (ML flow) (Bührer-Sékula, 2003).

A presença de anticorpos anti-PGL-1 reflete a carga bacilar e ajuda a classificar as formas clínicas, já que nos pacientes com formas MB os títulos de anticorpos são elevados enquanto os pacientes paucibacilares apresentam títulos baixos ou ausentes. O percentual de pacientes soropositivos para PGL-1 varia de 80-100% nos casos de LL e 30-60% nos casos de hanseníase TT (Patrus-Ananias *et al.*, 2002; Klatser *et al.*, 1994). Portanto, o valor diagnóstico do anti-PGL1 é limitado na hanseníase PB (Oskam, Slim e Bührer-Sekula, 2003). Níveis elevados deste anticorpo em hanseníase indeterminada parecem estar associados à evolução em direção ao polo lepromatoso (Verhagen *et al.*, 1999). Durante o tratamento com PQT, a persistência dos anticorpos anti-PGL-1 pode representar resistência à terapia e o aumento dos anticorpos em indivíduos tratados pode indicar recidiva (Chin-a-Lien *et al.*, 1992; Contin *et al.*, 2011). É importante lembrar que o antígeno PGL-1 não é solúvel em água e permanece nos tecidos por longo tempo. Sendo assim, a presença de anticorpos anti-PGL-1 nem sempre significa doença ativa podendo corresponder a infecção prévia (Cunanan, Chan e Douglas, 1998).

Em áreas altamente endêmicas, a distribuição da positividade de PGL-1 em casos de hanseníase é semelhante entre contatos domiciliares e não contatos, embora haja

uma diferença significativa entre estes grupos em áreas de baixa endemicidade (Douglas *et al.*, 2004). No entanto, não há um ponto de corte para os níveis de anti-PGL-1 que permita distinguir infectados de doentes (Fine, 1988). Assim, a investigação de anticorpos IgM contra PGL-1 não deve ser a única ferramenta de triagem populacional para detectar casos de hanseníase, mas indivíduos soropositivos devem ser acompanhados (Contin *et al.*, 2011; Cardona-Castro, Beltran-Alzate e Manrique-Hernandez, 2008).

Nos últimos anos, novos estudos têm retomado o foco para o diagnóstico baseado na resposta imune de células T medida pela produção de interferon gama (IFN- γ), um indicador indireto da imunidade celular protetora (Spencer *et al.*, 2005; Geluk *et al.*, 2005). Os pacientes PB que respondem com imunidade mediada por células, secretam altos níveis desta citocina após estimulação *in vitro* com antígenos específicos do *M. leprae*. Por outro lado, pacientes com hanseníase MB, que exibem uma resposta imunológica humoral, não produzem IFN *in vitro*. Um problema para o uso deste método no diagnóstico precoce e de casos PB é que a maioria dos contatos domiciliares, quando expostos continuamente a uma fonte infecciosa (caso índice não tratado), mostra um padrão semelhante de secreção de IFN- γ aos de pacientes PB (Martins *et al.*, 2012)

Diagnóstico molecular

Como descrito anteriormente, a baciloscopia e a histopatologia têm baixa sensibilidade no diagnóstico dos casos PB e dependem de técnicos treinados e patologistas experientes que nem sempre estão disponíveis. Os testes sorológicos e imunológicos apesar de mais automatizados não são capazes de diferenciar infecção de doença especialmente nos casos PB em áreas endêmicas.

A identificação do genoma do *M. leprae* e o aprimoramento da técnica da PCR têm trazido muitos avanços no conhecimento da hanseníase. Estudos têm demonstrado que a PCR pode auxiliar na distinção entre reinfecção e recidiva (Stefani *et al.*, 2017) na identificação de resistência aos medicamentos da PQT (Benjak *et al.*, 2018, Cambau *et al.*, 2018, Avanzi *et al.*, 2016) na melhor compreensão dos mecanismos de transmissão do *M. leprae* e principalmente no diagnóstico de casos com baixa carga bacilar como os casos iniciais de hanseníase, as formas PB e neural pura (Jardim *et al.*, 2005, Rodriguez *et al.*, 2013). Além disso, a detecção do DNA do *M. leprae* em amostras clínicas de contatos, potenciais fontes de transmissão do bacilo, também tem sido estudada com o

objetivo de determinar o risco de adoecimento neste grupo (Reis *et al.*, 2014, Arunagiri *et al.*, 2017).

Embora não haja ainda um teste molecular validado para o diagnóstico de hanseníase, nas duas últimas décadas as técnicas de PCR têm sido aprimoradas. Diferentes genes do *M. leprae* têm sido usadas como alvos, como os genes que codificam o antígeno de 36 kDa (Kampirapaq *et al.*, 1998), antígeno de 18 kDa (Scollard *et al.*, 1998), antígeno de 65 kDa (Plikaytis, Gelber e Shinnick, 1990), complexo 85 (Martinez *et al.*, 2006), 16S rDNA (Martinez *et al.*, 2009), e as sequências repetitivas (RLEP) (Adams *et al.*, 2012, Martinez *et al.*, 2011) entre outros. A tecnologia da PCR em tempo real (qPCR) melhorou a detecção e identificação de pequeno número de *M. leprae* em amostras clínicas, aumentando a sensibilidade e especificidade do método (Martinez *et al.*, 2006, Martinez *et al.*, 2009, Kramme *et al.*, 2004, Truman *et al.*, 2008). Com esta técnica é possível quantificar o conteúdo total de DNA e correlacioná-lo com a carga bacteriana, o que pode ser útil para determinar um índice bacteriológico molecular, ajudando a definir a forma clínica dos pacientes (Rudeeaneksin *et al.*, 2008, Kramme *et al.*, 2004).

A sensibilidade da técnica de qPCR para os PB varia de 50% a 90% considerando diferentes alvos gênicos em amostras de pele de pacientes com diagnóstico clínico e/ou histopatológico de hanseníase (Martinez *et al.*, 2014). Para o alvo 16S rRNA a sensibilidade da qPCR é de 51% e a especificidade é de 100% (Martinez *et al.*, 2011).

A amplificação do DNA do *M. leprae* pela PCR pode ser feita a partir de diferentes amostras clínicas incluindo raspado dérmico, fragmento de biópsia, sangue e outras. Para fins de diagnóstico, a análise da biópsia da pele tem sido considerada mais sensível, especialmente para amostras com baixa carga bacilar (Avanzi, 2018).

1.1.6 Tratamento

Desde o início da década de 80 a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda para o tratamento da hanseníase uma associação de antibióticos (rifampicina, dapsona e clofazimina), a poliquimioterapia – PQT (WHO, 1982), que foi introduzida no Brasil de forma gradual a partir de 1986 e passou a ser o único esquema de tratamento em 1991. A rifampicina é bactericida para o *M. leprae* enquanto a dapsona e clofazimina são bacteriostáticas

Na PQT, os esquemas terapêuticos são padronizados de acordo com a

classificação operacional. Para os casos PB, o tratamento consiste em 6 doses mensais administradas num período de até 9 meses, que inclui, para adultos, uma dose mensal supervisionada de 600 mg de rifampicina (RFM) e 100 mg de dapsona (DDS) e uma dose diária de DDS 100 mg. Os casos MB são tratados com 12 doses mensais administradas num período de até 18 meses, utilizando os mesmos medicamentos mencionados no regime anterior, mas adicionando a clofazimina (CFZ) em uma dose mensal supervisionada de 300 mg e uma dose diária auto administrada de 50 mg (Brasil, 2010). A PQT não é contraindicada durante a gravidez e amamentação (Brasil, 2016).

No caso de contraindicação a qualquer um dos medicamentos, ofloxacina e/ou minociclina podem ser usados como drogas alternativas. Em casos de reação tipo 1 acrescenta-se prednisona (1-1,5 mg / kg / dia) e em pacientes com reação tipo 2 talidomida (100-400 mg / dia). Os glicocorticóides são utilizados em mulheres com risco de engravidar devido ao potencial teratogênico da talidomida. Os corticoides são administrados também em conjunto com a talidomida sempre que houver acometimento dos nervos, olhos ou testículos, para se obter uma redução mais rápida do edema neural e da inflamação, evitando-se as incapacidades. A Pentoxifilina tem sido utilizada com algum sucesso no tratamento do ENH (Lastória e Abreu, 2014, Brasil, 2016).

Após o término do tratamento regular, os pacientes são considerados curados, independentemente da baciloscopia ser negativa ou não. As recidivas são raras e geralmente ocorrem após cinco anos. O surgimento de novas lesões, exacerbação das lesões antigas e/ou dor neural que não respondem à terapia com corticoides e/ou talidomida e o aumento do IB (comparado com o IB da alta) são critérios de recidiva (Brasil, 2016). A resistência às drogas usadas no tratamento de hanseníase, embora infrequente, tem sido observada nos países endêmicos (Matsuoka, 2015, Cambau, 2018). Nestes casos, recomenda-se o tratamento com pelo menos duas drogas de segunda linha (claritromicina, minociclina ou uma quinolona) (WHO, 2018b).

As últimas diretrizes da OMS (2018) recomendam um regime com os 3 medicamentos, rifampicina, dapsona e clofazimina, para todos os pacientes com hanseníase, mantendo a duração de tratamento de 6 meses para hanseníase PB e 12 meses para hanseníase MB. Isso representa uma mudança em relação ao tratamento padrão atual para a hanseníase PB descrito acima, que é feito somente com rifampicina e dapsona. As vantagens do uso dos mesmos três medicamentos para a hanseníase PB e MB é a simplificação operacional (ou seja, o mesmo blister poderá ser usado para tratar

todas as formas de hanseníase), além de minimizar as consequências de erros de classificação dos casos (tratamento de um caso MB como PB) já que todos os pacientes receberão os 3 medicamentos (WHO, 2018b).

Recentemente, os possíveis benefícios de um regime único de 6 meses com as 3 drogas para todas as formas clínicas da hanseníase tem sido estudado (Penna *et al.*, 2012; Shen *et al.*, 2012). A maior adesão ao tratamento, as facilidades operacionais e a menor frequência de efeitos colaterais aos medicamentos da PQT são os argumentos que apoiam esta mudança (Cruz *et al.*, 2018). Penna *et al.* (2012), em um estudo multicêntrico comparando o uso da PQT por 12 e 6 meses em pacientes MB não observou, nos primeiros 2 anos, nenhuma associação entre o surgimento de reações e a duração do tratamento, assim como no tipo de reação. Os pacientes foram acompanhados por até 3 anos e por isso não foi possível, segundo os autores, a avaliação de recidivas devido à sua baixa frequência e a necessidade de um seguimento longo. A reprodução do *M. leprae* é lenta e por isso é bem estabelecido que as recaídas ocorrem após 5 anos do final do tratamento e que frequentemente estão mais relacionadas à recidiva por falha terapêutica do que por resistência aos medicamentos (Cellona *et al.*, 2003; Fajardo *et al.*, 2009; Gelber, Balagon e Cellona, 2004). Até o momento, as diretrizes da OMS determinam que não há evidências suficientes para apoiar uma recomendação de encurtar a duração do tratamento para a hanseníase MB.

A taxa de recidiva é considerada um indicador importante da eficácia do esquema terapêutico. Por outro lado, a reinfecção é um indicador da transmissão ativa e da susceptibilidade de alguns pacientes para novas infecções. A diferenciação entre reação, recidiva (por tratamento inadequado ou resistência medicamentosa) e reinfecção é uma das questões cruciais no manejo dos pacientes de hanseníase pós tratamento com PQT. Nestes casos, nem sempre as evidências clínicas são suficientes para o diagnóstico diferencial e os métodos moleculares têm oferecido promissora contribuição. A demonstração da viabilidade do bacilo através da razão de RNA/DNA diferencia reação de recidiva (Martinez *et al.*, 2009). A caracterização de mutações genéticas relacionadas a resistência medicamentosa (Benjak *et al.*, 2018) e a análise do sequenciamento completo do genoma do bacilo podem distinguir recidiva de reinfecção por outra cepa de *M. leprae* (Stefani *et al.*, 2017).

1.1.7 Prevenção e controle

Todos os pacientes de hanseníase são considerados fontes de infecção, com diferentes graus de infectividade e por isso para o controle da doença é necessário detecção precoce e tratamento de todos os casos visando interromper a transmissão do bacilo (Steinmann *et al.*, 2017).

Nas últimas décadas, com o objetivo de alcançar a meta de controle, muitas foram as estratégias estabelecidas pela OMS e pelo Ministério da Saúde do Brasil. A mudança mais ampla ocorrida neste período, além da instituição da PQT, foi a integração do manejo da hanseníase aos serviços primários de saúde (Penna *et al.*, 2008). Esta estratégia surgiu a partir da percepção de que a eliminação só poderia ser alcançada se houvesse uma ampliação na cobertura dos serviços de hanseníase (Neira e Daumerie, 2000).

No Brasil o controle da doença era de responsabilidade do nível federal de saúde e a descentralização ocorreu após o estabelecimento, em 1989, do Sistema Único de Saúde (SUS), seguido em 1994 do Programa de Saúde da Família (PSF), política nacional de atenção básica para substituir o modelo tradicional, vertical, de assistência baseada em profissionais médicos especialistas (Brasil, 1996). No contexto do modelo tradicional o diagnóstico diferencial entre hanseníase e outras doenças cutâneas era mais preciso, já que os pacientes eram atendidos por dermatologistas. Por outro lado, o atraso na chegada do paciente ao nível secundário ou terciário de assistência, em que o atendimento vertical era exercido, dificultava o diagnóstico precoce (Feenstra, 1993).

As vantagens atribuídas à integração do manejo da hanseníase são muitas, como a melhoria do acesso da população aos serviços de saúde, a diminuição dos custos em relação ao modelo vertical, a maior adesão ao tratamento e a conscientização da comunidade em relação aos sintomas da doença (Pimentel *et al.*, 2004; Lockwood *et al.*, 2005; Visschedijk *et al.*, 2003). Além disso, os serviços verticais contribuíam para a manutenção do estigma relacionado à hanseníase (Arole *et al.*, 2002). Através da integração, a hanseníase pode ser tratada no mesmo serviço de saúde que qualquer outra doença.

Há um consenso de que o grupo com maior risco de desenvolver hanseníase é o de contatos domiciliares de doentes sem tratamento (van Beers, Hatta e Klatser, 1999; Noordeen, 1993). Este risco está relacionado, entre outros fatores, à duração e a proximidade do contato com o caso índice, consanguinidade e a alta carga bacilar do

caso índice (Moet *et al.*, 2004; Bakker *et al.*, 2006; Sales *et al.*, 2011). Tem sido demonstrado que a boa vigilância dos contatos dos pacientes aumenta a taxa de detecção de apresentações clínicas menos graves com menores índices bacteriológicos (Hacker *et al.*, 2012; Ezenduka *et al.*, 2012). Portanto, a busca ativa de novos casos entre os contatos é um modo efetivo de reduzir a transmissão e o surgimento de deformidades incapacitantes (Smith CS *et al.*, 2014; Smith e Aerts, 2015). Assim, as normas brasileiras recomendam o exame físico de todos os contatos como uma medida profilática importante.

Em 2016, o Ministério da Saúde através das Diretrizes para vigilância, atenção e eliminação da hanseníase como problema de saúde pública ampliou o conceito de comunicante. Atualmente, considera-se contato domiciliar toda e qualquer pessoa que resida ou tenha residido com o doente de hanseníase e contato social qualquer pessoa que conviva ou tenha convivido de forma próxima e prolongada com o doente (vizinhos, colegas de trabalhos, de escola). Recomenda-se que, após o exame clínico, o contato sadio seja liberado com orientações sobre a doença e preconiza a administração intradérmica de uma dose da vacina BCG seguindo os seguintes critérios: na ausência de cicatriz ou na presença de uma cicatriz, faz-se uma dose de BCG e se houver duas cicatrizes, não aplicar BCG (Brasil, 2016).

A imunoprofilaxia com aplicação intradérmica da vacina BCG tem sido considerada uma importante medida preventiva já que os indivíduos que recebem a vacina apresentam proteção significativa contra a doença (Brasil, 2016). Estudos demonstraram que o efeito protetor da vacina é maior quando aplicada nos primeiros anos de vida (Fine, 1988) e que a revacinação dos contatos (contato com uma cicatriz BCG) confere proteção adicional (Duppre *et al.*, 2008). Estes autores mostram que a proteção conferida pela BCG (independente se uma ou duas doses) contra todas as formas da doença é de 56% (IC95%=31-71) e contra as formas MB de 85% (IC95%=49-96).

Em relação a quimioprofilaxia, um estudo controlado randomizado (COLEP) demonstrou que com o tratamento profilático dos contatos com dose única de Rifampicina há uma redução de 57% no risco de desenvolver hanseníase após 2 anos e de 30% após 5 a 6 anos (Feenstra *et al.* 2012). Baseado nestes resultados, as diretrizes da OMS de 2018 recomendam o uso de dose única de Rifampicina como tratamento preventivo para contatos adultos e crianças (maiores de 2 anos) que não tenham

contraindicações para o uso desta medicação e que não sejam portadores de hanseníase ou tuberculose pulmonar (WHO, 2018b).

Na tentativa de identificar os contatos com maior chance de adoecer, testes sorológicos para a dosagem de anticorpos anti PGL-1 têm sido usados (Duppre *et al.*, 2012), mas mostram baixa sensibilidade e especificidade, principalmente em áreas endêmicas, e por isso não devem ser utilizados como único parâmetro (Oskam, Slim e Buhrer-Sekula, 2003; Penna *et al.*, 2016).

Estudos usando técnicas moleculares para a identificação do *M. leprae* na secreção nasal de contatos de pacientes com hanseníase têm sido realizadas, mas os autores concordam que a presença do bacilo nas mucosas não caracteriza obrigatoriamente infecção pois estes indivíduos podem ser carreadores saudáveis do bacilo (Martins *et al.*, 2010; Almeida *et al.*, 2004).

Um método laboratorial que seja capaz de detectar infecção subclínica e portanto apontar com maior precisão os contatos candidatos à profilaxia com rifampicina é uma das questões importantes atualmente no controle da doença pois diminuiria o custo e o risco de efeitos colaterais do uso de rifampicina em todos os contatos. A PCR usada para a identificação de material genético do bacilo no raspado dérmico dos lóbulos auriculares de contatos assintomáticos desponta como uma ferramenta útil para a detecção de infecção subclínica e, conseqüentemente, para a orientação mais precisa da quimioprofilaxia (Martinez, 2014).

2 JUSTIFICATIVA

Apesar dos intensos esforços para eliminar a hanseníase como um problema de saúde pública a incidência de casos novos nos países endêmicos tem diminuído menos do que o esperado. Esta estabilização é uma indicação de transmissão ativa e deixa evidente que somente o tratamento com PQT não tem sido suficiente para conter a epidemia. Os doentes não tratados de qualquer forma de hanseníase representam potencial fonte de infecção e alguns autores acreditam que os contatos destes casos também podem estar envolvidos na manutenção da transmissão.

A estratégia de descentralização do programa de hanseníase e a integração do tratamento da doença à atenção básica teve como objetivo facilitar o acesso da população aos serviços de saúde, aumentando a chance de detectar e tratar novos casos e de melhorar o monitoramento dos contatos. Entretanto, quanto mais cedo os casos suspeitos de hanseníase chegam aos serviços de saúde maior o desafio diagnóstico. Isto porque no estágio inicial e nas formas paucibacilares as manifestações clínicas da doença são mais discretas. As máculas e placas, lesões elementares da hanseníase paucibacilar, estão presentes também em muitas outras dermatoses. Somado a isso, nos casos de evolução recente a alteração de sensibilidade nas lesões pode não ser evidente, a baixa carga bacilar impossibilita a identificação de *M. leprae* no raspado dérmico e no exame histopatológico as alterações teciduais típicas nem sempre estão presentes. Deste modo, estes casos podem representar um desafio diagnóstico mesmo para especialistas de centros de referência. Diante da percepção de que a demanda dos casos referenciados ao ambulatório da Fiocruz tem mudado nos últimos anos a análise do perfil destes pacientes se faz necessário. Além disso, para alcançar a meta de controle da epidemia é importante garantir o diagnóstico mais preciso possível dos casos com lesões suspeitas. Deste modo, o estudo de testes laboratoriais que auxiliem o diagnóstico dos casos difíceis de hanseníase e que sejam capazes de identificar os contatos com maior risco de adoecimento é fundamental.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estabelecer o papel da reação em cadeia da polimerase como ferramenta para auxiliar o diagnóstico da hanseníase e monitoramento de contatos no contexto da política de descentralização do programa de hanseníase.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Estudo 1: Impacto de um centro de referência no controle da hanseníase no contexto da política de descentralização do Sistema de Saúde Pública no Brasil

- Analisar o perfil dos casos suspeitos de hanseníase encaminhados ao centro de referência da Fiocruz no contexto da política de integração do diagnóstico e tratamento da hanseníase as unidades básicas de saúde.

3.2.2 Estudo 2: qPCR no diagnóstico da hanseníase paucibacilar - um estudo de follow up

- Avaliar o papel da qPCR no diagnóstico das formas paucibacilares da hanseníase após acompanhamento da evolução clínica de casos suspeitos.

3.2.3 Estudo 3: qPCR no monitoramento e no de diagnóstico dos contatos de pacientes com hanseníase.

- Demonstrar o papel da PCR na identificação dos contatos de pacientes com hanseníase com maior risco de adoecimento.

4 MÉTODOS

Esta Tese está apresentada sob a forma de três artigos inter-relacionados que respondem aos 3 objetivos específicos deste estudo e que substituirão os capítulos métodos e resultados.

4.1 Artigo 1: Impact of a Reference Center on Leprosy Control under a Decentralized Public Health Care Policy in Brazil

Impacto de um centro de referência no controle da hanseníase no contexto da política de descentralização do Sistema de Saúde Pública no Brasil

Publicado na Plos Neglected Tropical Diseases em 2016

O primeiro artigo é um estudo observacional retrospectivo, baseado em informações coletadas do banco de dados do Laboratório de Hanseníase da Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Um total de 1.845 casos suspeitos de hanseníase examinados no centro de referência entre 2010 e 2014 foram incluídos. A frequência dos casos atendidos com diagnóstico de outras dermatoses e de hanseníase foram calculadas. Os dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes com diagnóstico de hanseníase foram analisados.

Além disso, comparamos os dados do período de 2005 a 2009 com os de 2010–2014 utilizando o banco de dados do laboratório de hanseníase e do SINAN (Sistema Nacional de Informação de Doenças). As médias das porcentagens foram calculadas para as seguintes variáveis: o número anual de novos casos de hanseníase do ambulatório da Fiocruz, na Cidade e no Estado do Rio de Janeiro; a proporção anual de novos casos de hanseníase e de outras dermatoses do laboratório de hanseníase da Fiocruz; a porcentagem anual do número de serviços de saúde visitados antes dos encaminhamentos à Fiocruz.

4.2 Artigo 2: Quantitative polymerase chain reaction in paucibacillary leprosy diagnosis: a follow-up study

Reação em cadeia da polymerase no diagnóstico da hanseníase paucibacilar: um estudo de *follow up*

Aceito para publicação na Plos Neglected Tropical Diseases em Janeiro de 2019.

Neste artigo cento e setenta e dois casos com lesões cutâneas suspeitas de hanseníase paucibacilar atendidos no ambulatório Souza Araújo no período de 2012-2016 foram incluídos. Os pacientes foram avaliados por um dermatologista em três momentos diferentes. Na primeira visita foi realizado o exame dermatoneurológico e as amostras de raspado dérmico e biópsia de pele para histologia e PCR foram coletadas. Na segunda visita, os resultados do exame histopatológico e do PCR foram analisados e a conduta clínica foi tomada: i) tratamento com PQT para os casos com diagnóstico de hanseníase; ii) tratamento para outras dermatoses nos casos com outras doenças de pele; iii) observação nos casos inconclusivos. Na terceira visita, um ano depois, os pacientes foram reexaminados para a avaliação da evolução das lesões e um consenso diagnóstico foi estabelecido. Este consenso diagnóstico foi usado como padrão de referência para o cálculo da sensibilidade, especificidade e acurácia da qPCR no diagnóstico das formas PB da hanseníase.

4.3 Artigo 3: Quantitative PCR for leprosy monitoring and diagnosis among household contacts

Reação em cadeia da polimerase para monitoramento e diagnóstico dos contatos de pacientes com hanseníase

No terceiro artigo foram incluídos os contatos de pacientes com hanseníase que concordaram em colher raspado dérmico para a PCR durante a consulta de vigilância no período de 2011-2014. Estes contatos foram acompanhados até 2017 para avaliação da progressão para doença e a associação com o resultado da qPCR. Os contatos que apresentavam lesão cutânea suspeita de hanseníase na consulta de vigilância ou no seguimento foram submetidos à biópsia cutânea para esclarecimento diagnóstico. O risco de adoecimento entre os contatos que não apresentavam lesão suspeita na consulta de vigilância (incidentes) foi calculado, assim como a sensibilidade da qPCR de biópsia no diagnóstico dos contatos que apresentam lesão suspeita na primeira consulta de vigilância (co-prevalentes).

5 RESULTADOS

5.1 Artigo 1

Impact of a Reference Center on Leprosy Control under a Decentralized Public Health Care Policy in Brazil

Impacto de um centro de referência no controle da hanseníase no contexto da política de descentralização do sistema de saúde pública no Brasil

Publicado na Plos Neglected Tropical 10(10): e0005059.
doi:10.1371/journal.pntd.0005059 em Outubro de 2016

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5061346/>

Impact of a Reference Center on Leprosy Control under a Decentralized Public Health Care Policy in Brazil

Raquel Rodrigues Barbieri*, Anna Maria Sales, Mariana Andrea Hacker, José Augusto da Costa Nery, Nádia Cristina Duppre, Alice de Miranda Machado, Milton Ozório Moraes, Euzenir Nunes Sarno

Laboratório de Hanseníase, Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

* rbarbi@gmail.com



CrossMark
click for updates

OPEN ACCESS

Citation: Barbieri RR, Sales AM, Hacker MA, Nery JAdC, Duppre NC, Machado AdM, et al. (2016) Impact of a Reference Center on Leprosy Control under a Decentralized Public Health Care Policy in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 10(10): e0005059. doi:10.1371/journal.pntd.0005059

Editor: Christian Johnson, Fondation Raoul Follereau, FRANCE

Received: June 2, 2016

Accepted: September 20, 2016

Published: October 12, 2016

Copyright: © 2016 Barbieri et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by Fiocruz, Brazilian Ministry of Health, CNPq (Brazilian Research Council) and Capes. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Reorientation of the public health policies in Brazil over the last 20 years in association with a stable rate of new-case detection prompted the establishment of a decentralized leprosy control strategy. The aim was to move from a vertical model associated with general dermatological services to one in which the diagnosis and treatment of the disease would be integrated into the primary care level of the national health care facilities. Once patients demand for leprosy reference centers began to be affected by the process of integrating leprosy diagnosis into the basic health care services, it was necessary to determine the profile of all our referrals in light of the new decentralization policy.

Objective

We evaluated the profile of patients referred to the Fiocruz Outpatient Clinic, a reference center for the diagnosis and treatment of leprosy in Rio de Janeiro, RJ, and analyzed the origins and outcomes of these referrals.

Methods

This is an observational retrospective study based on information collected from the Leprosy Laboratory database at Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. A total of 1,845 suspected leprosy cases examined at the reference center between 2010 and 2014 were included. The originating health service referrals and diagnostic outcomes were analyzed as well as the clinical and epidemiological data of patients diagnosed with leprosy.

Result

Our data show that the profile of the patients treated at the Clinic has changed in recent years. There was an increase in both the proportion of patients with other skin diseases and those who had visited only one health service prior to our Clinic. Among the total 1,845 cases analyzed, the outcomes of 1,380 were linked to other diseases and, in 74% of these cases, a biopsy was not necessary to reach a diagnostic conclusion. A decrease in new

leprosy case detection among our patients was also observed. Yet, among the leprosy patients, 40% had some degree of disability at diagnosis.

Conclusion

The results of the present study demonstrated the importance of referral centers in support of basic health services within the decentralization strategy. But, the success of the program depends on the advent of new developmental tools to augment diagnostic accuracy for leprosy. However, it should be emphasized that for new diagnostic methods to be developed, a greater commitment on the part of the health care system regarding research is urgently needed.

Author Summary

Leprosy, a neglected disease, remains endemic in some developing countries despite the existence of a successful program to treat and cure patients. While there has been a drastic decrease in the number of patients, we still have a stable number of new cases that is still very high in countries like India and Brazil in which more than 30,000 new cases were observed in 2014. Over the past ten years, Brazil has changed the strategies regarding public health so that leprosy diagnostic, treatment and surveillance functions would predominantly be performed in primary care health units. The decentralization of leprosy diagnosis and treatment was expected to impact early cases detection and contribute to decrease in the number of cases with nerve damage. We analyzed and compared the demand of patient referrals to the Fiocruz Outpatient Clinic, a reference center for the diagnosis and treatment of leprosy in Rio de Janeiro, RJ, Brazil, prior and subsequent to the implementation of the decentralization strategy. Our results indicated that the profile of patients treated at the Fiocruz Clinic changed after the diagnosis and treatment of leprosy was integrated into the primary health services. There was an increase in the proportion of patients with other skin diseases. At the same time, 40% of the patients with leprosy had a higher disability grade at diagnosis, indicating late diagnosis. The initial presentation of leprosy may be a discrete skin or neural lesion, representing a challenge even for trained dermatologists. These results are probably the consequence of difficulties encountered in diagnosing leprosy in the primary health units without specialized health professionals or adequate laboratory tests. Although decentralization strategies have several advantages integrating the diagnosis of leprosy into basic health care units, the support of referral centers in diagnosing complex cases, managing difficult reactional episodes, and treating of side effects is central to the control of the epidemic.

Introduction

In 1991, the World Health Organization (WHO) adopted the goal of eliminating leprosy as a public health issue worldwide by the year 2000. Elimination was defined as achieving a prevalence rate of lower than 1/10,000 inhabitants [1]. The widespread implementation of the multi-drug therapy (MDT) program has been a success, resulting in a substantial reduction in global prevalence. Nonetheless, new case detection rates have not decreased as rapidly as expected in certain countries, especially in Brazil, India, and Indonesia, which have remained endemic. In

2014, 213,899 new leprosy cases were detected around the world while, in the Americas, new

cases numbered 33,789, 94% of which were in Brazil [2]. Concurrently in the same year, the detection rate in the State of Rio de Janeiro was 7.36/100,000 inhabitants [3].

Since the advent of the reform within the Brazilian Health System in 1989 and, with it, the initial implementation of the family health strategy, the prevention, diagnosis and treatment of diseases, including leprosy, were moved to the primary care level [4]. Within this system containing an extensive network of health facilities and recognized that the rate of leprosy new case detection has basically not wavered over the last 20 years, it was decided to decentralize leprosy control strategies throughout the country. There was a shift from a vertical model associated with general dermatological services to one in which the diagnosis and treatment of the disease would be integrated into the primary care level facilities. By 2009, the State of Rio de Janeiro had implemented the new strategy in 40% of all its municipal primary health care services [5]. At present, the City of Rio de Janeiro has 147 basic health care that follow the family health model and 59 that are specialized in the traditional sense.

In this context, leprosy reference centers continued to be primarily responsible for diagnosing complex cases, managing difficult reactional episodes, treating the side effects of MDT, evaluating relapse cases and developing research projects [6]. However, once patient demand for leprosy reference centers was affected, in any way, by integrating leprosy diagnosis into basic health care services, it was necessary to determine the pattern of all these referrals in the light of the new decentralization policy.

Previous studies have focused on the consequences of decentralization on the indicators used to evaluate leprosy control, i.e., the proportion of MB patients, new cases under the age of 15, patients diagnosed with physical disabilities as well as on the clinical and epidemiological profiles of leprosy patients [7] [8]. In this study, we decided to investigate the origins and outcomes of suspected leprosy patient referrals to the Fiocruz Outpatient Clinic, a reference center for the diagnosis and treatment of leprosy in Brazil, after the implementation of the decentralization policy.

Methods

The present study is an observational retrospective study of the information gathered from the Leprosy Outpatient Clinic database at Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), a reference center for the diagnosis and treatment of leprosy located in the City of Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Patients referred to the Fiocruz Clinic for diagnostic confirmation from January 2010 thru December 2014 were included from the moment we began registering the origin of these referrals in our database. All suspected cases of leprosy who arrived at the Clinic from both public and private health services were included. Likewise, all patients who arrived spontaneously along with the household contacts of new leprosy cases that had some skin or neurological suspicious lesions became participants. Conversely, those who attended at the Clinic for therapeutic management and not for diagnosis (e.g. control of reactions, suspicion of recurrence) and those who abandoned the study prior to receiving a diagnostic conclusion were excluded. The sample under study consisted of 1,845 cases.

The Fiocruz Outpatient Clinic serves individuals from the metropolitan area of the City of Rio de Janeiro as well as other cities in the State. Patients are referred to the Clinic by both public and private health care services, arrive spontaneously, or are household contacts of a leprosy case with suspected skin or neurological lesions.

For diagnostic purposes, patients are routinely undergo dermato-neurological evaluation, skin smears, skin biopsies for histopathological analysis [9] and, if necessary, polymerase chain reaction is performed [10]. Those diagnosed with leprosy are treated and followed up at the

Fiocruz Clinic or referred to the original service for treatment. Those diagnosed with other der-

matoses or neuropathies are sent to referral services for these specific diseases. Socio-economic, clinical, and epidemiological information, laboratory parameters, and case outcomes are recorded onto a database.

For the present study, the use of these data was approved by the Ethics in Research Committee of the Oswaldo Cruz Foundation number 976.330–10/03/2015.

The variables analyzed in this study were: i) age, sex, place of residence, originating health service (public, private or spontaneous demand), and number of health services the patient consulted before coming to our Clinic (1, 2, 3 or more); ii) clinical diagnosis without a biopsy: leprosy or other disease (OD); iii) histopathological diagnosis: leprosy or other disease; iv) the presence or absence of disability at leprosy diagnosis; and v) patient destination after outcome: continuation at the Fiocruz Clinic, return to the originating service, or referral to another health care service. These clinical and epidemiological aspects of patient referrals during 2010–2014 are presented in the tables; and bivariate analysis were conducted for categorical variables using the chi square test.

Also, in the present study, data during 2005–2014 were analyzed and compared with the 2010–2014. We retrieved data from the official leprosy case data reported by the City and State of Rio de Janeiro obtained at the SINAN (the National Disease Information System) database. We used the following variables: the annual number of new leprosy cases at the Fiocruz Outpatient Clinic and in the City and State of Rio de Janeiro; the annual proportion of newly-diagnosed leprosy cases compared to other diseases at Fiocruz Clinic; the annual percentage of the number of health services visited prior to Fiocruz referrals. Means were calculated to compare the 2005–2009 and 2010–2014 periods.

The statistical analysis was performed using SPSS version 22 software.

Results

Descriptive analysis

The leprosy data regarding both the City and State of Rio de Janeiro reveal an accentuated decline in the number of new leprosy cases between 2005 and 2014, the same being true for the Fiocruz Clinic, as seen in [Fig 1](#). The reduction in the mean of cases between 2010–2014 as compared to 2005–2009 was 51% and 34% in the City and State respectively, while at the Fiocruz Clinic, the decline was lower, 27% ([Fig 1](#)).

Analysis of total patient demand at the Fiocruz Clinic (new leprosy cases plus those with other skin diseases) showed that the mean proportion of leprosy patients seen at the Fiocruz Clinic between 2005 and 2009 was 28% while the mean proportion of patients with other dermatoses in the same period was 47%. During the 2010–2014, there was an increase of 16% in the proportion of patients with other skin diseases (mean proportion = 55%) compared to the previous period and a proportional decrease of approximately 33% among patients with leprosy (mean proportion = 18%) ($p < 0.001$) ([Fig 2](#)).

Observing that the trend in our Clinic had shifted during 2010–2014 in comparison to 2005–2009, it was decided to evaluate how many health care services had been consulted by these patients before being referred to the Fiocruz Clinic, whose results are showed in [Fig 3](#). The mean proportion of patients who visit only one clinic prior their Fiocruz referral was 20% during 2005–2009 while in the 2010–2014 time period this mean was double (40%) ([Fig 3](#)).

Analyses of the clinical and epidemiological aspects of patients seen after 2010 showed that, of the 1,845 cases evaluated, 1,380 (75%) had other dermatoses or neuropathies and, in 74% of these cases, biopsies were not taken because a leprosy diagnosis could be excluded after a neuro-dermatological evaluation. Only 25% (465) of the cases evaluated at our Clinic for

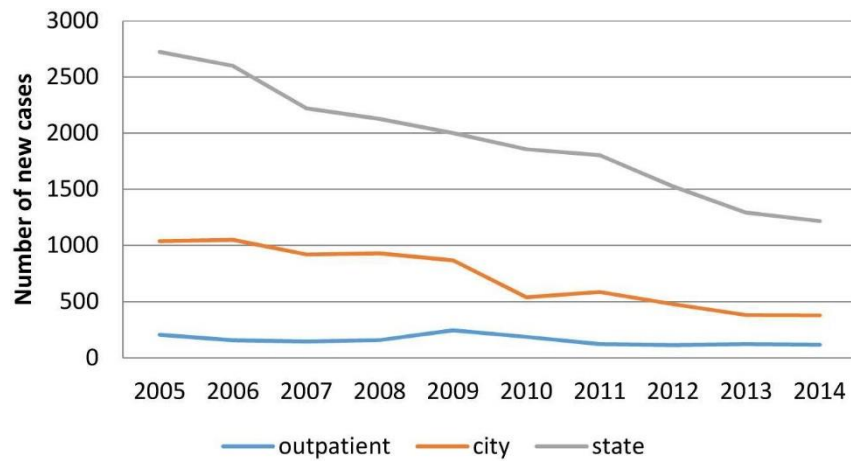


Fig 1. Annual number of new leprosy cases, 2005–2014. Cases diagnosed at the Fiocruz Outpatient Clinic, in City and State of Rio de Janeiro between 2005 and 2014.
doi:10.1371/journal.pntd.0005059.g001

suspected leprosy had a confirmed diagnosis of leprosy. Fifty-one per cent (375) of all the biop-

sied were diagnosed with leprosy and 49% (359), with other dermatoses (Table 1).

Analyzing the association between original referral service and outcome, there was no difference in the positive leprosy outcome between public and private health services referral source (Table 2). Regarding suspected cases of leprosy who spontaneously arrived at Fiocruz Outpatient Clinic, a significant association with the diagnosis of other diseases was observed. Among these, only 30 (11.3%) were found to have leprosy (Table 2).

Table 3 presents the clinical and epidemiological characteristics of cases of confirmed leprosy diagnoses. The majority of patients (70.1%) were between 15 and 59 years of age and 21.6% were over 60. Male patients predominated representing 59% in our cohort. Considering the operational classification, there was a slight difference between the proportion of paucibacillary (PB) versus multibacillary (MB) patients (49% and 51%, respectively) in this study. The disability grade (DG) of two-hundred-and-sixty-two confirmed leprosy patients were

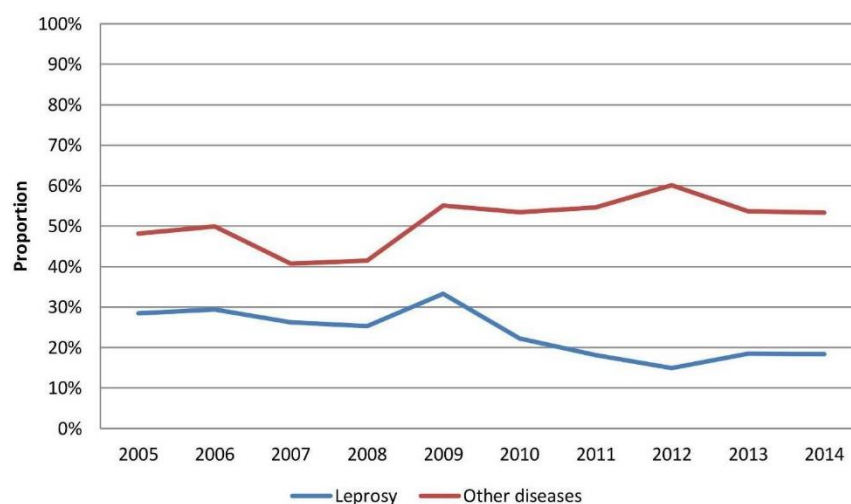


Fig 2. Annual proportion of newly-diagnosed leprosy cases compared to other diseases at the Fiocruz Outpatient Clinic, from 2005 to 2014.
doi:10.1371/journal.pntd.0005059.g002

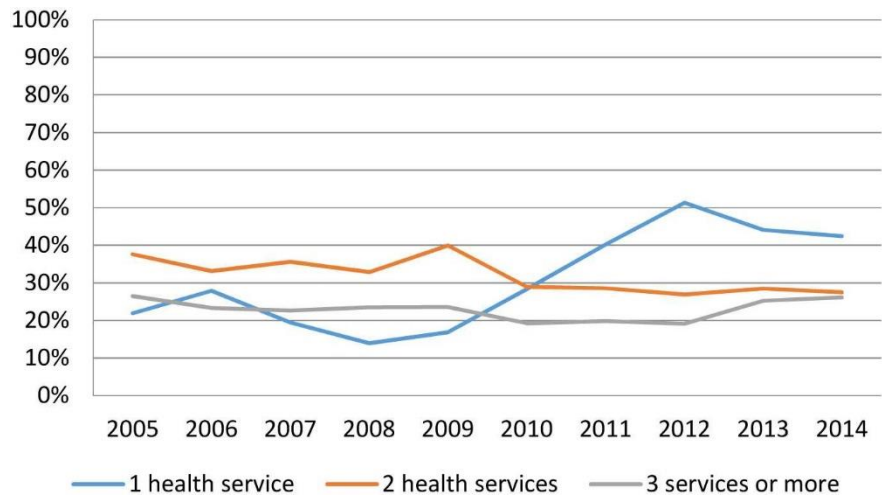


Fig 3. Annual proportion of number of health services prior to patients being referred to the Fiocruz Outpatient Clinic from 2005 to 2014.

doi:10.1371/journal.pntd.0005059.g003

registered in the database: 14% had grade 2 of disability and 40% had some degree of disability

at diagnosis. There was no statistical significance between the presence of physical disabilities and whether the referrals came from public or private health care facilities. Sixty-nine percent of the diagnosed leprosy patients were treated and followed up at Fiocruz Outpatient Clinic (320/465) (Table 3).

Discussion

The results of the present study provide strong evidence that the profile of the patients diagnosed and treated at the Fiocruz Outpatient Clinic have changed in the past 5 years possibly as a result of the public policy shift towards decentralization. The proportion of patients with other skin diseases and those who visited only one health service before our Clinic increased. It is noteworthy that, in 74% of the cases with other diseases, a biopsy was not necessary for diagnosis indicating that general practitioners in the primary care facilities could not distinguish easily diagnosed skin diseases (other than leprosy). After dermatological examination by a specialist at our clinic, the diagnoses of other dermatoses were clearly defined, and were more often eczematous diseases, psoriasis, superficial mycoses or dyschromia (S1 Table).

Nevertheless, a decrease in new leprosy case was not only detected in our Clinic but was also observed in the City and State of Rio de Janeiro. Smith et al. have suggested the possibility that the global decline in case detection in conjunction with the rise in disabilities may be linked to the move from vertical leprosy control activities to integrated approaches [11]. On the other hand, some authors have indicated that the impact of decentralizing policies have pointed to such major gains as reduced prevalence rates, an increase in early detection, and maintenance of the quality of care [12] [13]. Others studies have emphasized the importance of the ability of

Table 1. Evaluated cases of leprosy and other diseases with and without biopsies at the Fiocruz Outpatient Clinic from 2010 to 2014.

Outcome	With biopsy	Without biopsy	Total	p
Leprosy	375 (80%)	90 (20%)	465	
Other diseases	359 (26%)	1,021 (74%)	1,380	<0.001
Total	734	1,111	1,845	

doi:10.1371/journal.pntd.0005059.t001

Table 2. Association between the origin and outcomes of cases referred to Fiocruz Outpatient Clinic from 2010 to 2014.

Origin	Leprosy	Other diseases	Total	P
Public health services	300 (26.8%)	817 (73.2%)	1,117	< 0.001
Private health services	123 (28.2%)	313 (71.8%)	436	
Spontaneous demand	30 (11.3%)	236 (88.7%)	266	
Total	453*	1,366**	1,819	

*453/465

**1,366/1,380

doi:10.1371/journal.pntd.0005059.t002

trained dermatologists to accurately diagnose the disease, suggesting that the greater the suc-

cess in reducing the disease burden, more important is the role of the specialist with knowledge of the disease and its differential diagnoses [14] [15].

Regarding the epidemiological and clinical aspects of the leprosy cases diagnosed at Fiocruz Outpatient Clinic from 2010 to 2014 there were no important differences concerning age and gender between our results and the proportions recorded in Brazil in 2014. Considering the operational classification, there was a slight difference between the proportion of PB and MB patients (49% and 51%, respectively), while last year, new cases detected in the country was 66% MB [2]. This result may be biased, however, since the differential diagnosis of paucibacillary (PB) leprosy with other dermatoses is often more difficult to achieve than the diagnosis of multibacillary (MB).

Table 3. Epidemiological and clinical aspects of leprosy cases diagnosed at Fiocruz Outpatient Clinic from 2010 to 2014.

Epidemio-clinical variables		n	%
Age (year)	>15	38	8.3
	15–29	65	14.2
	30–44	126	27.5
	45–59	130	28.4
	>60	99	21.6
Total		458*	100
Gender	Female	170	41
	Male	243	59
Total		413**	100
Classification	Paucibacillary	227	49
	Multibacillary	236	51
Total		465	100
Disability Grade	0	158	60.3
	1	67	25.6
	2	37	14.1
Total		262***	100
Destination	Outpatient Clinic	320	69
	Other services	145	31
Total		465	100

* 7 missing

** 52 missing

*** 203 missing

doi:10.1371/journal.pntd.0005059.t003

Among the leprosy patients, considered in the present study, 40% had some degree of dis-

ability at diagnosis. In Brazil, within the leprosy new cases diagnosed in 2014, the percentage of grade 2 disabilities was 6.56% [2]. Both the City and State of Rio de Janeiro have registered rising percentages of this indicator. In fact, the latest five-year averages were 10% and 10.5%, respectively [3]. The Ministry of Health deems a grade 2 disability 10% high [16]. It is possible that the fact that this study was carried out in a reference center specialized in the treatment of leprosy had an impact on their result due to a selection and measurement biases. However a previous analysis of leprosy patients also treated at the Fiocruz reference center between 2003 and 2007 showed that 12.2% had grade 2 disability and that 32.5% had some degree of disability at diagnosis at that time [17]. These data strongly indicate that the referrals to the Outpatient Clinic of this reference center were, in actuality, delayed, which is particularly surprising in a State with a large number of units and health professionals. On the other hand, this delay may more accurately reflect the difficulties involved in diagnosing leprosy in the primary care health units in the absence of specialized health professionals or laboratory tests to aid in diagnosing the disease, especially since the initial presentation of leprosy may be a slight injury of nerve or a discreet and asymptomatic skin lesion, which would further complicate early diagnosis.

One of the advantages attributed to the integration of leprosy diagnosis and treatment into basic health care units is the increased access of the general population to these services [18] [19] [20]. Theoretically, the integration strategy should contribute to more effective disease control as it would increase the chances of early diagnosis, avoid the occurrence of sequels, break the transmission chain, and increase patient adherence to treatment. But there is a consensus that for integration to be truly successful, health professionals must receive constant theoretical and practical training [19] [20]. A major obstacle is that in many Brazilian states, the permanence of doctors and nurses in primary care health units has proved to be difficult [21] [22]. In the State of Rio de Janeiro, for example, the Public Health Department analyzed the impact of the integration policy for 4 years after its initial implementation into the system. It found that the high professional turnover rate in the primary care health units along with the hardships encountered in obtaining sufficient financial resources to adequately train new professionals are issues that adversely impact the effectiveness of leprosy control measures in the State [18].

In this context, the results of the present study demonstrated the importance of our referral center in support of the basic health care services by accepting cases from all over the State and performing differential diagnosis of skin diseases and neuropathies. Studies performed in other countries have demonstrated that specialized services are necessary and continue to provide significant support within an integrated health care system approach towards the diagnosis and management of leprosy [23] [24].

In addition to medical assistance, reference centers remain committed to their role in developing research that contributes to leprosy control, specifically searching for new tools to more rapidly identify early signs of the disease. For example, many recent reports have shown that PCR-based assays are excellent adjuncts in clinical and histopathological analyses toward the definitive identification of *M. leprae* [25] [26]. Other studies aimed at the identification of biomarkers profiles associated with the early onset of type 1 leprosy reactions [27] in addition to antigens that could be used to monitor treatment efficacy in leprosy patients have shown great promise [28]. At specialized leprosy referral centers in Bangladesh and Brazil, Walker et al performed a severity scale for leprosy Type 1 reactions to help diagnose reactional episodes and improve the management of this disabling complication of leprosy [29].

Moreover, the Fiocruz Leprosy Reference Center has developed studies to identify the major risk factors associated with the incidence of leprosy among household contacts in order to

support monitoring programs with the use of screening procedures able to spot high-risk individuals thereby widening the opportunities for early diagnosis and treatment. For that purpose, serological test using anti-PGL1 has been performed among leprosy household contacts [30]. In recent years, studies carried out at the Fiocruz Leprosy Laboratory have demonstrated the great value of qPCR in the clinical management of suspected cases of paucibacillary leprosy [10] as well as pure neural leprosy [31]. But, to develop new diagnostic methods, that could be used in a variety of field conditions, to augment

viduals thereby widening the opportunities for early diagnosis and treatment. For that purpose, serological test using anti-PGL1 has been performed among leprosy household contacts [30]. In recent years, studies carried out at the Fiocruz Leprosy Laboratory have demonstrated the great value of qPCR in the clinical management of suspected cases of paucibacillary leprosy [10] as well as pure neural leprosy [31]. But, to develop new diagnostic methods, that could be used in a variety of field conditions, to augment

Supporting Information

S1 Table. Percentagem of other diseases diagnosed without biopsy at the Fiocruz Outpatient Clinic from 2010 to 2014.

(DOCX)

S1 Checklist. STROBE checklist.

(DOC)

Acknowledgments

Our gratitude goes to the team of dermatologists, nurses and technicians at the Fiocruz Outpatient Clinic and the Leprosy Laboratory that collaborate to this study as well as to Judy Grevan, for editing the text in English.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RRB AMS MOM ENS. **Performed the experiments:** RRB AMS JAdCN AdMM MOM. **Analyzed the data:** RRB MAH NCD. **Contributed reagents/materials/analysis tools:** RRB NCD AdMM MOM. **Wrote the paper:** RRB AMS MAH NCD MOM ENS.

References

1. World Health Organization. A Guide to eliminating leprosy as a public health problem. Geneva: World Health Assembly; 1995.
2. World Health Organization. Weekly Epidemiological Record No. 36, 2015, 90 461–476 <http://www.who.int/wer>.
3. State Health Secretary of Rio de Janeiro <http://riocomsaude.rj.gov.br/site/Conteudo/Dados.aspx>.
4. Penna MLF, Oliveira MLW, Carmo EH, Penna GO, Temporão JG. The influence of increased access to basic healthcare on the trends in Hansen's disease detection rate in Brazil from 1980 to 2006. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2008; 41, 6–10. PMID: [19618068](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19618068/)
5. Valle C, Pimentel M, Libório A, Bittencourt A, Flach D, Saieg F, Mello K. Situação da hanseníase no estado do Rio de Janeiro no período de 2001 a 2009. *Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto*. 2011; 10 (1).
6. Brasil, 2009. Portaria N°. 125/SVS-SAS, de 26 de março de 2009, Brasília-DF Brasil www.credesh.ufu.br/node/1147
7. Ferreira MLT., Pontes MADA., Silveira MIDS, Araújo LDF, & Kerr LRS. A demanda de um centro de referência nacional para hanseníase no nordeste brasileiro: por que o excesso de pacientes?. *Cad. saúde colet. (Rio J.)*.2008; 16(2).

8. Mowla MR, Shamim A, and Sanai T. "Leprosy profiles in post - elimination stage: a tertiary care hospital experience." *International Journal of Dermatology* 2015; 54.12. 14071413. doi: [10.1111/ijd.12975](https://doi.org/10.1111/ijd.12975) PMID: [26227884](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26227884/)
9. Hacker MDAVB, Sales AM, Albuquerque ECA, Rangel E, Nery JAC, Duppre NC, Sarno E. N. Patients from a reference center for leprosy: Rio de Janeiro and Duque de Caxias, 1986–2008. *Ciência & Saúde Coletiva*. 2012; 17(9), 2533–2541. PMID: [22996903](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22996903/)
10. Barbieri RR, Sales AM, Illarramendi X, Moraes MO, Nery JAC, Moreira SJM et al. Diagnostic challenges of single plaque-like lesion paucibacillary leprosy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2014; 109(7), 944–947. doi: [10.1590/0074-0276140212](https://doi.org/10.1590/0074-0276140212) PMID: [25411000](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25411000/)
11. Smith WC, van Brakel W, Gillis T, Saunderson P, & Richardus JH. The missing millions: a threat to the elimination of leprosy. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015; 9 (4). doi: [10.1371/journal.pntd.0003658](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003658) PMID: [25905706](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25905706/)
12. Cunha MDD, Cavaliere FAM, Hércules FM, Duraes SMB, Oliveira MLWDR, Matos HJD. The impact of leprosy elimination strategy on an endemic municipality in Rio de Janeiro State, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*. 2007; 23(5), 1187–1197. PMID: [17486240](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17486240/)
13. Kasturiaratchi ND., Settinayake S, Grewal P. Processes and challenges: how the Sri Lankan health system managed the integration of leprosy services. *Leprosy review*. 2002; 73(2), 177–185. PMID: [12192974](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12192974/)
14. Oliveira MLW, Penna GO, Telhari S. Role of dermatologists in leprosy elimination and post-elimination era: the Brazilian contribution. *Lepr Rev*. 2007; 78, 17–21. PMID: [17518082](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17518082/)
15. Kawuma HJS. Potential role of dermatologists and dermatological services in developing and sustaining the leprosy control referral system in resource constrained settings. *Leprosy review*. 2007; 78(1), 34. PMID: [17518086](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17518086/)
16. Brasil, 2002. Ministry of Health. Guide to leprosy control. Brasília: Department of Primary Care, Department of Public Policy; 2002. (Attention Notebooks Basic, 10).
17. Hacker MA, Sales AM, Illarramendi X, Nery JA, Duppre NC, Bastos FI et al. The profile of Patients treated at the national leprosy outpatient referral clinic in Rio de Janeiro, Brazil, 19862007. *Rev Panam Salud Publica* [Internet]. June 2012; 31 (6): 485491. PMID: [22858815](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22858815/)
18. Pimentel MIF., Andrade M., Valle CLP, Xavier AGM., Bittencourt ALP & Macedo LFSD. Decentralization of the diagnosis and treatment of leprosy in Rio de Janeiro State: advances and problem. *Hansen. Int*. 2004; 29(2), 94–100.
19. Lockwood DNJ and Suneetha S. Leprosy: too complex a disease for a simple elimination paradigm *Bull World Health Organ* [online] 2005, vol.83, n.3, pp. 230–235. PMID: [15798849](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15798849/)
20. Visschedijk J, Engelhard A, Lever P, Grossi MAF, Feenstra P. Leprosy control strategies and the integration of health services: an international perspective. *Cad. Saúde Pública* [Internet]. Dec 2003; 19 (6): 1567–1581. doi: [10.1590/S0102-311X2003000600002](https://doi.org/10.1590/S0102-311X2003000600002) PMID: [14999324](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14999324/)
21. Silveira N, Almeida RP. Critical factors for fixing the doctor in the Health Strategy physis Family Public Health Journal, Vol. 22, núm. 4, octubre diciembre, 2012, pp.1293–1311 State University of Rio de Janeiro Rio de Janeiro Brazil.
22. Medeiros CR, Junqueira AGW, Schwingel G, Carreno I, Jungles LAP, Saldanha OMFL. The turnover of nurses and doctors: a halt in the implementation of the Family Health Strategy *Ciênc Public Health*. 2010; 15 (suppl 1), 152131.
23. Raffe SF, Thapa M, Khadge S, Tamang K, Hagge D, Lockwood DN. Diagnosis and Treatment of Leprosy Reactions in Integrated Services-The Patients' Perspective in Nepal. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013; 7(3), e2089. doi: [10.1371/journal.pntd.0002089](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002089) PMID: [23505585](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23505585/)
24. Wijesinghe PR, Settinayake S. An analysis of the pattern of detection of leprosy patients by institutions in the general health services in Sri Lanka after the integration of leprosy services into general health services. *Lepr Rev*. 2005; 76: 296–304. PMID: [16411509](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16411509/)
25. Williams DL, Scollard DM, Gillis TP. PCR-based diagnosis of leprosy in the United States. *Clinical Microbiology Newsletter*. 2003; 25(8), 57–61. doi: [10.1016/S0196-4399\(03\)80008-9](https://doi.org/10.1016/S0196-4399(03)80008-9)
26. Martinez AN, Talhari C, Moraes MO, Talhari S. PCR-Based Techniques for Leprosy Diagnosis: From the Laboratory to the Clinic. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 8(4): e2655. doi: [10.1371/journal.pntd.0002655](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002655) PMID: [24722358](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24722358/)
27. Khadge S, Banu S, Bobosha K, van der Ploeg-van JJ, Goulart IM, Thapa P et al. Longitudinal immune profiles in type 1 leprosy reactions in Bangladesh, Brazil, Ethiopia and Nepal. *BMC infectious diseases*. 2015; 15(1), 1. doi: [10.1186/s12879-015-1128-0](https://doi.org/10.1186/s12879-015-1128-0) PMID: [26510990](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26510990/)
28. Spencer JS, Duthie MS, Geluk A, Balagon F, Kim HJ, Wheat WH et al. Identification of serological biomarkers of infection, disease progression and treatment efficacy for leprosy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. Vol. 2012; 107(Suppl. I): 79–89. doi: [10.1590/S0074-02762012000900014](https://doi.org/10.1590/S0074-02762012000900014) PMID: [23283458](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23283458/)

29. Walker SL, Nicholls PG, Butlin CR, Nery JAC, Roy HK, et al. Development and Validation of a Severity Scale for Leprosy Type 1 Reactions. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008; 2(12): e351. doi: [10.1371/journal.pntd.0000351](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000351) PMID: [19104651](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19104651/)
30. Düppre NC, Camacho LA, Sales AM, Illarramendi X, Nery JA, Sampaio EP, Sarno EN, Bühner-Sékula S: Impact of PGL-I seropositivity on the protective effect of BCG vaccination among leprosy contacts: a cohort study. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012, 6 (6): e17111 doi: [10.1371/journal.pntd.0001711](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001711) PMID: [22724040](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22724040/)
31. Jardim MR, Antunes SL, Simons BRIAN, Wildenbeest JG, Nery JAC, Illarramendi X & Sarno EN. Role of PGL-I antibody detection in the diagnosis of pure neural leprosy. *Leprosy review*, 2005; 76(3), 232–240. PMID: [16248210](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16248210/)

5.2 Artigo 2

Quantitative polymerase chain reaction in paucibacillary leprosy diagnosis: a follow-up study

Reação em cadeia da polymerase no diagnóstico da hanseníase paucibacilar: um estudo de follow up

Publicado na Plos Neglected Tropical Diseases em março de 2019.

RESEARCH ARTICLE

Quantitative polymerase chain reaction in paucibacillary leprosy diagnosis: A follow-up study

Raquel R. Barbieri^{1*}, Fernanda S. N. Manta¹, Suelen J. M. Moreira¹, Anna M. Sales¹, José A. C. Nery¹, Lilian P. R. Nascimento¹, Mariana A. Hacker¹, Antônio G. Pacheco², Alice M. Machado¹, Euzenir M. Sarno¹, Milton O. Moraes¹

1 Leprosy Laboratory, Oswaldo Cruz Institute—Fiocruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **2** PROCC—Programa de Computação Científica—Fiocruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

* rbarbi@gmail.com

Abstract

Objective

The diagnosis of paucibacillary (PB) leprosy cases remains a challenge because of the absence of a confirmatory laboratory method. While quantitative polymerase chain reaction (qPCR) has been shown to provide reliable sensitivity and specificity in PB diagnoses, a thorough investigation of its efficacy in clinical practice has not yet been published. The present study evaluated patients with suspected leprosy skin lesions by using qPCR to identify PB individuals in the Leprosy Outpatient clinic at the Oswaldo Cruz Foundation in Rio de Janeiro, Brazil.

Methods

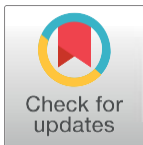
One hundred seventy-two suspected PB cases were included in the study. The patients were evaluated by a dermatologist at three different times. The clinical dermato-neurological examination and collected samples were performed on the first visit. On the second visit, the results of the histopathological analysis and PCR assay (DNA-based *Mycobacterium leprae* qPCR-targeting 16S gene) results were analyzed, and a decision regarding multi-drug therapy was made. A year later, the patients were re-examined, and the consensus diagnosis was established.

Results

In 58% (100/172) of cases, a conclusive diagnosis via histopathological analysis was not possible; however, 30% (30/100) of these cases had a positive PCR. One hundred ten patients (110/172) attended the third visit. The analysis showed that while the sensitivity of the histopathological test was very low (35%), a qPCR alone was more effective for identifying leprosy, with 57% sensitivity

Conclusion

The use of qPCR in suspected PB cases with an inconclusive histology improved the sensitivity of leprosy diagnoses.



OPEN ACCESS

Citation: Barbieri RR, Manta FSN, Moreira SJM, Sales AM, Nery JAC, Nascimento LPR, et al. (2019) Quantitative polymerase chain reaction in paucibacillary leprosy diagnosis: A follow-up study. *PLoS Negl Trop Dis* 13(3): e0007147. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007147>

Editor: Mathieu Picardeau, Institut Pasteur, FRANCE

Received: October 24, 2018

Accepted: January 9, 2019

Published: March 5, 2019

Copyright: © 2019 Barbieri et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by Fiocruz, CNPq (Brazilian Research Council), Capes (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), Faperj (Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro) and Novartis Foundation. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Author summary

Leprosy is a major public health problem in several low- to middle-developed countries where a consistent number of new cases are diagnosed every year. Irrespective of the use of efficient treatment, diagnosis is late because of the absence of a gold standard method. Thus, the multi-drug therapy (MDT) is unable to control of disease transmission even though early diagnosis, adequate MDT treatment of new cases, and contact surveillance have been considered the pillars of leprosy endemic control. Quantitative polymerase chain reaction (qPCR)-based *Mycobacterium leprae* DNA direct detection in clinical samples has been developed to support diagnosis. This study used qPCR to differentially diagnose suspected cases of paucibacillary leprosy and to follow them after treatment to confirm the consensus diagnosis and therapeutic approaches. It was concluded that qPCR and histopathological analysis increase clinical diagnosis accuracy, and qPCR has higher sensitivity. The routine use of qPCR laboratory tests could therefore improve the precision of early diagnosis for the achievement of leprosy control.

Introduction

Prerequisites for leprosy control, early detection, and adequate treatment are crucial for reducing the risk of disability and interrupting transmission, thereby decreasing the burden of the disease. Leprosy diagnoses are based on clinical manifestations, the presence of acid-fast bacilli (AFB) determined through microscopy in slit skin smears, and histopathological analyses of skin biopsy samples. Nevertheless, diagnosis is challenging, particularly in the early stages and in a paucibacillary (PB) form characterized by the absence of bacilli in slit skin smears. In addition, skin macules or plaques, frequently found in PB leprosy, represent the clinical manifestations of many other dermatoses, such as pityriasis alba, rosacea granulomatosa, granuloma anulare, cutaneous tuberculosis, and sarcoidosis.

Histological diagnosis of leprosy is indicated by two cardinal features: neural aggression and bacillar identification [1]. In PB, however, histological changes can simply be a perivascular lymphohistiocytic infiltrate or an epithelioid granuloma, a nonspecific alteration in the dermis that hinders a differential histopathological diagnosis [2,3]. In a paper published almost 30 years ago, Lucas and Ridley stated that “the difficulty and lack of agreement in diagnosing early PB leprosy by histopathology is frustrating.” They asserted that “there is no reason why the essentially subjective nature of histological observation and diagnosis should change in the future” [4].

Indeed, no clinical or histopathology tests are capable of either confirming or rejecting all suspected PB cases. In the last two decades, studies have demonstrated the potential of polymerase chain reaction (PCR) technology for the rapid detection and identification of leprosy in clinical specimens [5–8]. More recently, real-time PCR has improved the rate of disease detection by facilitating the direct quantitation of the bacterial DNA content in clinical samples, thereby increasing the reliability of the results [9–11]. This tool has become particularly important in the differential diagnosis of cases with a negative bacillary load and non-conclusive histopathology [12–14].

In the absence of a gold standard, previous studies have used clinical diagnoses or histopathologic analyses as reference standards for evaluating PCR sensitivity and specificity. However, the inherent subjectivity of these methods underscores the need for more reliable criteria for defining reference standards.

Since 2012, qPCR has been used as a support in the clinical and histopathological leprosy diagnostic procedures at our clinic. The present study aimed to provide more precise sensitivity and specificity for qPCR in PB leprosy. Suspected PB cases were followed for a year, and consensus diagnoses were established after observation and evaluation of the presence or absence of skin lesions one year later. The consensus diagnosis became the reference standard for analyzing the role of qPCR in PB leprosy diagnoses in clinical practice.

Methods

This prospective observational study, nested in a clinic cohort, was performed at the Leprosy Outpatient Clinic of the Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), a national reference center for leprosy in Rio de Janeiro, RJ, Brazil. All individuals referred to the clinic for diagnosis, from January 2012 through December 2016, presenting with suspicious PB leprosy skin lesions were included.

Excluded were all cases exhibiting a positive bacteriological index (BI) on a slit skin smear, visualized bacilli in the first histopathological analysis, and suspicion of relapse. Also excluded were those cases suspected of having the pure neural form without skin lesions.

Each patient had three evaluations. The first included a clinical evaluation and sample collection (skin biopsy for histology and qPCR). In the second evaluation one month later, the histopathological and PCR results were analyzed, and a decision regarding MDT was made. At the third visit one year later, the consensus diagnosis was established (Fig 1). For each patient who continued to experience skin lesions, a new biopsy was performed for histological examination and PCR if necessary. These three-step evaluations are detailed below.

First visit: Initial clinical dermatoneurological examination and sample collection

Clinical-epidemiological data and bacillary analysis. All patient clinical-epidemiological data, including age, gender, contact with leprosy patients, and lesion duration, were collected and recorded on the standard outpatient form. The symptoms and the clinical description of the skin lesions, i.e., number, color, size, location, and type (macula or plaque), including lesion sensitivity, were recorded after the dermatological and physiotherapeutic examinations. Slit skin smears were taken from four sites (the ear lobes, one elbow, and a cutaneous lesion) for bacteriological diagnosis. One skin biopsy was performed (punch 6 mm) from suspected lesions for a histopathological analysis and a PCR assay. These skin samples were divided into two parts. One was stored in formalin for histological study, and the other, in 70% ethanol for *Mycobacterium (M.) leprae* DNA detection.

Histopathological analysis. One skin biopsy sample was prepared for routine histopathological examination, hematoxylin-eosin, and Wade staining. All the cases were analyzed by an experienced dermatopathologist and were classified as either PB leprosy, other dermatoses, or nonspecific histological features (NSHFs). The cases were categorized as PB leprosy in the presence of an inflammatory lymphohistiocytic or granulomatous infiltrate in the nervous fillets and/or the erector muscle of the hair [1]. If the histopathological alterations typical of other skin diseases were detected, the cases were classified as “other dermatoses.” Those in which the histopathological changes were nonspecific were categorized as “NSHFs.”

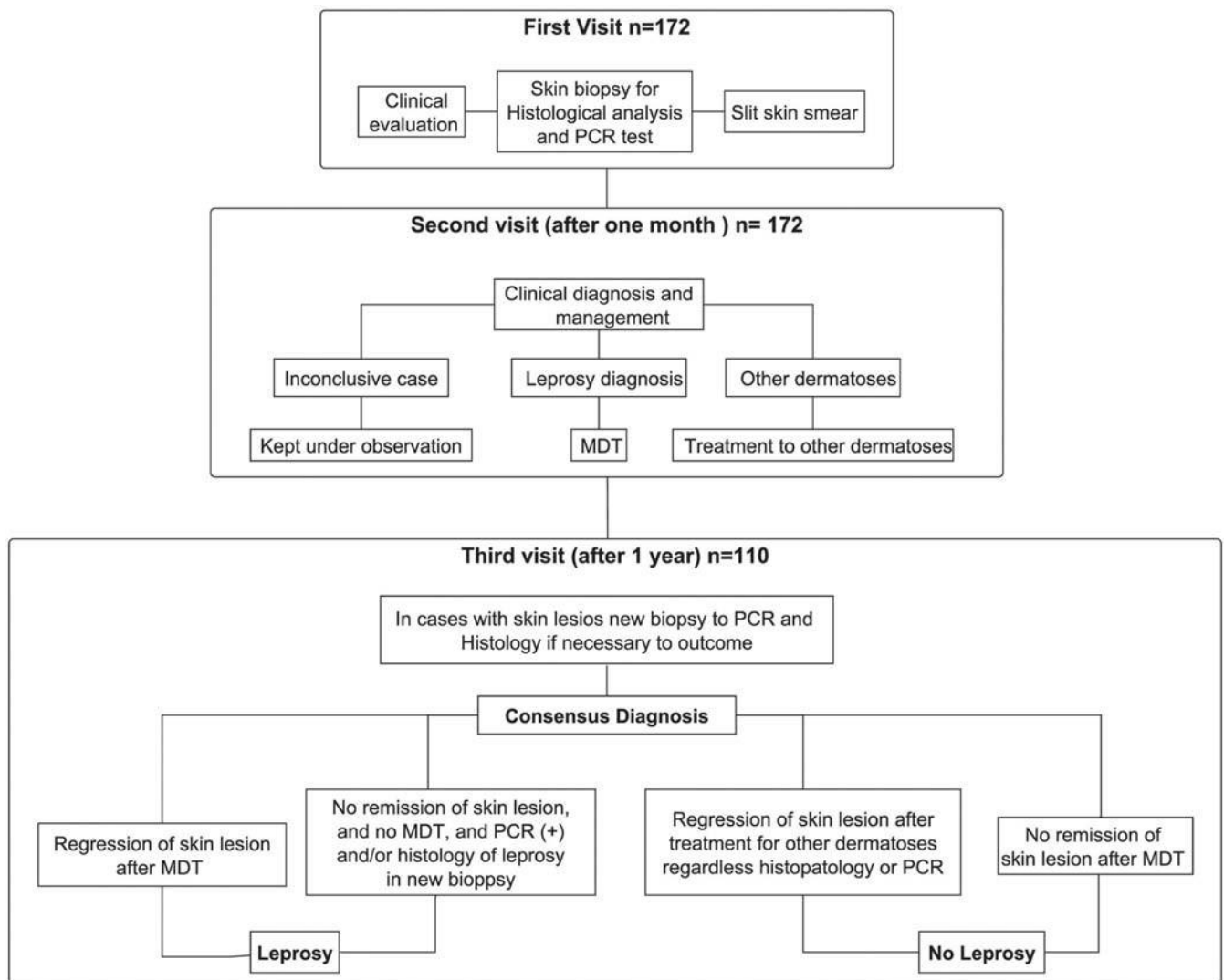


Fig 1. Clinical evaluations of the cases. A clinical evaluation and sample collection at the first visit; the histopathological and PCR results and the decision on pursuing MDT in the second; the consensus diagnosis in the third visit one year after the second.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007147.g001>

Polymerase chain reaction assays. For DNA extraction, the DNeasy blood and tissue kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) was used in accordance with the specifications. The qPCR technique is standardized to amplify the 16S rRNA *M. leprae*-specific target through the use of the TaqMan amplification assay. All the reactions were performed in triplicate through the same real-time PCR system (Applied Biosystems StepOne). The results were obtained in accordance with the first fluorescent signal detection, cycle threshold (Ct) [10]. As recommended by previous studies and in accordance with the laboratory’s standard operating procedures for validating clinical molecular tests, the sample was considered positive when it exhibited Ct \leq 38.5 (3 genomes) in at least two of the three reactions (triplicates) [10,15,16].

Second visit: Laboratorial results and clinical management

At the second visit, the dermatologist used the Ministry of Health clinical criteria for leprosy diagnosis (regardless of the histopathological and PCR results) [17] to categorize all the cases and to define the treatment as follows: (i) Leprosy patients began treatment with PB MDT, (ii) cases diagnosed with other dermatosis were referred to a general dermatological service for treatment, and (iii) inconclusive cases were kept under observation. All of the patients were scheduled for a third clinical evaluation one year after the second visit.

Third visit: Follow-up

All of the patients were invited for a third clinical examination during which the consensus diagnosis was established. The presence or absence of skin lesion and the results of the PCR and histological analysis performed during the first visit were considered. If the lesions remained unchanged, a new biopsy was performed for diagnostic clarification through PCR and histopathological analysis. The cases were classified as either leprosy or non-leprosy (con- sensus diagnosis) according to the following criteria:

Leprosy cases

- Patients with skin lesion remission on the third visit post-MDT; and
- Patients who on the third visit had skin lesions without MDT and those whose new biopsy results showed the histopathological characteristics of leprosy or a positive PCR.

Non-leprosy cases

- Patients with skin lesions on the third visit despite receiving MDT;
- Patients with lesion remission on the third visit after specific treatment for other dermatoses; and
- Patients with lesion remission on the third visit without MDT or any other medication.

After the third visit, the consensus diagnosis (leprosy or non-leprosy) was established as the reference standard.

Statistical analysis

The frequencies for the clinical-epidemiological characteristics were ascertained through the use of proportions for the categorical variables and centrality and dispersion measures for the continuous variables. The proportions of the histological diagnostic (leprosy, other dermatosis, or NSHFs) and the PCR results (positive or negative) were calculated and compared by use of the chi-square test (significance level of 5%). The frequency distribution of the cases on the basis of the related qPCR, histopathological tests, and consensus diagnoses was described through a flow chart. The sensitivity and specificity of the histology, the qPCR, and the combination of these two diagnostic methods were also calculated. The confidence intervals were calculated at a level of 95%.

Ethics approval

This study was approved by the Ethics in Research Committee of the Oswaldo Cruz Foundation CAAE: 38053314.2.0000.5248, number: 976.330–10/03/2015. Written informed consent was received from all the participants and the parents or guardians of the children under 18 years old included in the study.

Table 1. Clinical-epidemiological characteristics: N = 172.

Variable	Frequency	%
<i>Gender</i>		
Female	108	63.0
Male	64	37.0
<i>Household contact</i>		
Yes	80	46.6
No	92	53.4
<i>Skin lesion</i>		
Macula	110	64.0
Plaque	62	36.0
<i>Progression time</i>		
≤12 months	112	65.0
13–24 months	41	24.0
>24 months	19	11.0
<i>Number of lesions</i>		
1 lesion	107	62.0
2 lesions	27	16.0
≥3 lesions	38	22.0
<i>MDT treatment initiation</i>		
Yes	76	44.0
No	96	56.0

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007147.t001>

Results

As is shown in [Table 1](#), the lesions in 65% of the cases were recent, having evolved within a year or less. Most patients had only one lesion ([Table 1](#)). The mean age was 42.2 (+/- 17.8 SD), and the range was 15–79.

The results of the histopathological and PCR tests in the skin samples indicated that it was impossible to reach a leprosy diagnosis via histology in 58% (100/172) of all cases. In addition, among those with NSHFs, 30% had a positive PCR ([Table 2](#)).

The frequency distribution for the qPCR results, histopathology diagnosis, and consensus diagnosis is presented for the 110 cases that made the third visit (110/172). The consensus diagnosis of almost half of this group (54/110) was leprosy ([Fig 2](#)).

Only one of the five cases with a false positive PCR (highlighted in [Fig 2](#)) presented with plaque skin lesions and a granulomatous infiltrate histologically diagnosed as granulomatous rosacea. This patient was treated with doxycycline 200 mg/day for seven months after which remission of the cutaneous lesion was observed. The remaining four cases presented with macular lesions and NSHFs in the second evaluation. All were household contacts. Despite the patients' positive PCR results and epidemiological histories, clinical progress was monitored because of the patients' atypical maculae. Spontaneous healing of the cutaneous lesions was observed in these four cases.

Table 2. Proportions for histological diagnosis and polymerase chain reaction results.

PCR		Histological diagnosis			Total
		Leprosy	Other dermatoses	NSHFs*	
Positive	Positive	12 (48%)	8 (17%)	30 (30%)	50
	Negative	13 (52%)	39 (83%)	70 (70%)	122
Total		25	47	100	172

*Nonspecific histological features.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007147.t002>

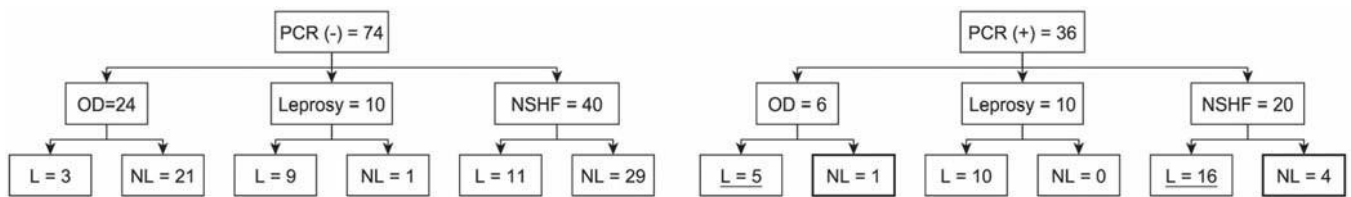


Fig 2. Flow chart of quantitative polymerase chain reaction results, histopathological results, and consensus diagnosis. The 21 underlined patients had exhibited the histological features of other dermatoses or NSHFs, and the consensus diagnosis was leprosy (L). These cases were diagnosed by PCR. The five highlighted cases were false PCR positives. L = consensus diagnosis of leprosy; NL = consensus diagnosis of non-leprosy.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007147.g002>

During the second visit, 21 patients (underlined in Fig 2) whose consensus diagnosis was leprosy were observed to have been diagnosed with other dermatoses via histology; thus, the qPCR results were decisive in establishing the diagnosis. Fig 3 illustrates four of these 21 leprosy cases identified by qPCR. It shows the histopathological features and skin lesions before and after MDT.

To analyze histological sensibility and specificity, the two non-leprosy groups were analyzed together, i.e., the NSHFs were added to the cases with other dermatoses. The data demonstrated that despite the high specificity, histopathological sensitivity was very low in this sample. Indeed, qPCR alone was more effective in identifying leprosy because PCR sensitivity (57%) was 22% higher than histopathology sensitivity (35%) (Table 3).

Discussion

The results of this study made clear that for some patients whose clinical and histological changes were insufficient for reaching a diagnosis, qPCR aided in establishing leprosy. In the cases in which the PB leprosy was suspected, the simultaneous use of qPCR and histology increased the sensitivity of a PB diagnosis without a loss of specificity.

A majority of the cases evaluated in this study had one skin lesion, and most of these were the macula type. Moreover, most patients reported having noticed their lesions one year or less before their initial visit. Nayar et al. affirmed the near impossibility of visualizing inflammation in the nervous fillets by histopathology during the first year of the disease [18]. The results of the present study demonstrated that whenever typical leprosy features or changes in other dermatoses were present, the sensitivity and specificity of the histopathological analyses were high. However, the analysis of the NSHFs cases, half of the sample, revealed very low sensitivity.

Studies have found qPCR sensitivity ranges of 34%–80% in PB patients [9–11]. However, compared to the sensitivity for histopathology, even this relatively low sensitivity can be considered a step forward for the differentiation of early leprosy from other dermatoses. In this sample, which was composed of suspected PB cases under investigation in our clinic, qPCR sensitivity was greater than histopathological sensitivity. This demonstrates that in clinical practice, *M. leprae* detection by qPCR in patients with a negative bacillary load and NSHFs would be of great value for limiting subjectivity in the diagnosis of PB leprosy.

One of the five apparently false positive PCR cases had tuberculoid granulomas. Because the histopathological diagnosis was granulomatous rosacea, the patient was treated with doxycycline at a general dermatological clinic. Surprisingly, the rosacea plaque cleared only after seven months of daily use of the antibiotic. Doxycycline and minocycline are antibiotics in the tetracycline group with the same mechanism of action.

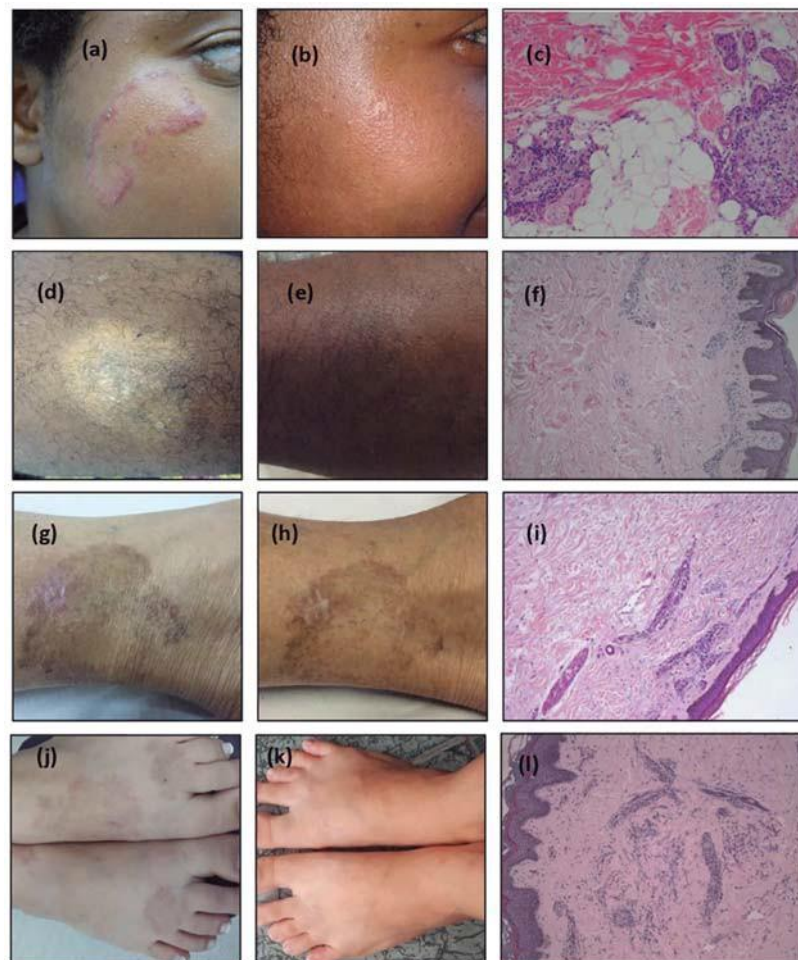


Fig 3. Examples of cases diagnosed as other dermatoses via histology and for which polymerase chain reaction was decisive in the leprosy diagnosis. All the cases were qPCR positive. Case I: (A) before multi-drug therapy (MDT), (B) one year after MDT; (C) histology: hematoxylin-eosin (H.E.) 10X, granulomatous rosacea: nerve bundles with normal appearance and granulomas attached to adnexa; Case II: (D) before MDT, (E) 8 months after MDT, (F) histology: H.E. 20X, suggestive of eczema; Case III: (G) before MDT, (H) residual lesion at release from treatment, (I) histology: H.E. 10X, nonspecific infiltrated inflammatory; Case IV: (J) before MDT, (K) one year after the end of MDT, (L) histology: HE 10X, granuloma annulare.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007147.g003>

For decades, minocycline, which has a strong bactericidal action against *M. leprae* [19], was used as an alternative leprosy treatment and it was found to be efficacious [20–21]. A possible explanation for the delay in lesion remission is that this patient, who was still being monitored, actually had PB leprosy and not granulomatous rosacea.

Three explanations are possible for the four positive PCR cases in which the lesions cleared without MDT or any other medication. It should be noted that studies using qPCR-targeting 16S and other genes have described a 100% specificity for PB leprosy [9,10]. In addition,

some PB cases have been found to progress to spontaneous healing [1,22]. It can therefore be hypothesized that the leprosy lesions of these patients might have been cured spontaneously. Another explanation is that these patients might have had a positive PCR because of a subclinical infection because all four were household contacts. The third possibility is that these were false-positive cases and that their skin lesions were cutaneous manifestations of other dermatoses.

Table 3. Histological and quantitative polymerase chain reaction (qPCR) sensitivity, specificity, and accuracy, and the combination of these two diagnostic methods.

Histological results	Leprosy	Non-Leprosy	Total	Sensitivity (IC 95%)	Specificity (IC 95%)	Accuracy (IC 95%)
Leprosy	19	1	20	35% (22.2–47.9)	98% (94.8–1.01)	67% (58.8–76.2)
NSHFs** + Other dermatoses	35	55	90			
Total	54	56	110			
qPCR results						
Positive	31	5	36	57% (44.2–70.5)	91% (81.5–97.4)	75% (65.7–82.0)
Negative	23	51	74			
Total	54	56	110			
Histology + PCR						
Histo* leprosy + NSHFs** with qPCR (+)	35	5	40	65% (52.0–77.5)	91% (81.2–97.6)	78% (66.3–88.6)
Histo OD** + NSHFs** with qPCR (–)	19	51	70			
Total	54	56	110			

Histo* = histology; OD** = other dermatoses; NSHFs** = nonspecific histological features

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007147.t003>

Nevertheless, none of the above-mentioned studies performed follow-up post-diagnoses. The 100% specificities in the PB cases were obtained through the reference standard of results of a histopathological examination and/or clinical diagnosis at a particular point in time.

Leprosy is a slow-progressing disease for which a gold standard for diagnosis does not exist. Therefore, defining the consensus diagnosis after observing the progression of the cases, as was done in the present study, was an additional step forward in providing higher precision for the PCR sensitivity and specificity measures. The sample size could be considered a limitation even though it appears that no other study has yet analyzed more than 100 PB patients for molecular diagnosis [23].

The present study clearly demonstrated that even for experienced dermatologists and pathologists, the difficulties encountered in interpreting the clinical and histopathological differential diagnosis of PB cases may be responsible for many delayed diagnoses. Because of the integration of leprosy control actions into the delivery of general health services in Brazil and other endemic countries, patients will continue to escape detection because few clinicians have the skills, experience, or expertise to diagnose the disease, especially in the early stages [24].

In addition, studies have highlighted that any declaration of the elimination of leprosy as a public health problem results in the neglect of ongoing disease control strategies, such as household surveillance, community awareness campaigns, and training for health professionals. Consequently, the lower the incidence, the less prepared will be clinicians and pathologists to identify leprosy in their clinical practice [25,26]. Brazil offers an example. In some states in which the disease had been under control, a recent trend of the diagnosis of new cases with disabilities, a late diagnostic indicator, has been observed [27,28].

In the last decade, real-time PCR has proved to be particularly useful in three areas: the identification of the drug-resistant bacilli used for treating leprosy [29], differential diagnoses for distinguishing between reaction and relapse by viability analyses of the bacillus [30], and the facilitation of the use of conventional diagnostic methods in difficult cases [23,31]. Although this technology is becoming accessible, faster, and cheaper, the infrastructure, such as equipment and trained professionals, is still a barrier to implementing qPCR in resource-limited settings. Portable real-time machines need to be tested and validated. In this regard, the GeneXpert has been used for pulmonary tuberculosis diagnosis in primary care facilities where unspecialized health care professionals are conducting the assays with the same sensitivities [32]

Sample processing technologies are available for *M. leprae* DNA detection; however, reference centers are still necessary.

In conclusion, the use of qPCR in suspected PB cases with a non-conclusive histology improved the sensitivity of leprosy diagnoses. Because early diagnosis is crucial to avoiding transmission and incapacitating neural lesions and achieving the goal of a leprosy-free world, the need for tools for the detection and confirmation of the disease among suspected individuals wherever they may live is indeed urgent.

Supporting information S1

Checklist. STROBE checklist.

(DOC)

Acknowledgments

We thank the Fiocruz Outpatient Clinic and the Leprosy Laboratory team of dermatologists, nurses, and technicians who collaborated on this study. The final version of this paper was edited and reviewed by Scribendi.

Author Contributions

Conceptualization: Raquel R. Barbieri, Anna M. Sales, José A. C. Nery, Euzenir M. Sarno, Milton O. Moraes.

Data curation: Raquel R. Barbieri, Fernanda S. N. Manta, Suelen J. M. Moreira, Mariana A. Hacker, Antônio G. Pacheco, Milton O. Moraes.

Formal analysis: Raquel R. Barbieri, Anna M. Sales, Mariana A. Hacker. **Investigation:** José A. C. Nery, Lilian P.

R. Nascimento, Alice M. Machado. **Methodology:** Raquel R. Barbieri, Antônio G. Pacheco, Milton O. Moraes.

Supervision: Milton O. Moraes.

Writing – original draft: Raquel R. Barbieri, Fernanda S. N. Manta, Suelen J. M. Moreira.

Writing – review & editing: Raquel R. Barbieri, Anna M. Sales, Euzenir M. Sarno, Milton O. Moraes.

References

1. Ridley DS and Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity; a five-group system. *Int. J. Lepr* 1966; 34:255–273.
2. Bindford CH. The Histologic Recognition of the Early Lesions of Leprosy. *Int. J. Lepr* 1971; 39(2):225–230.
3. Ridley DS. The Pathogenesis of the Early Skin Lesion in Leprosy. *J. Path* 1973; 111:191–205 <https://doi.org/10.1002/path.1711110307> PMID: [4128202](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4128202/)
4. Lucas SB, Ridley DS. The use of histopathology in leprosy diagnosis and research. *Leprosy review* 1989; 60(4):257–62. PMID: [2607878](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2607878/)
5. Scollard DM, Gillis TP, Williams DL. Polymerase chain reaction assay for the detection and identification of *Mycobacterium leprae* in patients in the United States 1998. *Am J Clin Pathol.* 109:642–646. PMID: [9576586](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9576586/)
6. Santos AR, De Miranda AB, Sarno EN, Suffys PN, Degraive WM. Use of PCR-mediated amplification of *Mycobacterium leprae* DNA in different types of clinical samples for the diagnosis of leprosy. *J Med Microbiol.* 1993; 39:298–304. <https://doi.org/10.1099/00222615-39-4-298> PMID: [8411091](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8411091/)

7. Martinez AN, Britto CF, Nery JA, Sampaio EP, Jardim MR, Sarno EN, Moraes MO. Evaluation of real-time and conventional PCR targeting complex 85 genes for detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin biopsy samples from patients diagnosed with leprosy. *J Clin Microbiol*. 2006; 44:3154–3159. <https://doi.org/10.1128/JCM.02250-05> PMID: [16954241](#)
8. Almeida EC, Martinez AN, Maniero VC, Sales AM, Duppre NC, Sarno EM et al. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA by polymerase chain reaction in the blood and nasal secretion of Brazilian household contacts. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2004; 99:509–511. PMID: [15543415](#)
9. Rudeeaneksin J, Srisungngam S, Sawanpanyalert P, Sittiwakin T, Likanonsakul S, Pasadorn S et al. LightCycler real-time PCR for rapid detection and quantitation of *Mycobacterium leprae* in skin specimens. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008; 54:263–270. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2008.00472.x> PMID: [18783434](#)
10. Martinez AN, Ribeiro-Alves M, Sarno EM, Moraes MO. Evaluation of qPCR-Based Assays for Leprosy Diagnosis Directly in Clinical Specimens. *PLOS Negl Trop Dis* 2011; 5:e1354. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001354> PMID: [22022631](#)
11. Kramme S, Bretzel G, Panning M, Kawuma J, Drosten C. Detection and quantification of *Mycobacterium leprae* in tissue samples by real-time PCR. *Med Microbiol Immunol* 2004; 193:189–193. <https://doi.org/10.1007/s00430-003-0188-8> PMID: [12884037](#)
12. Bezerra Da Cunha FM, Werneck MC, Scola RH, Werneck LC. Pure neural leprosy: diagnostic value of the polymerase chain reaction. *Muscle Nerve* 2006; 33:409–414. <https://doi.org/10.1002/mus.20465> PMID: [16315323](#)
13. Jardim MR, Antunes SL, Simons B, Wildenbeest JG, Nery JAC, Illaramendi X, Sarno EN. Role of PGL-I antibody detection in the diagnosis of pure neural leprosy. *Lepr Ver* 2005; 76:232–240.
14. Rodriguez G, Pinto R, Gomez Y, Rengifo ML, Estrada OL, Sarmiento M et al. Pure neuritic leprosy in patients from a high endemic region of Colombia. *Lepr Rev* 2013; 84:41–50. PMID: [23741881](#)
15. Jennings L, Van Deerlin VM, Gulley ML. College of American Pathologists Molecular Pathology Resource Committee. Recommended principles and practices for validating clinical molecular pathology tests. *Arch Pathol Lab Med*. 2009; 133(5):743–55.
16. Burd EM. Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases. *Clin Microbiol Rev*, 2010; 23:550–576. <https://doi.org/10.1128/CMR.00074-09> PMID: [20610823](#)
17. Brasil, Ministério da Saúde, Secretaria de Políticas de Saúde Departamento de Atenção Básica, Guia para Controle da Hanseníase; Brasília, DF 2002.
18. Nayar A, Narayanan SJ, Job CK. Histopathological study of early skin lesions in leprosy. *Archives of pathology* 1972; 94:199–204. PMID: [4559401](#)
19. Gelber RH. Activity of minocycline in *Mycobacterium leprae*-infected mice. *J. Infect. Dis*. 1987; 156:236–239. PMID: [3298454](#)
20. Gelber RH, Murray LP, Siu P, Tsang M, Rea TH. Efficacy of minocycline in single dose and at 100 mg twice daily for lepromatous leprosy. *Int. J. Lepr*. 1994; 58:568–573.
21. Suneetha S, Reddy R. Histological resolution and bacterial clearance with pulse ROM therapy in borderline lepromatous leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 2001; 69:53–54. PMID: [11480321](#)
22. Azulay RD. Histopathology of Skin Lesions in Leprosy. *International Journal of Leprosy* 1971; 39(2):244–250.
23. Martinez AN, Talhari C, Moraes MO, Talhari S. PCR-Based Techniques for Leprosy Diagnosis: From the Laboratory to the Clinic. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 8(4): e265.
24. Barbieri RR, Sales AM, Hacker MA, Nery JAdC, Duppre NC, Machado AdM, et al. Impact of a Reference Center on Leprosy Control under a Decentralized Public Health Care Policy in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 2016 10(10): e0005059. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005059> PMID: [27732610](#)
25. Smith WC, van Brakel W, Gillis T, Saunderson P, Richardus JH. The missing millions: a threat to the elimination of leprosy. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015; 9(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003658> PMID: [25905706](#).
26. Oliveira MLW, Penna GO, Talhari S. Role of dermatologists in leprosy elimination and post-elimination era: the Brazilian contribution. *Lepr Rev*. 2007; 78:17–21. PMID: [17518082](#).
27. Nazário AP, Ferreira J, Schuler-Faccini L, Fiegenbaum M, Artigalás O, Vianna FSL. Leprosy in Southern Brazil: a twenty-year epidemiological profile. *Rev Soc Bras Med Trop* 2017; 50(2):251–255. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0229-2016> PMID: [28562765](#)
28. http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/sinanet/hanseníase/Planilhas_arquivos/sheet012.htm (acessado em 10/05/2018).
29. Cambau E, Saunderson P, Matsuoka M, Cole ST, Kai M, Suffys P, et al. Antimicrobial resistance in leprosy: results of the first prospective open survey conducted by a WHO surveillance network for the

period 2009–2015. *Clin Microbiol Infect*. 2018. Epub 2018/03/03.
<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.02.022> PMID: [29496597](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29496597/).

30. Martinez AN, Lahiri R, Pittman TL, Scollard D, Truman R, Moraes O et al. Molecular determination of *Mycobacterium leprae* viability by use of real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2009; 47:2124–2130. <https://doi.org/10.1128/JCM.00512-09> PMID: [19439537](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19439537/)
31. Barbieri RR, Sales AM, Illarramendi X, Moraes MO, Nery JAC, Moreira SJM et al. Diagnostic challenges of single plaque-like lesion paucibacillary leprosy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2014; 109:944–947. <https://doi.org/10.1590/0074-0276140212> PMID: [25411000](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25411000/)
32. Theron G, Zijenah L, Chanda D, Clowes P, Andrea Rachow A, Lesosky M, et al. Feasibility, accuracy, and clinical impact of point-of-care Xpert MTB/RIF testing for tuberculosis in primary-care settings in Africa: a multicentre, randomized controlled trial. *Lancet* 2013 October 25 Epub ahead of print]. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62073-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62073-5)

5.3 Artigo 3

Quantitative PCR for leprosy monitoring and diagnosis among household contacts

Reação em cadeia da polimerase para monitoramento e diagnóstico dos contatos de pacientes com hanseníase

Quantitative PCR for leprosy monitoring and diagnosis among household contacts

Fernanda Saloum de Neves-Manta^{1*}, Suelen Justo Maria Moreira^{1*}, Raquel Rodrigues Barbieri^{1*}, Anna Maria Sales¹, José Augusto da Costa Nery¹, Nádia Cristina Duppre¹, Antonio Guilherme Pacheco², Mariana de Andrea Hacker¹, Euzenir Nunes Sarno¹, Milton Ozório Moraes¹.

1- Laboratório de Hanseníase, Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

2- Programa de Computação Científica (PROCC), Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

* F.S.N.M, S.J.M.M, and R.R.B contributed equally to this work.

Corresponding author: milton.moraes@fiocruz.br

Financial support: LRI, CAPES, CNPq, FAPERJ

Abstract

Household contacts (HHC) of leprosy patients exhibit high risk of developing the disease. Contact tracing and examination are helpful to early diagnosis. We tested the use of qPCR in monitoring HHCs recruited in a reference clinic in Rio de Janeiro, Brazil, right after the index case diagnosis. Between 2011 and 2018, a total of 2,437 household contacts were examined and 54 were clinically diagnosed with leprosy and treated accordingly. Among the remaining 2,383, 25 individuals exhibiting a leprosy-like skin lesion were further investigated, while qPCR and histopathology supported leprosy diagnosis in 8 cases (50% were qPCR positive) and 17 were diagnosed as other skin disease (6% qPCR positive). In this group, a positive qPCR in a skin biopsy indicates increased odds of being leprosy [odds-ratio (OR) = 16 confidence interval, (CI) =1.38–185.4], sensitivity was 0.50 (CI=0.14-0.86) and specificity (0.94, CI=0.69-0.99). Of the healthy contacts, recruited between 2011-2015, 950 were followed-up up to 2018. Slit skin smears were collected from ear lobes for qPCR detection in this group of HHCs. A positive qPCR test indicated a non-statistically significant relative risk = 2.52, CI = 0.28–22.3) of developing the disease; those who progressed towards leprosy exhibited 20% positivity (1 out of 5), compared to approximately 9% (86/950) of those who persisted healthy with a positive PCR during the follow up. The use of qPCR in contacts with

leprosy-like lesions support early diagnosis of leprosy. Nevertheless, positive qPCR is not a good marker for prediction of clinical progression in healthy HHCs. In summary, contact tracing is very useful and combined qPCR could assist early diagnosis. For healthy contacts, chemo- and immuno-prophylaxis should be used irrespective of serological or molecular status due to low sensitivity. Seeking for novel methods, or markers to predict progression and diagnosis is still necessary.

Introduction

In leprosy, despite the successful introduction of multidrug therapy (MDT), the number of new cases has been decreasing slowly in the past 20 years worldwide. Thus, it is suggested that MDT is not able to block transmission, since a considerable proportion of patients are being diagnosed late [1]. It is likely that diagnosis delay contributes to continuous transmission of mycobacteria, especially to patients' household contacts, which is the group that exhibit the highest risk to develop the disease [2,3,4].

Active search for new cases among household contacts (HHC) are cost-effective since they can detect patients exhibiting early disease stages [5,6]. Large-scale public policies such chemo- and/or immunoprophylactic strategies in HHC are effective [7-9] in decreasing the disease as a public health problem.

Early leprosy diagnosis is difficult and there is no microbiological, immunological or histopathological test to accurately identify patients. Detection of anti-PGL-I antibodies may assist the classification of multibacillary patients and monitor treatment efficacy [10,11], although positive results indicate higher risk to develop the disease among household contacts with low sensitivity [12]. Nevertheless, most of paucibacillary (PB) patients do not have detectable anti-PGL-I titers [13]. Molecular methodologies are more sensitive and specific than classic techniques such as bacillary load or histopathology [14-17]. PCR-based *M. leprae* detection [18-21] exhibits the highest specificity and sensitivity for PB patients and can be used in a variety of clinical samples, such as slit skin smears from ear lobes, blood, nasal secretions, and skin/nerve biopsies [22].

In this context, we investigated a cohort at the FIOCRUZ Clinic, Rio de Janeiro, between 2011–2018 to assess whether the qPCR technique could be used for early diagnosis, capable of detecting and confirming the disease among individuals exhibiting suspicious skin lesions and estimate the risk to progress towards the disease in a cohort of asymptomatic HHCs. In this study, we confirmed that i) HHC careful clinical examination detects leprosy cases at intake; ii) qPCR can improve diagnosis if the contact presents a difficult-to-diagnose skin lesion; iii) the use qPCR for screening of asymptomatic contacts is not informative, since only 20% of the progressors are detected suggesting that qPCR is a not a good predictive marker of disease outcome for this group of incident contacts.

Methods

Ethics statement

This study was approved by the ethical committee of the FIOCRUZ (CEP:976.330). An informed consent form was signed by patients, HHCs, and parents or guardians of children under 18 years old included in the study.

Study design:

The study was conducted at the Leprosy clinic from Oswaldo Cruz Foundation in the city of Rio de Janeiro, Brazil and it is summarized in Figure 1. All registered HHCs from each newly diagnosed patient were invited to participate in the study. Where an informed consent was signed and the HHCs were dermato-neurologically examined. If they present a skin lesion in this first visit, they could have been i) clinically diagnosed as a leprosy case or ii) investigated as suspicious leprosy case and a biopsy taken for histopathology and qPCR. Contacts diagnosed at intake, either clinically or laboratory confirmed leprosy, were assigned as a “co-prevalent case”. All asymptomatic contacts examined at the intake were invited to be part of the follow-up (cohort) study. If they agreed to participate, a slit skin smear from the right earlobe was collected for qPCR. HHCs who developed the disease during follow-up, were considered “incident cases”.

For data analysis, HHCs were stratified according to operational [paucibacillary (PB) or multiibacillary (MB)] and clinical classifications of their index cases. PB individuals were classified as Tuberculoid (TT), Borderline tuberculoid (BT), Indeterminate (I) and Pure Neural (PN). MB individuals were classified as Borderline–borderline (BB), Borderline lepromatous (BL), Lepromatous (LL) [23]. Contacts with clinically diagnosed leprosy were also stratified according to the clinical and operational classifications. Sociodemographic variables used were age and gender.

Sample collection:

Slit skin scraping (SSS) from the right ear lobe were collected from all recruited household contacts and stored in 70% ethanol at -20°C until processing. If a household contact presented patches, nodules or macula during dermatological examination, a skin biopsy was collected using a 6-mm punch. Biopsies were split into halves and fixed in formalin 10% for H&E routine and or 70% ethanol for DNA extraction and qPCR as described below. Ethanol skin samples were frozen and stored in liquid nitrogen.

Histopathology:

Biopsy samples obtained from HHC with skin lesions suspected to be leprosy were fixed in 4% formaldehyde, dehydrated, clarified with xylene and embedded in paraffin for routine histopathological examination. The paraffin blocks were sectioned into 5- μ m-thick sections with a microtome and stained with haematoxylin-eosin and Wade's stain for acid-fast bacilli. Histopathological slides were analyzed by pathologists and diagnosis was confirmed when histological features of leprosy were visualized and classified according to Ridley & Jopling [23].

DNA extraction:

Ethanol-stored skin or SSS samples were extracted using DNeasy Blood and Tissue - QIAGEN®. Briefly, samples were centrifuged at 2,000 rpm for 10 minutes. The extraction was performed according to protocols described by the manufacturer (QIAGEN). The concentration of DNA in the eluate was determined by spectrophotometer NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific).

Detection of *M. leprae* DNA by qPCR:

For SSS or skin biopsy samples, the qPCR technique is standardized to amplify the 16S rRNA, *M. leprae* specific target using the TaqMan amplification assay [24]. All reactions were performed in triplicates and using the same real-time PCR system (StepOne, Applied Biosystems). Positive controls were used with *M. leprae* titrated DNA and negative controls with water. The cycle threshold value of 0.05 for defining the positive samples were used as described before, where the sample was considered positive when it exhibited Ct \leq 38.5 (3 genomes) in at least two of the three reactions (triplicates) [24-25] and the number of genomes was calculated by interpolating the Ct values using a dilution curve with a known number of *M. leprae* genomes using an excel spreadsheet [26].

Statistical Analysis

Data were used to calculate Odds Ratio (OR) and relative risk (RR) for clinically confirmed leprosy using OpenEpi. Sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value of qPCR were also calculated. Confidence interval were calculated at a level of 95%. In order to assess the impact of PCR and others clinical/demographic

features on HHC prognosis a disease-free survival was performed. Kaplan-Meier curves were designed and Log-rank test was applied to compare curves. All these analyses were made in R environment using survival package.

Results

Of the 2,437 HHCs examined, (Figure 1), 69 (2,8%) had or developed leprosy. At the first contact surveillance visit, 54 HHCs (2,2%) were diagnosed with leprosy by clinical evaluation. In a group of 2,383 remaining contacts, we found other 25 with difficult-to-diagnose leprosy-like skin lesions. These individuals were further investigated using qPCR and histopathology in skin biopsies. These laboratory tests confirmed leprosy in 8 patients, while other 17 were diagnosed with other dermatological diseases (ODD). Noteworthy, 50% of these lesions were qPCR positive in leprosy patients (4/8), while only 6% were positive in ODD (1/17) (Figure 1). The analysis indicates that a positive qPCR result in the skin has a very high odds of being leprosy (OR=16, CI=1.38-185.4). The data shows a moderate sensitivity of 50% (CI=0.14-0.86) and high specificity (94%, CI=0.69-0.99) when skin biopsy was used for molecular diagnosis of suspected contacts with leprosy-like lesions.

Of the 2,358 HCCs who did not have any lesions, 797 did not agree to donate samples and remain in the study. Among those, 795 remained healthy and 2 (under 12 years/old) developed leprosy, during follow-up.

A total 1,561 HHCs had slit skin smears samples of the ear lobes collected for qPCR between 2011-2018. For a cohort study, we fixed the recruitment from 2011-2015 and followed them up of minimum of 3 years and maximum of 7 years. A total of 955 contacts were included and analyzed for PCR, while five (0.5%) progressed towards leprosy. Only one of these incident cases had positive qPCR (20%) in slit skin smear. Among HHCs that remained healthy after follow-up, 9% were qPCR positive (85/950) (Figure 1). The relative risk (RR) to predict leprosy progression in this group was not statistically significant (RR= 2.52; CI= 0.28-22.35).

Accordingly, both qPCR tests showed a high negative predictive value (NPV), 80% for skin biopsy and 99% for slit skin scraping. The positive predictive value (PPV) were 80% and 1%, respectively. Positive predictive value (PPV) indicates the proportion of positives results that developed clinical leprosy. In this study the Skin biopsy PCR test were higher PPV due to a high specificity and a moderate sensibility.

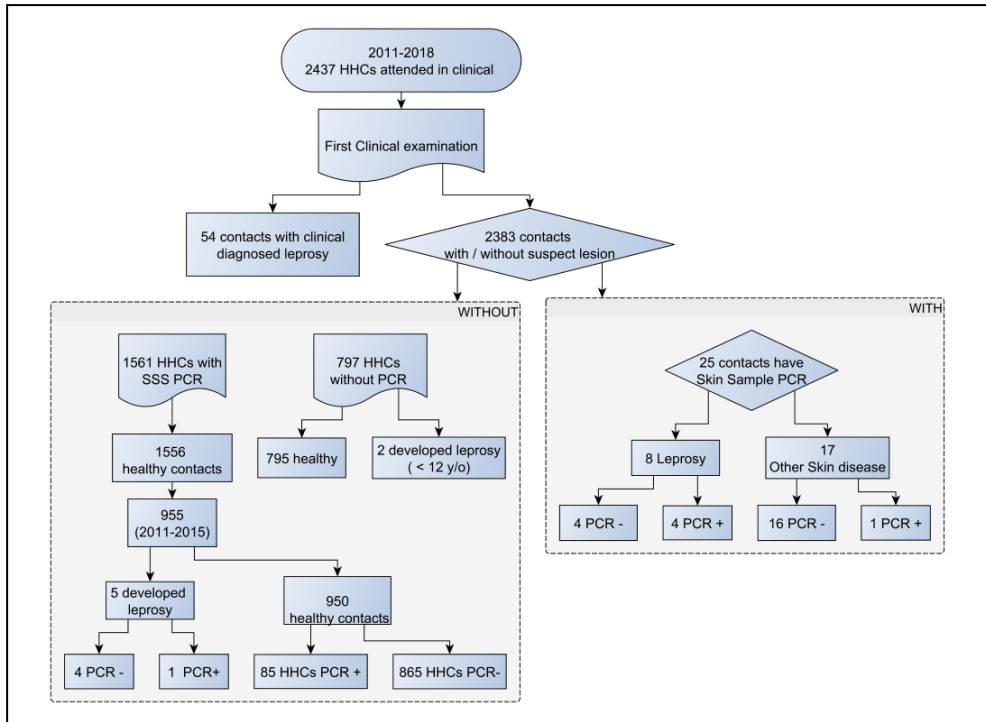


Figure 1. Flowchart of HHCs consultation in ASA between 2011-2017.

A summary of the healthy contacts followed up (n=950) and the contacts that developed leprosy (n=69) is presented at table 1. Of these, 54 HHCs were diagnosed with leprosy by clinical evaluation, 8 were further diagnosed with suspicious of a leprosy-like lesion. Seven contacts developed leprosy during follow up.

Table 1. Clinical and epidemiological characteristics of household contacts of leprosy patients cohort at Oswaldo Cruz Foundation clinic in Rio de Janeiro, 2011-2018.

Variables	Healthy contacts of Cohort study with qPCR in SSS (n=950)	Co-prevalent with qPCR in skin biopsy (n=8)	Co-prevalent without qPCR in skin biopsy (n=54)	Incident with qPCR in SSS (n=5)	Incident without qPCR in SSS (n=2)
Gender					
Male	382	5	20	2	1
Female	568	3	34	3	1
Age					
1-15 years	95	0	12	0	2
16-30 years	259	2	10	0	0
31-45 years	319	3	12	1	0
46-60 years	175	2	10	0	0
> 60 years	102	1	10	4	0
Clinical Form from Index Case					
TT	21	0	0	1	0
BT	240	0	10	1	0
BB	115	1	1	0	0
BL	269	5	7	1	1
LL	243	2	35	2	1
I	31	0	1	0	0
PN	31	0	0	0	0
Operational Classification of the Index Case					
MB	627	8	43	3	2
PB	323	0	11	2	0
Clinical form of the diagnosed contacts					
TT	0	0	5	0	0
BT	0	6	24	3	1
BB	0	0	4	0	0
BL	0	0	4	1	1
LL	0	0	9	0	0
I	0	2	7	0	0
PN	0	0	1	1	0
Operational Classification of the diagnosed contacts					
MB	0	0	16	1	1
PB	0	8	38	4	1

The group was distributed for sex (F/M = 1.42:1) and age categories (1-100 years old). We evaluated disease-free survival analyses for the respective variables: PCR, age at the beginning of the follow-up, index case classification and gender (Figure 2). Data indicates that age at beginning of follow-up showed significant impact on survival being the hazard ratio (HR) equals 32 (95% CI; 3 – 290). This is a very important result that could help manage contact surveillance.

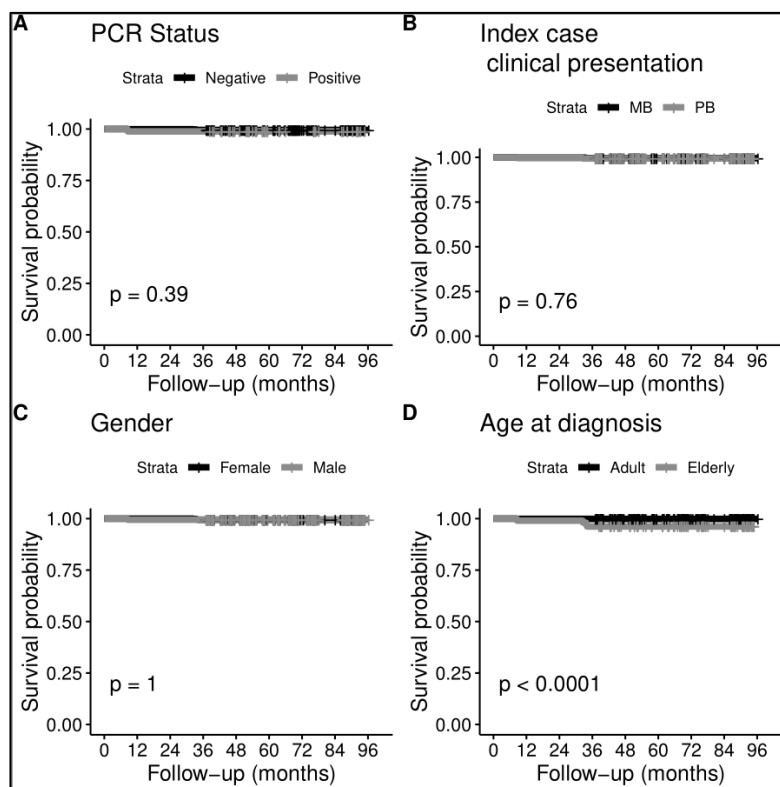


Figure 2- Kaplan-Meier plots of disease-free survival variables: PCR results (A), index case classification (B), gender (C) and age at the beginning of the follow up (D) of HHCs of the cohort study. To assess differences between curves the Log Rank test was performed and $p < 0.05$ was considered significant.

A box-plot indicate that contacts older than 60 years have a high risk of progress towards the disease (Figure 3).

Among the 69 contacts that were diagnosed with leprosy, eighteen co-prevalent contacts (0.7%) presented MB leprosy and 51 (2.1%) PB leprosy. Two incident contacts (0.1%) progressed towards MB leprosy and 5 (0.2%) developed PB leprosy. Eighty percent (56/69) of the contacts diagnosed with leprosy had a multibacillary case as the index patient. Among of contacts that had or developed leprosy (69/2.437), 74% (51/69) were diagnosed with PB forms of leprosy.

For the cohort study, among the 950 subjects, 9% were positive for SSS qPCR. These were stratified according to the clinical form of the index case, a positivity rate of 6.3% for HHC of paucibacillary cases and 2.7% for multibacillary index cases. Among of 5 incident cases, 75% were diagnosed with PB forms of leprosy.

In addition, the median of genome counts did not vary in these HHC samples (7 for PB and 8 for MB index patients). Among the five contacts who progressed towards the disease, genome count for the only contact was positive for SSS qPCR was 7 genomes.

Discussion

Here, we used qPCR in two different approaches to support leprosy early diagnosis: i) we verified whether qPCR could be employed to support diagnostic confirmation in household contacts with suspicious skin lesions; and ii) to test among healthy individuals whether positivity could be used as predictive markers of disease progression. Unfortunately, the use positivity of SSS earlobes in healthy contacts does not appear to be a good predictive marker of disease progression. Nevertheless, a positive qPCR in skin biopsy can be considered a strong confirmation of leprosy when household contacts presents with leprosy-like skin lesions. In this case, the risk analysis confirmed that a positive qPCR test has a significant chance of being leprosy with high specificity and reasonable sensitivity. So, data indicates that qPCR support the use routine screening of difficult-to-diagnose suspected patients. We also observed that, the most contacts that had or progressed to leprosy (78%) were diagnosed with PB forms of leprosy. Here, we confirm our previous findings where the use of qPCR in paucibacillary leprosy improve the precision in diagnosis [25, 26].

On the other hand, when we followed up a population of healthy contacts, we detected 10.7% tested positive for *M. leprae* DNA, although less informative. Indeed, few studies reported PCR positivity using SSS from earlobes but contact screening using nasal swabs, positivity ranges from 4 to 16% [27-29], while peripheral blood cell qPCR detection is lower, 1.2% [30]. Different biological samples and *M. leprae* targets can affect the variability of PCR positivity in contacts of leprosy patients. Indeed, the sensitivity of the qPCR test in the SSS of household contacts was low (20%), but higher than previously published in other studies [27-30]. More recently, the screening PCR positivity in the blood of positive for PGL-I contacts increased the rate of PCR positivity and authors

found 40% qPCR positivity in this group. Nevertheless, authors fail to provide a follow-up to evaluate those who progressed towards leprosy [31]. Our data clearly demonstrate that qPCR alone is not a good estimate to infer the risk for a contact to develop leprosy. Also, the use of the number of genomes failed to predict disease progression. Maybe combination of PGL-I, qPCR and likely other markers could provide better estimates, although the cost-effectiveness of these laboratory tests also needs to be assessed.

The literature suggests that the risk to develop the disease is higher among HHC that present an index multibacillary patient [2, 3, 32-34]. In this study, we also found a similar result. Therefore, the clinical form of the index case does not impact the SSS qPCR positivity. The same percentage of genomes was detected in contacts exhibiting PB or MB index patients. Thus, the qPCR positivity cannot be correlated with level of exposition or infection.

In the past few years, chemoprophylactic protocols are being tested and maybe a careful dermato-neurological examination along with the use of qPCR screening for those with leprosy-like lesions could help precise and early diagnosis. Thus, all other HHCs without leprosy-like skin lesions could be included in chemo- or immunoprophylactic regimens. Unfortunately, we still need a test to narrow down the high-risk contacts who would need chemoprophylactic treatment in a way that we would preclude unnecessary treatments to healthy individuals who are not under risk to develop leprosy [8]. Indeed, chemoprophylactic protocols should be followed very carefully among contacts from leprosy patients since the duration of this protection and the targeted audience concerning the cost-effectiveness is always an issue [35]. Indeed, new predictions suggest that a test that improve in 50% new case detection rate could impact leprosy transmission [36-37]. Here, qPCR showed 20% positivity among progressors, while PGL-I revealed poorer results [10,37].

We recently found that the availability of qPCR in the routine of our clinic improved the ability to early diagnose leprosy in patients suspected of PB leprosy [38]. Our study corroborates the fact that the epidemiological surveillance of HHC is extremely important for early detection of the disease, although the use of qPCR does not help to predict leprosy progression. The standardization and implementation of more sensitive, accurate and effective tools that help in confirming the diagnosis are necessary.

Acknowledgments

The authors are grateful to the entire team of dermatologists, nurses and technicians that collaborate at the Souza Araújo Outpatient Clinic and the Leprosy Laboratory.

Financial Support

This study was supported with grants from: Leprosy Research International (LRI), Foundation for Research Support of the State of Rio de Janeiro (FAPERJ), Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Brazilian Coordination for Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), and by the National Fund for Health/Brazilian Ministry of Health.

Transparency Declaration

All authors declare no conflicts of interest.

References

- 1- Gillini L, Cooreman E, Wood T, Pemmaraju VR, Saunderson P (2017) Global practices in regard to implementation of preventive measures for leprosy. *PLoS Negl Trop Dis* 11(5): e0005399. pmid: 28472183
- 2- [Sales AM](#), [Ponce de Leon A](#), [Düppre NC](#), [Hacker MA](#), [Nery JA](#), Sarno EN, et al. (2011) Leprosy among Patient Contacts: A Multilevel Study of Risk Factors. *PLoS Negl Trop Dis* 5(3): e1013. pmid: 21423643
- 3- [Sarno EN](#), [Düppre NC](#), [Sales AM](#), [Hacker MA](#), [Nery JA](#), de [Matos HI](#) (2012) Leprosy exposure, infection and disease: a 25-year surveillance study of leprosy patient contacts. [Mem Inst Oswaldo Cruz](#) 107(8): 1054-9. pmid: 23295758
- 4- [Dos Santos DS](#), [Düppre NC](#), [Sales AM](#), [Hacker MA](#), [Nery JA](#), Sarno EM, et al. (2013) Kinship and Leprosy in the Contacts of Leprosy Patients: Cohort at the Souza Araújo Outpatient Clinic, Rio de Janeiro, RJ, 1987-2010. [J Trop Med](#) 2013: 596316. pmid: 23690793

- 5- Ezenduka C, Post E, John S, Suraj A, Namadi A, Onwujekwe O (2012) [Cost-effectiveness analysis of three leprosy case detection methods in Northern Nigeria](#). PLoS Negl Trop Dis 6(9): e1818. pmid: 23029580
- 6- Pedrosa VL, Dias LC, Galban E, Leturiondo A, Palheta J Jr, Santos M, et al. (2018) Leprosy among schoolchildren in the Amazon region: A cross-sectional study of active search and possible source of infection by contact tracing. PLoS Negl Trop Dis 12(2): e0006261. pmid: 29481570
- 7- Smith CS, Aerts A, Kita E, Virmond M (2016) Time to define leprosy elimination as zero leprosy transmission? Lancet Infect Dis 16(4): 398-9. pmid 27036335
- 8- Steinmann P, Reed SG, Mirza F, Hollingsworth TD, Richardus JH (2017) Innovative tools and approaches to end the transmission of Mycobacterium leprae. Lancet Infect Dis 17(9): e298-e305. pmid: 28693856
- 9- Dos Santos DS, Duppre NC, Sarno EN, Pinheiro RO, Sales AM, Nery JADC, et al. (2018) [Chemoprophylaxis of leprosy with rifampicin in contacts of multibacillary patients: study protocol for a randomized controlled trial](#). Trials 19(1): 244. pmid: 29685164
- 10- [Penna ML](#), [Penna GO](#), [Iglesias PC](#), [Natal S](#), [Rodrigues LC](#) (2016) Anti-PGL-1 Positivity as a Risk Marker for the Development of Leprosy among Contacts of Leprosy Cases: Systematic Review and Meta-analysis. [PLoS Negl Trop Dis](#) 10(5): e0004703. pmid: 27192199
- 11- Hungria EM, Oliveira RM, Penna GO, Aderaldo LC, Pontes MA, Cruz R, et al. (2016) [Can baseline ML Flow test results predict leprosy reactions? An investigation in a cohort of patients enrolled in the uniform multidrug therapy clinical trial for leprosy patients in Brazil](#). Infect Dis Poverty 5(1): 110. pmid: 27919284
- 12- Freitas AA, Oliveira RM, Hungria EM, Cardoso LP, Sousa AL, Costa MB, et al. (2015) [Alterations to antigen-specific immune responses before and after multidrug therapy of leprosy](#). Diagn Microbiol Infect Dis 83(2): 154-61. pmid: 26233487

- 13-Moura RS, Calado KL, Oliveira ML, Bühner-Sékula S (2008) Leprosy serology using PGL-I: a systematic review. *Rev Soc Bras Med Trop* 41. pmid:19618069
- 14-Truman RW, Andrews PK, Robbins NY, Adams LB, Krahenbuhl JL, Gillis TP (2008) Enumeration of *Mycobacterium leprae* using real-time PCR. *PLoS Negl Trop Dis* 2(11): e328. pmid: 18982056
- 15-Martinez AN, Talhari C, Moraes MO, Talhari S (2014) PCR-based techniques for leprosy diagnosis: from the laboratory to the clinic. *PLoS Negl Trop Dis* 8(4): e2655. pmid: 24722358
- 16-Patrocínio LG, Goulart IM, Goulart LR, Patrocínio JA, Ferreira FR, Fleury RN (2005) Detection of *Mycobacterium leprae* in nasal mucosa biopsies by the polymerase chain reaction. *FEMS Immunol Med Microbiol* 44(3): 311-6. pmid: 15907454
- 17-Goulart LR, Goulart IM (2009) Leprosy pathogenetic background: a review and lessons from other mycobacterial diseases. [Arch Dermatol Res](#) 301(2): 123-37. pmid: 19043725
- 18-Woods SA, Cole ST (1989) A rapid method for the detection of potentially viable *Mycobacterium leprae* in human biopsies: a novel application of PCR. *FEMS Microbiol Lett* 53(3): 305-9. pmid: 2693204
- 19-Santos AR, De Miranda AB, Sarno EN, Suffys PN, Degrave WM (1993) Use of PCR-mediated amplification of *Mycobacterium leprae* DNA in different types of clinical samples for the diagnosis of leprosy. [J Med Microbiol](#) 39(4): 298-304. pmid: 8411091
- 20-Scollard DM, Gillis TP, Williams DL (1998) Polymerase chain reaction assay for the detection and identification of *Mycobacterium leprae* in patients in the United States. [Am J Clin Pathol](#) 109(5): 642-6. pmid: 9576586

- 21-Donoghue HD, Holton J, Spigelman M (2001) PCR primers that can detect low levels of Mycobacterium leprae DNA. [J Med Microbiol](#) 50(2): 177-82. pmid: 11211226
- 22-[Goulart IM](#), [Cardoso AM](#), [Santos MS](#), [Gonçalves MA](#), [Pereira JE](#), [Goulart LR](#) (2007) Detection of Mycobacterium leprae DNA in skin lesions of leprosy patients by PCR may be affected by amplicon size. [Arch Dermatol Res](#) 299(5-6): 267-71. pmid: 17530267
- 23-Ridley DS, Jopling WH (1966) Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. [Int J Lepr Other Mycobact Dis](#) 34(3): 255-73. pmid: 5950347
- 24-Martinez AN, Lahiri R, Pittman TL, Scollard D, Truman R, Moraes MO, et al. (2009) Molecular determination of Mycobacterium leprae viability by use of real-time PCR. [J Clin Microbiol](#) 47(7): 2124-30. pmid: 19439537
- 25-[Martinez AN](#), [Ribeiro-Alves M](#), [Sarno EN](#), [Moraes MO](#) (2011) Evaluation of qPCR-based assays for leprosy diagnosis directly in clinical specimens. [PLoS Negl Trop Dis](#) 5(10): e1354. pmid: 22022631
- 26-Barbieri RR, Sales AM, Illarramendi X, Moraes MO, Nery JA, Moreira SJ, et al. (2014) Diagnostic challenges of single plaque-like lesion paucibacillary leprosy. [Mem Inst Oswaldo Cruz](#) 109(7): 944-7. pmid: 25411000
- 27-Job CK, Jayakumar J, Kearney M, Gillis TP (2008) Transmission of leprosy: a study of skin and nasal secretions of household contacts of leprosy patients using PCR. [Am J Trop Med Hyg](#) 78(3): 518-21. pmid: 18337353
- 28-Cardona-Castro N, Beltrán-Alzate JC, Manrique-Hernández R (2008) [Survey to identify Mycobacterium leprae-infected household contacts of patients from prevalent regions of leprosy in Colombia](#). [Mem Inst Oswaldo Cruz](#) 103(4): 332-6. pmid: 18660985

- 29-[Romero-Montoya M](#), [Beltran-Alzate JC](#), [Cardona-Castro N](#) (2017) Evaluation and Monitoring of Mycobacterium leprae Transmission in Household Contacts of Patients with Hansen's Disease in Colombia. [PLoS Negl Trop Dis](#) 11(1): e0005325. pmid: 28114411
- 30-[Reis EM](#), [Araujo S](#), [Lobato J](#), [Neves AF](#), [Costa AV](#), [Gonçalves MA](#), et al. (2014) Mycobacterium leprae DNA in peripheral blood may indicate a bacilli migration route and high-risk for leprosy onset. [Clin Microbiol Infect](#) 20(5): 447-52. pmid: 24033793
- 31-Santos DFD, Mendonça MR, Antunes DE, Sabino EFP, Pereira RC, Goulart LR, Goulart IMB. Molecular, immunological and neurophysiological evaluations for early diagnosis of neural impairment in seropositive leprosy household contacts. [PLoS Negl Trop Dis](#). 2018 May 21;12(5):e0006494.
- 32-van Beers SM, Hatta M, Klatser PR (1999) [Patient contact is the major determinant in incident leprosy: implications for future control](#). [Int J Lepr Other Mycobact Dis](#) 67(2): 119-28. pmid: 10472363
- 33-Pinto Neto JM, Villa TCS, Mencaroni DA, Gonzáles RC, Gazeta CE (2002) Considerações epidemiológicas referentes ao controle dos comunicantes de hanseníase. [Hansen Int](#) 27(1): 23-28.
- 34-[de Matos HJ](#), [Duppre N](#), [Alvim ME](#), [MachadoVieira LM](#), [Sarno EN](#), [Struchiner CJ](#) (1999) Leprosy epidemiology in a cohort of household contacts in Rio de Janeiro (1987-1991). [Cad Saude Publica](#) 15(3): 533-42.
- 35-[Moet FJ](#), [Oskam L](#), [Faber R](#), [Pahan D](#), [Richardus JH](#). A study on transmission and a trial of chemoprophylaxis in contacts of leprosy patients: design, methodology and recruitment findings of COLEP. [Lepr Rev](#). 2004 Dec;75(4):3
- 36-Blok DJ, de Vlas SJ, Geluk A, Richardus JH. Minimum requirements and optimal testing strategies of a diagnostic test for leprosy as a tool towards zero

transmission: A modeling study. PLoS Negl Trop Dis. 2018 May 25;12(5): e0006529.

37-[Richardus RA](#), [van der Zwet K](#), [van Hooij A](#), [Wilson L](#), [Oskam L](#), [Faber R](#), et al. (2017) Longitudinal assessment of anti-PGL-I serology in contacts of leprosy patients in Bangladesh. [PLoS Negl Trop Dis](#) 11(12): e0006083. pmid: 29228004

38-Barbieri RR, Manta FSN, Moreira SJM, Sales AM, Nery JAC, Nascimento LPR, Hacker MA, Pacheco AG, Machado AM, Sarno EN, Moraes M. O. Quantitative polymerase chain reaction in paucibacillary leprosy diagnosis: a follow-up study. PLoS Neglected Dis (in press).

6 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo mostraram que a proporção de pacientes encaminhados ao ambulatório Souza Araújo com diagnóstico de outras dermatoses cresceu após a descentralização do controle da doença, enquanto a frequência de casos de hanseníase diminuiu. Entretanto, houve aumento na porcentagem de casos diagnosticados com incapacidades físicas. O uso da qPCR aumentou a sensibilidade do diagnóstico das formas paucibacilares da doença, embora os dados tenham indicado que não foi uma boa ferramenta para avaliar o risco de adoecimento nos contatos.

A queda na porcentagem de casos de hanseníase e o aumento na proporção de pacientes com outras doenças de pele atendidos no ambulatório, somado ao fato de que em 74% destes casos não houve necessidade de biópsia para determinar o diagnóstico, podem ser um sinal da dificuldade enfrentada pelos profissionais da rede básica de saúde em fazer diagnóstico diferencial entre hanseníase e outras dermatoses. Henry *et al.*, em um estudo desenvolvido em 3 centros de referência em 3 estados do Brasil concluíram que entre os fatores de diagnóstico tardio associado ao sistema de saúde, o erro diagnóstico foi o mais frequente: 42% dos pacientes relataram ter recebido um diagnóstico de outra doença antes do diagnóstico de hanseníase (Henry *et al.*, 2016).

Nas recentes recomendações da Organização Mundial da Saúde o diagnóstico precoce associado ao tratamento adequado são considerados fundamentais para o controle da doença. Isso porque a PQT não é capaz de interromper a cadeia de transmissão quando o diagnóstico é tardio (Gillini *et al.*, 2017). Os dados epidemiológicos mundiais que demonstram a incidência praticamente estável nos últimos 20 anos confirmam essa hipótese (WHO, 2018a). A orientação da OMS é de que a detecção de novos casos deve ser monitorada e de que a diminuição repentina deste indicador pode ser resultado de subnotificação ou de mudança no índice de suspeição por falta de habilidade e qualificação dos profissionais de saúde envolvidos (WHO, 2016). Alertam que este indicador seja interpretado junto com outros indicadores de qualidade de caso, como proporção GI2 e proporção de crianças entre novos casos.

Neste estudo foi observado uma elevação na proporção de casos que apresentavam algum grau de incapacidade (GI1 e GI2) no momento do diagnóstico no ambulatório da Fiocruz (40% no período deste estudo de 2010-2014 e 32% em um estudo do nosso grupo no período de 2003-2007) (Hacker *et al.*, 2012). Os dados do Ministério da Saúde (Brasil, 2018) mostram que nos últimos anos tem havido elevação

deste indicador no estado do Rio de Janeiro (de 5,8% em 2005 para 13,2% em 2017), juntamente com uma queda na taxa de detecção de casos novos (de 17,72/100.000 hab. em 2005 para 5,58/100.000 hab em 2017). Estes números merecem atenção pois podem ser reflexo de diagnóstico tardio.

Smith *et al.* assinalam que o declínio global na detecção de casos em conjunto com o aumento das incapacidades possa estar ligado ao sub-diagnóstico consequente à mudança das atividades de controle vertical da hanseníase para abordagens integradas (Smith *et al.*, 2015). A capacitação dos profissionais de saúde em relação aos sinais e sintomas de hanseníase é considerado um dos principais fatores para o sucesso da integração das ações de controle da hanseníase à rede de atenção primária a saúde (Visschedijk *et al.*, 2003; Lockwood e Suneetha, 2005; Stafin, Guedes e Mendes, 2018). Entretanto, muitos autores apontam a alta rotatividade destes profissionais e os custos do treinamento como as maiores dificuldades enfrentadas por esta estratégia (Fuzikawa *et al.*, 2010; Medeiros *et al.*, 2010; Penna, Grossi e Penna, 2013; Pimentel *et al.*, 2004; Silveira e Almeida, 2012).

Estudo qualitativo conduzido em um estado da região nordeste do Brasil avaliou como os profissionais das equipes de saúde da família percebiam os efeitos do treinamento recebido no manejo da hanseníase. Na percepção dos participantes, a falta de um curso prático e muita informação em um curto período de tempo levam a insegurança para diagnosticar a doença. A maior dificuldade de suspeição foi referida nos casos paucibacilares e em crianças. A maioria dos médicos relatou que receava tomar decisões clínicas em hanseníase e por isso encaminhavam os casos suspeitos aos serviços de referência (Souza *et al.*, 2015). Na análise da demanda do ambulatório Souza Araújo observamos um aumento na proporção de pacientes referidos ao centro de referência logo após a primeira consulta na unidade básica de saúde.

A percepção dos treinados da baixa efetividade do treinamento clínico de hanseníase pode representar um obstáculo importante à detecção precoce e ao tratamento dos casos da doença (Lima *et al.*, 2008; Souza *et al.*, 2015). Nas regiões em que há a possibilidade de encaminhamento para um centro de referência fica evidente que este apoio é essencial no contexto da integração. Por outro lado, quando este referenciamento não é possível é de se esperar que indivíduos doentes escapem da detecção, contribuindo para a manutenção da transmissão da infecção, assim como pode ocorrer um falso diagnóstico de hanseníase, acompanhado das suas sérias consequências sociais (van Brakel, 2003). Deste modo, é uma prioridade assegurar que

o sistema de saúde seja capaz de identificar os verdadeiros casos com a maior precisão possível.

O desenvolvimento de um teste laboratorial sensível, automatizado e que seja de fácil implementação pode ter um grande impacto na detecção precoce da doença no contexto da descentralização do programa da hanseníase e tem sido considerado prioridade de vários grupos de pesquisa (Geluk *et al.*, 2012; Yan *et al.*, 2014; Martinez *et al.*, 2014; Roset Bahmanyar, *et al.*, 2016). Nesta busca por ferramentas que possam ser realizados em larga escala para detectar infecção subclínica e para diagnosticar a doença, biomarcadores têm sido testados (Duthie *et al.*, 2007; Geluk *et al.*, 2012; Hooij *et al.*, 2017). Entretanto, com a variabilidade na resposta imune contra o *M. leprae*, testes diagnósticos que detectam anti PGL-1 ou anti proteína LID-1 não são adequados para detectar doença nas formas PB, pois estes indivíduos reagem à infecção com uma resposta imune do tipo celular e, portanto, com restrita produção de anticorpos (Oskam, Slim e Buhner-Sekula, 2003; Montoya e Modlin, 2010).

Os resultados de um estudo multicêntrico que detectou os níveis de anti-PGL-I IgM (imunidade humoral), quimiocinas IP-10 e CCL4 (imunidade celular) no sangue de pacientes com hanseníase, contatos e controles sadios mostrou que não são métodos eficazes para o diagnóstico diferencial entre hanseníase e outras dermatoses em áreas endêmicas, já que indivíduos que têm contato com doentes podem ter um perfil semelhante aos casos paucibacilares (Hooij *et al.*, 2018).

A técnica de PCR tem se tornado cada vez mais automatizada. (Martinez *et al.*, 2014, Avanzi, 2018) e nos últimos anos a PCR em tempo real passou a permitir a quantificação de bacilos e o processamento de dezenas de amostras simultaneamente (Martinez *et al.*, 2011). Os métodos de extração de material genético das amostras biológicas também têm evoluído. Avanzi (2018) comparou duas diferentes técnicas de extração de DNA de biópsias, com ou sem lise mecânica, e demonstrou que a sensibilidade da PCR nos PB pode ser maior quando a extração enzimática for precedida de lise mecânica (95,5% e 76,7% respectivamente) o que representa um avanço da técnica.

Há poucos trabalhos avaliando a aplicação da PCR no diagnóstico das formas PB da hanseníase na prática clínica. Em um estudo conduzido no ambulatório de hanseníase da Fiocruz, fruto da minha dissertação de mestrado, a qPCR foi realizada retrospectivamente em amostras de pele de 66 casos suspeitos de hanseníase paucibacilar. Concluímos que se esta técnica tivesse sido usada como ferramenta

diagnóstica naqueles casos, teria evitado que pacientes com diagnóstico histopatológico de outra dermatose e histologia inconclusiva fossem subdiagnosticados ou submetidos a prova terapêutica desnecessariamente (Barbieri *et al.*, 2014). A partir dos resultados deste trabalho, a PCR tem sido rotineiramente utilizada no ambulatório de hanseníase da Fiocruz como ferramenta para o diagnóstico dos casos suspeitos de formas PB.

O segundo estudo desta tese foi uma continuação daquele trabalho. Aqui, estudamos uma grande amostra de pacientes com lesões cutâneas suspeitas de hanseníase paucibacilar e incluímos a evolução clínica dos casos após 1 ano, para estabelecermos, na ausência de um padrão ouro, um padrão mais preciso que os desfechos clínicos e histopatológicos usados até o momento para a análise do desempenho do PCR no diagnóstico dos casos PB. Somente casos com ausência de bacilos na histologia foram incluídos, por isso as alterações epidérmicas e a distribuição do infiltrado linfocitário ou granulomatoso na derme (contornando ou invadindo as estruturas da pele como vasos, anexos e nervos) foram os parâmetros histológicos usados para determinar o diagnóstico diferencial entre hanseníase e outras dermatoses.

Além da dificuldade diagnóstica diante de um infiltrado muitas vezes sem alterações específicas, está relatado na literatura que algumas características histológicas mais frequentes em outras dermatoses como acantose, paraceratose, espongirose e granuloma sem halo linfocitário, podem estar presentes em casos de hanseníase paucibacilar (Jha e Karki, 2010; Nayar, Narayanan e Job, 1972; Liu *et al.* 1982; Azulay, 1971). Assim, não foi surpresa observar neste estudo que, apesar da indiscutível experiência dos patologistas de um centro de referência, a histopatologia foi incapaz de diagnosticar 58% dos casos, sendo que 30% deles tinham PCR positivo. Ou seja, estes doentes com hanseníase não teriam sido detectados e tratados sem a PCR e correriam maior risco de serem diagnosticados com deformidades no futuro. Lucas e Ridley (1989) comentam que histopatologistas não podem ser consistentes no diagnóstico dos casos PB por conta do caráter interpretativo das alterações histológicas, e que a avaliação histológica dos padrões inflamatórios não pode ser automatizada. Os autores concluem que novas técnicas para a identificação da presença do *M. leprae* poderiam apoiar o diagnóstico da hanseníase e preveem a PCR como uma alternativa.

A sensibilidade da qPCR para o diagnóstico da hanseníase demonstrada nos resultados do segundo artigo foi de 57%, coerente com estudo anterior desenvolvido no laboratório de hanseníase da Fiocruz em que foi usado o mesmo alvo (16s) e casos com histopatologia típica como padrão de referência (Martinez *et al.*, 2011). Embora seja uma

sensibilidade moderada, representa um avanço se compararmos com a sensibilidade de 35% da histopatologia que os nossos dados mostraram.

A especificidade de 91% da qPCR observada no nosso estudo pode dever-se ao fato de termos acompanhado casos de cura espontânea, evolução da hanseníase que é bem estabelecida (Ridley e Jopling, 1966; Azulay, 1971). Ainda assim, para seguirmos à risca o protocolo, em que foi definido que remissão da lesão sem tratamento com PQT seria considerado não hanseníase, estes casos foram considerados falsos positivos na nossa análise. Estudos anteriores que avaliam a PCR na hanseníase mostram especificidade de 100% mas se baseiam em controles negativos previamente conhecidos (amostras biológicas de outras doenças dermatológicas ou de indivíduos saudáveis) (Azevedo *et al.*, 2017, Martinez *et al.*, 2014) enquanto no nosso trabalho todos os pacientes apresentavam lesões cutâneas suspeitas das formas PB e quase metade deles referiam ter tido contato com doentes de hanseníase.

Recentemente, novas micobactérias têm sido descritas e relacionadas à doenças granulomatosas. Dois exemplos são o *Micobacterium uberis*, como agente etiológico de lesões granulomatosas em tetas de vacas (Benjak *et al.*, 2018), e o *Micobacterium lepromatosis*, espécie identificada como causadora de hanseníase lepromatosa difusa (Han *et al.*, 2008). O *M. lepromatosis* pode ser detectado pelo 16s, alvo usado no nosso estudo e até recentemente considerado específico do *M. leprae*. Estas descobertas alertam para a possibilidade de que micobactérias ainda não identificadas possam afetar a especificidade da PCR.

O grande desafio para a validação de testes para o diagnóstico da hanseníase é que não existe um padrão ouro já que a bactéria não é cultivável. Além disso, tanto hanseníase como outras dermatoses que fazem diagnóstico diferencial com as formas PB (ex: eczemátides, granuloma anular) podem regredir espontaneamente (Azulay, 2007). Outro fator que contribui para a dificuldade é que a dapsona, medicamento que faz parte da PQT, tem sido usada com bons resultados para tratar uma série de doenças dermatológicas como rosácea, granuloma anular, granuloma facial, síndrome de Sweet etc. (Zhu and Stiller, 2011; Rivero e Whitfeld, 2018). Considerando que estas dermatoses acima citadas frequentemente recidivam, acreditamos que o *follow up* possa ter aumentado a precisão do padrão de referência.

Há um consenso de que um teste que identifique tanto hanseníase como infecção subclínica é um pré-requisito para a interrupção da transmissão do *M. leprae* e a eliminação da doença (London, 2012, WHO, 2012, Steinmann *et al.*, 2017). Um teste

rápido molecular para o diagnóstico da tuberculose pulmonar, o Genexpert, já é uma realidade (Boehme *et al.*, 2010). Steingart *et al.*, realizaram uma metanálise que incluiu 21 estudos em que o GeneXpert foi avaliado em casos com baciloscopia negativa. Estes autores demonstraram que a sensibilidade do teste variou de 43% a 100% sendo a sensibilidade agregada de 67%. Relatam também que a avaliação do GeneXpert em programas de triagem ressaltam a mínima necessidade de infra-estrutura e treinamento (Steingart *et al.*, 2013). Um outro estudo constata que este teste executado por enfermeiros em clínicas de cuidados primários obteve sensibilidade semelhante (83,3%) ao alcançado quando o GeneXpert foi realizado por técnicos em laboratórios de nível central (83,2%) (Theron, 2013).

Um solução similar pode ser possível também para hanseníase. Um kit padronizado já está sendo elaborado pelo Laboratório de Hanseníase da Fiocruz que para garantir maior especificidade foi desenvolvido usando a combinação de RLEP (específico para *M.leprae*), 16S (identifica *M.leprae* e *M.lepromatosis*) e 18S (*detecção de DNA de mamífero*) (Fernanda Manta comunicação pessoal).

Uma das limitações para o uso da técnica da PCR em unidades de saúde com pouca estrutura é que a biópsia cutânea, considerada a amostra biológica mais sensível para o diagnóstico dos casos com baixa carga bacilar (Avanzi, 2018), é um procedimento médico que depende de treinamento e ambiente adequados. Com o objetivo de encontrar uma forma menos invasiva de coletar fragmentos de pele para a PCR avaliaremos o uso de um punch de 0,5mm no ambulatório Souza Araújo nos próximos meses.

Outras ferramentas de diagnóstico têm sido inseridas na dermatologia e podem representar uma alternativa para auxiliar o diagnóstico da hanseníase. A detecção precoce do melanoma tem se beneficiado de tecnologias avançadas que utilizam imagens de lesões de pele e programas de inteligência artificial. Estudos têm demonstrado que esta tecnologia é capaz de diferenciar lesões benignas e outros carcinomas cutâneos de melanoma com um nível de competência comparável ao dos dermatologistas (Esteva *et al.*, 2017). Neste momento, estamos participando de um projeto, desenvolvido no ambulatório Souza Araújo, que visa a captação de imagens digitais de alta resolução de lesões cutâneas de hanseníase e de outras dermatoses. O desenvolvimento de um aplicativo utilizando estas imagens adicionadas aos dados clínico e epidemiológicos tem o potencial de contribuir na triagem de casos suspeitos da doença.

No terceiro artigo estudamos o papel da qPCR na identificação dos contatos com maior risco de adoecer. Os nossos resultados mostraram que a qPCR, não foi um bom teste para estimar o risco de adoecimento entre os contatos. Reis *et al.* (2014) realizaram PCR no sangue dos contatos no momento do diagnóstico do caso índice e relataram um risco 14,78 vezes maior de adoecimento nos contatos com PCR positiva, mas com uma sensibilidade do teste muito baixa (11,5%). É importante lembrar que a avaliação da progressão para doença é dificultada pela sua baixa frequência (poucos contatos adoecem) e o longo tempo de incubação, o que requer um estudo com acompanhamento longo. Portanto, um estudo com uma amostra e um tempo de acompanhamento maiores pode ser necessário para confirmar ou refutar a nossa conclusão. Assim, até o momento, o exame clínico dos contatos e a conscientização desta população em relação aos sinais e sintomas da hanseníase continuam sendo as estratégias possíveis para aumentar a identificação de progressão da doença neste grupo (Brasil, 2016).

Os dados deste terceiro estudo nos mostraram também que a cuidadosa vigilância dos contatos e o suporte oferecido por ferramentas de diagnóstico como a qPCR aumentaram a chance de diagnóstico precoce nos contatos no centro de referência. Entre os contatos que adoeceram (coprevalente e incidentes) 78% foram diagnosticados com formas PB da hanseníase.

Um dos prováveis motivos para que a hanseníase ainda se mantenha como um problema de saúde pública entre nós e em outras regiões do mundo é a crença generalizada, mas equivocada, de que a doença foi eliminada, o que resultou na diminuição do compromisso político e financeiro necessário para conter a transmissão (Steinmann *et al.*, 2017). De fato, a hanseníase está presente no Brasil e tem havido piora de alguns indicadores em regiões onde a doença já havia sido considerada eliminada (Nazário *et al.*, 2017). No mundo, com constante migrações, novos casos têm sido diagnosticados em países onde há décadas não havia registro de casos (WHO, 2018a). A doença continua acometendo, sobretudo, adultos jovens, acarretando altos custos econômicos, tanto diretos, relacionados ao tratamento e à reabilitação, quanto indiretos, pela perda de anos produtivos e pelas consequências impostas pelo estigma social ainda associado à doença.

A implementação de estratégias e desenvolvimento de ferramentas que auxiliem no diagnóstico de casos de evolução recente é crucial para o controle da hanseníase. Este estudo demonstrou que a qPCR aumenta a precisão do diagnóstico das formas

paucibacilares e que o apoio do centro de referência na elucidação dos casos suspeitos é fundamental no contexto da política de descentralização do programa da doença.

Com base nos nossos resultados sugerimos um possível fluxograma para inclusão da PCR como ferramenta de apoio ao diagnóstico da hanseníase nos centros de referência.

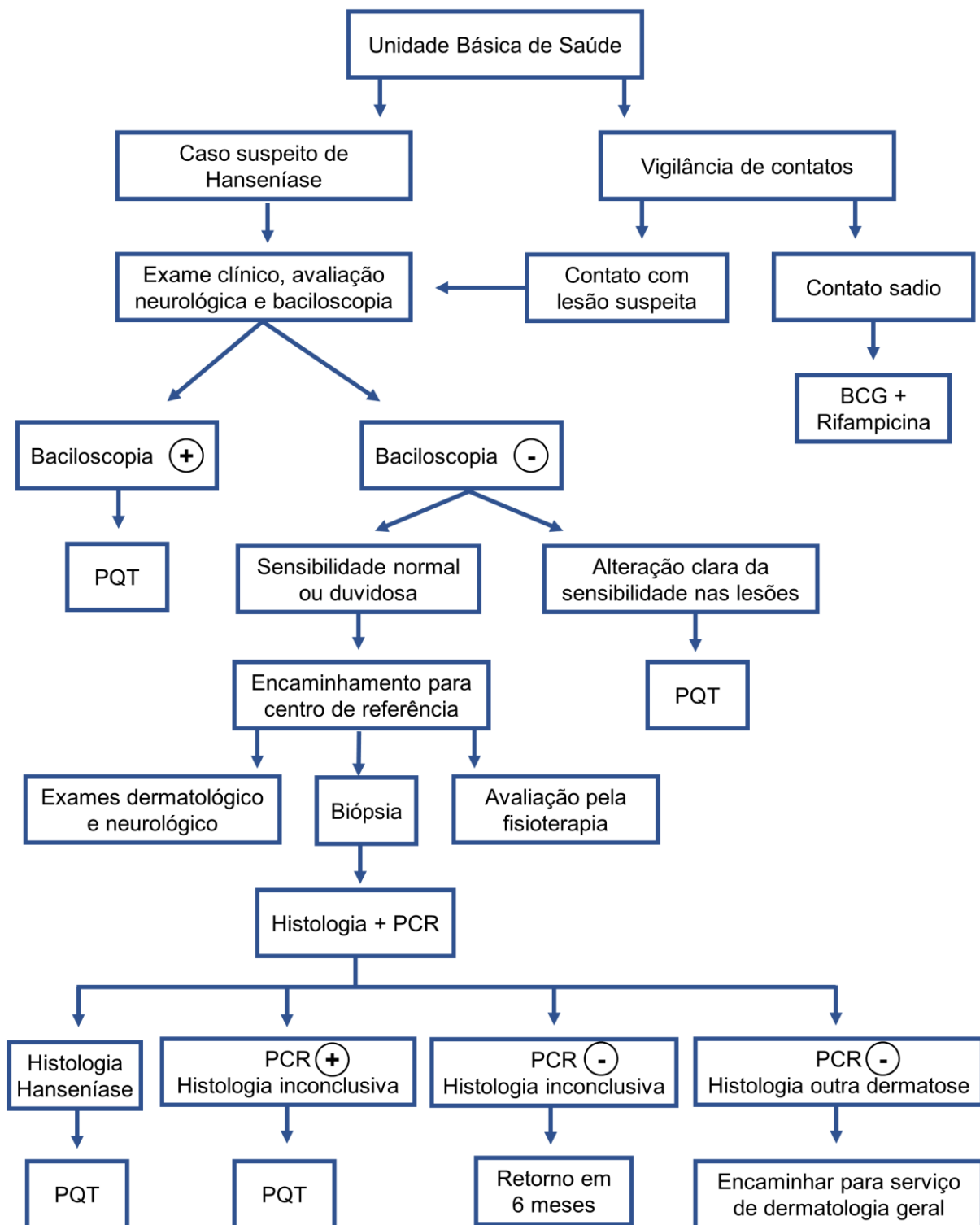


Figura 1: Fluxograma de conduta para os casos suspeitos de hanseníase e seus comunicantes

7 CONCLUSÕES

Artigo 1: Impacto de um centro de referência no controle da hanseníase no contexto da política de descentralização.

- A elevação na proporção de pacientes que visitaram somente um serviço de saúde antes de centro de referência indica que os pacientes com lesões cutâneas estão sendo prontamente encaminhados ao centro de referência.
- O aumento da proporção de casos de outras dermatoses referenciados ao ambulatório Souza Araújo sugere uma dificuldade dos profissionais de saúde da rede de atenção primária de diferenciar dermatoses comuns de hanseníase com a capacitação recebida.
- O aumento da frequência dos casos novos diagnosticados com algum grau de incapacidade na demanda do ambulatório do centro de referência da Fiocruz pode indicar atraso no diagnóstico.
- O Centro de referência oferece um suporte essencial a rede de atenção primária de saúde dentro da estrutura estabelecida pela descentralização do programa de controle da hanseníase.

Artigo 2: Reação em cadeia da polymerase no diagnóstico da hanseníase paucibacilar: um estudo de follow up.

- A sensibilidade do exame histopatológico é baixa nos casos paucibacilares da hanseníase.
- A PCR aumenta a precisão do diagnóstico dos casos de hanseníase paucibacilar.
- A associação da histopatologia com a PCR é a melhor estratégia para a investigação de casos suspeitos de hanseníase paucibacilar.

Artigo 3: Reação em cadeia da polimerase para monitoramento e diagnóstico dos contatos de pacientes com hanseníase

- A qPCR de raspado dérmico não se mostrou uma ferramenta eficaz como preditivo de adoecimento entre os contatos sadios de pacientes com hanseníase.
- A qPCR auxilia o diagnóstico precoce nos contatos com lesão cutânea suspeita de hanseníase.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida EC, Martinez AN, Maniero VC, Sales AM, Duppre NC, Sarno EN, et al. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA by polymerase chain reaction in the blood and nasal secretion of Brazilian household contacts. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2004;99(5):509-11.

Araujo S, Freitas LO, Goulart LR, Goulart IM. Molecular Evidence for the Aerial Route of Infection of *Mycobacterium leprae* and the Role of Asymptomatic Carriers in the Persistence of Leprosy. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2016;63(11):1412-20.

Araujo S, Lobato J, Reis Ede M, Souza DO, Goncalves MA, Costa AV, et al. Unveiling healthy carriers and subclinical infections among household contacts of leprosy patients who play potential roles in the disease chain of transmission. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2012;107 Suppl 1:55-9.

Arole S, Premkumar R, Arole R, Maury M, Saunderson P. Social stigma: a comparative qualitative study of integrated and vertical care approaches to leprosy. *Leprosy review*. 2002;73(2):186-96.

Arunagiri K, Sangeetha G, Sugashini PK, Balaraman S, Showkath Ali MK. Nasal PCR assay for the detection of *Mycobacterium leprae* *pra* gene to study subclinical infection in a community. *Microbial pathogenesis*. 2017;104:336-9.

Avanzi C. Genomics: a Swiss army knife to fight leprosy. *Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne: EPFL*; 2018.

Avanzi C, Del-Pozo J, Benjak A, Stevenson K, Simpson VR, Busso P, et al. Red squirrels in the British Isles are infected with leprosy bacilli. *Science*. 2016;354(6313):744-7.

Azevedo MC, Ramuno NM, Fachin LR, Tassa M, Rosa PS, Belone AF, et al. qPCR detection of *Mycobacterium leprae* in biopsies and slit skin smear of different leprosy clinical forms. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*. 2017;21(1):71-8.

Azulay RD. Histopathology of skin lesions in leprosy. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association*. 1971;39(2):244-50.

Azulay RD, Azulay DA. *Dermatologia*. 2ª Ed. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997. p. 174-84.

Bakker MI, Hatta M, Kwenang A, Van Mosseveld P, Faber WR, Klatser PR, et al. Risk factors for developing leprosy--a population-based cohort study in Indonesia. *Leprosy review*. 2006;77(1):48-61.

Barbieri RR, Sales AM, Illarramendi X, Moraes MO, Nery JA, Moreira SJ, et al. Diagnostic challenges of single plaque-like lesion paucibacillary leprosy. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2014;109(7):944-7.

Becx-Bleumink M, Berhe D. Occurrence of reactions, their diagnosis and management in leprosy patients treated with multidrug therapy; experience in the leprosy control program of the All Africa Leprosy and Rehabilitation Training Center (ALERT) in Ethiopia. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association*. 1992;60(2):173-84.

Benjak A, Avanzi C, Benito Y, Breyse F, Chartier C, Boschioli ML, et al. Highly Reduced Genome of the New Species *Mycobacterium uberis*, the Causative Agent of Nodular Thelitis and Tuberculoid Scrotitis in Livestock and a Close Relative of the Leprosy Bacilli. *mSphere*. 2018;3(5).

Benjak A, Avanzi C, Singh P, Loiseau C, Girma S, Busso P, et al. Phylogenomics and antimicrobial resistance of the leprosy bacillus *Mycobacterium leprae*. *Nature communications*. 2018;9(1):352.

Binford CH. The histologic recognition of the early lesions of leprosy. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association*. 1971;39(2):225-30.

Blok DJ, de Vlas SJ, Geluk A, Richardus JH. Minimum requirements and optimal testing strategies of a diagnostic test for leprosy as a tool towards zero transmission: A modeling study. *PLoS neglected tropical diseases*. 2018;12(5):e0006529.

Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, Nicol MP, Shenai S, Krapp F, et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *The New England journal of medicine*. 2010;363(11):1005-15.

Brasil. Saúde da Família: uma estratégia de Organização dos Serviços de Saúde. In: Saúde Md, editor. Brasília: Ministério da Saúde; 1996. p. 21p.

Brasil. Portaria nº 3.125, de 07 de outubro de 2010. Aprova as Diretrizes para Vigilância, Atenção e Controle da hanseníase. In: Saúde Md, editor. Brasília: Ministério da Saúde; 2010a.

Brasil. Guia de procedimentos técnicos: baciloscopia em hanseníase. In: Epidemiológica Md, editor. Brasília: Ministério da Saúde; 2010b.

Brasil. Guia de Vigilância em Saúde. In: Saúde Md, editor. Brasília: Ministério da Saúde; 2016. p. 358-9.

Brasil. Hanseníase: situação epidemiológica: Ministério da Saúde; 2018 [cited 2018]. Available from: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/hanseniaze/situacao-epidemiologica>.

Bratschi MW, Steinmann P, Wickenden A, Gillis TP. Current knowledge on *Mycobacterium leprae* transmission: a systematic literature review. *Leprosy review*. 2015; 86(2):142-55.

Brennan PJ, Barrow WW. Evidence for species-specific lipid antigens in *Mycobacterium leprae*. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association*. 1980;48(4):382-7.

Brennan PJ, Nikaido H. The envelope of mycobacteria. *Annual review of biochemistry*. 1995;64:29-63.

Buhrer-Sekula S, Smits HL, Gussenhoven GC, van Leeuwen J, Amador S, Fujiwara T, et al. Simple and fast lateral flow test for classification of leprosy patients and identification of contacts with high risk of developing leprosy. *Journal of clinical microbiology*. 2003;41(5):1991-5.

Cambau E, Saunderson P, Matsuoka M, Cole ST, Kai M, Suffys P, 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 : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2018;24(12):1305-10.

Cardona-Castro N, Beltran-Alzate JC, Manrique-Hernandez R. Survey to identify *Mycobacterium leprae*-infected household contacts of patients from prevalent regions of leprosy in Colombia. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2008;103(4):332-6.

Cellona RV, Balagon MF, dela Cruz EC, Burgos JA, Abalos RM, Walsh GP, et al. Long-term efficacy of 2 year WHO multiple drug therapy (MDT) in multibacillary (MB) leprosy patients. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association*. 2003;71(4):308-19.

Chacko CJ. Role of histopathology in the early diagnosis of leprosy. *Indian journal of leprosy*. 1993;65(1):23-7.

Chen S, Wang Q, Chu T, Zheng M. Inter-observer reliability in assessment of sensation of skin lesion and enlargement of peripheral nerves in leprosy patients. *Leprosy review*. 2006;77(4):371-6.

Chin-a-Lien RA, Faber WR, van Rens MM, Leiker DL, Naafs B, Klatser PR. Follow-up of multibacillary leprosy patients using a phenolic glycolipid-I-based ELISA. Do increasing ELISA-values after discontinuation of treatment indicate relapse? *Leprosy review*. 1992;63(1):21-7.

Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature*. 2001;409(6823):1007-11.

Contin LA, Alves CJ, Fogagnolo L, Nassif PW, Barreto JA, Lauris JR, et al. Use of the ML-Flow test as a tool in classifying and treating leprosy. *Anais brasileiros de dermatologia*. 2011;86(1):91-5.

Cree IA, Smith WC. Leprosy transmission and mucosal immunity: towards eradication? *Leprosy review*. 1998;69(2):112-21.

Cruz R, Buhner-Sekula S, Penna GO, Moraes MEA, Goncalves HS, Stefani MMA, et al. Clinical trial for uniform multidrug therapy for leprosy patients in Brazil (U-MDT/CT-BR): adverse effects approach. *Anais brasileiros de dermatologia*. 2018;93(3):377-84.

Cunanan A, Chan G, Douglas J. Risk of development of leprosy among Culsion contacts. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association*. 1998;66:78A.

de Souza ALA, de Oliveira Feliciano KV, de Medeiros Mendes MF. A visão de profissionais da Estratégia Saúde da Família sobre os efeitos do treinamento de hanseníase. *Revista da Escola de Enfermagem da USP*. 2015;49(4):610-8.

Desikan KV. Viability of *Mycobacterium leprae* outside the human body. *Leprosy review*. 1977;48(4):231-5.

Doull JA, Guinto RS, et al. Rise of attack in leprosy in relation to age at exposure. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1945;25:435-9.

Duppre NC, Camacho LA, da Cunha SS, Struchiner CJ, Sales AM, Nery JA, et al. Effectiveness of BCG vaccination among leprosy contacts: a cohort study. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2008;102(7):631-8.

Duppre NC, Camacho LA, Sales AM, Illarramendi X, Nery JA, Sampaio EP, et al. Impact of PGL-I seropositivity on the protective effect of BCG vaccination among leprosy contacts: a cohort study. *PLoS neglected tropical diseases*. 2012;6(6):e1711.

Duthie MS, Goto W, Ireton GC, Reece ST, Cardoso LP, Martelli CM, et al. Use of protein antigens for early serological diagnosis of leprosy. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 2007;14(11):1400-8.

Esteva A, Kuprel B, Novoa RA, Ko J, Swetter SM, Blau HM, et al. Dermatologist-level classification of skin cancer with deep neural networks. *Nature*. 2017;542(7639):115-8.

Ezenduka C, Post E, John S, Suraj A, Namadi A, Onwujekwe O. Cost-effectiveness analysis of three leprosy case detection methods in Northern Nigeria. *PLoS neglected tropical diseases*. 2012;6(9):e1818.

Fajardo TT, Villahermosa L, Pardillo FE, Abalos RM, Burgos J, Dela Cruz E, et al. A comparative clinical trial in multibacillary leprosy with long-term relapse rates of four different multidrug regimens. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2009;81(2):330-4.

Faye O, Hay RJ, Ryan TJ, Keita S, Traore AK, Mahe A. A public health approach for leprosy detection based on a very short term-training of primary health care workers in basic dermatology. *Leprosy review*. 2007;78(1):11-6.

Feenstra P. Leprosy control through general health services and/or combined programmes. *Leprosy review*. 1993;64(2):89-96.

Feenstra SG, Pahan D, Moet FJ, Oskam L, Richardus JH. Patient-related factors predicting the effectiveness of rifampicin chemoprophylaxis in contacts: 6 year follow up of the COLEP cohort in Bangladesh. *Leprosy review*. 2012;83(3):292-304.

Fine PE. BCG vaccination against tuberculosis and leprosy. *British medical bulletin*. 1988;44(3):691-703.

Fine PE, Job CK, McDougall AC, Meyers WM, Ponnighaus JM. Comparability among histopathologists in the diagnosis and classification of lesions suspected of leprosy in Malawi. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association*. 1986;54(4):614-25.

Fine PE, Sterne JA, Ponnighaus JM, Bliss L, Sauti J, Chihana A, et al. Household and dwelling contact as risk factors for leprosy in northern Malawi. *American journal of epidemiology*. 1997;146(1):91-102.

Fritschi EP. Field detection of early neuritis in leprosy. *Leprosy review*. 1987;58(2):173-7.

Fujiwara T, Hunter SW, Cho SN, Aspinall GO, Brennan PJ. Chemical synthesis and serology of disaccharides and trisaccharides of phenolic glycolipid antigens from the leprosy bacillus and preparation of a disaccharide protein conjugate for serodiagnosis of leprosy. *Infection and immunity*. 1984;43(1):245-52.

Fuzikawa PL, De Acurcio FA, Velema JP, Cherchiglia ML. Factors which influenced the decentralisation of leprosy control activities in the municipality of Betim, Minas Gerais State, Brazil. *Leprosy review*. 2010;81(3):196-205.

Gelber RH, Balagon VF, Cellona RV. The relapse rate in MB leprosy patients treated with 2-years of WHO-MDT is not low. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association*. 2004;72(4):493-500.

Geluk A, Bobosha K, van der Ploeg-van Schip JJ, Spencer JS, Banu S, Martins MV, et al. New biomarkers with relevance to leprosy diagnosis applicable in areas hyperendemic for leprosy. *Journal of immunology*. 2012;188(10):4782-91.

Geluk A, Klein MR, Franken KL, van Meijgaarden KE, Wieles B, Pereira KC, et al. Postgenomic approach to identify novel *Mycobacterium leprae* antigens with potential to improve immunodiagnosis of infection. *Infection and immunity*. 2005;73(9):5636-44.

Gillini L, Cooreman E, Wood T, Pemmaraju VR, Saunderson P. Global practices in regard to implementation of preventive measures for leprosy. *PLoS neglected tropical diseases*. 2017;11(5):e0005399.

Gupta A, George R, THOMAS M. The role of PCR for *Mycobacterium leprae* in patients with facial granulomatoses: A pilot study. *Leprosy review*. 2018;89:280-8.

Hacker MA, Duppre NC, Nery JAC, Sales AM, Sarno EN. Characteristics of leprosy diagnosed through the surveillance of contacts: a comparison with index cases in Rio de Janeiro, 1987-2010. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2012;107:49-54.

Hacker MA, Sales AM, Illarramendi X, Nery JA, Duppre NC, Bastos FI, et al. A profile of patients treated at a national leprosy outpatient referral clinic in Rio de Janeiro, Brazil, 1986-2007. *Revista panamericana de salud publica = Pan American journal of public health*. 2012;31(6):485-91.

Han XY, Seo YH, Sizer KC, Schoberle T, May GS, Spencer JS, et al. A new *Mycobacterium* species causing diffuse lepromatous leprosy. *American journal of clinical pathology*. 2008;130(6):856-64.

Hatta M, van Beers SM, Madjid B, Djumadi A, de Wit MY, Klatser PR. Distribution and persistence of *Mycobacterium leprae* nasal carriage among a population in which leprosy is endemic in Indonesia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1995;89(4):381-5.

Henry M, GalAn N, Teasdale K, Prado R, Amar H, Rays MS, et al. Factors Contributing to the Delay in Diagnosis and Continued Transmission of Leprosy in Brazil--An Explorative, Quantitative, Questionnaire Based Study. *PLoS neglected tropical diseases*. 2016;10(3):e0004542.

Hunter SW, Brennan PJ. A novel phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae* possibly involved in immunogenicity and pathogenicity. *Journal of bacteriology*. 1981;147(3):728-35.

Idema WJ, Majer IM, Pahan D, Oskam L, Polinder S, Richardus JH. Cost-effectiveness of a chemoprophylactic intervention with single dose rifampicin in contacts of new leprosy patients. *PLoS neglected tropical diseases*. 2010;4(11):e874.

Jardim MR, Antunes SL, Simons B, Wildenbeest JG, Nery JA, Illarramendi X, et al. Role of PGL-I antibody detection in the diagnosis of pure neural leprosy. *Leprosy review*. 2005;76(3):232-40.

Jha R, Karki S. Limitations of clinico-histopathological correlation of skin biopsies in leprosy. *Journal of Nepal Health Research Council*. 2010;8(1):40-3.

Job CK. Nerve damage in leprosy. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association*. 1989;57(2):532-9.

Job CK, Harris EB, Allen JL, Hastings RC. Thorns in armadillo ears and noses and their role in the transmission of leprosy. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 1986;110(11):1025-8.

Kampirapap K, Singtham N, Klatser PR, Wiriawipart S. DNA amplification for detection of leprosy and assessment of efficacy of leprosy chemotherapy. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association*. 1998;66(1):16-21.

Kramme S, Bretzel G, Panning M, Kawuma J, Drosten C. Detection and quantification of *Mycobacterium leprae* in tissue samples by real-time PCR. *Medical microbiology and immunology*. 2004;193(4):189-93.

Kumar B, Dogra S, Kaur I. Epidemiological characteristics of leprosy reactions: 15 years experience from north India. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association*. 2004;72(2):125-33.

Laal S, Bhutani LK, Nath I. Natural emergence of antigen-reactive T cells in lepromatous leprosy patients during erythema nodosum leprosum. *Infection and immunity*. 1985;50(3):887-92.

Lahiri R, Adams LB. Cultivation and Viability Determination of *Mycobacterium leprae*. In: Scollard D, Gillis T, editors. *International Textbook of Leprosy. Part II, Section 5: International Textbook of Leprosy*; 2005.

Lastoria JC, Abreu MA. Leprosy: a review of laboratory and therapeutic aspects--part 2. *Anais brasileiros de dermatologia*. 2014;89(3):389-401.

Lima MdSM, Pomini ÂCdM, Hinders D, Soares MPdB, Mello MGdS. Capacitação técnica vs. comprometimento profissional do real impacto no controle da hanseníase. *Investigações em sistema de saúde e controle da hanseníase*2008. p. 293-306.

Lima MJ, Duarte VF, Formiga JV, Pedrosa KSC, Oliveira LC. Difficulties in the face of the diagnosis, report of patients with the Hansen's bacillus. *Journal of Nursing UFPE on line*.8(11):4107-13.

Liu TC, Yen LZ, Ye GY, Dung GJ. Histology of indeterminate leprosy. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association*. 1982;50(2):172-6.

Lockwood DN, Lucas SB, Desikan KV, Ebenezer G, Suneetha S, Nicholls P. The histological diagnosis of leprosy type 1 reactions: identification of key variables and an analysis of the process of histological diagnosis. *Journal of clinical pathology*. 2008;61(5):595-600.

Lockwood DN, Suneetha S. Leprosy: too complex a disease for a simple elimination paradigm. *Bulletin of the World Health Organization*. 2005;83(3):230-5.

London. London Declaration on Neglected Tropical Diseases. London: Uniting to combat ntds organization; 2012.

Madri, editor *Classificação, Resolução Técnica*. 6º Congresso Internacional de Leprologia; 1953; Madri: *Int J Lepr*.

Martinez AN, Britto CF, Nery JA, Sampaio EP, Jardim MR, Sarno EN, et al. Evaluation of real-time and conventional PCR targeting complex 85 genes for detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin biopsy samples from patients diagnosed with leprosy. *Journal of clinical microbiology*. 2006;44(9):3154-9.

Martinez AN, Lahiri R, Pittman TL, Scollard D, Truman R, Moraes MO, et al. Molecular determination of *Mycobacterium leprae* viability by use of real-time PCR. *Journal of clinical microbiology*. 2009;47(7):2124-30.

Martinez AN, Ribeiro-Alves M, Sarno EN, Moraes MO. Evaluation of qPCR-based assays for leprosy diagnosis directly in clinical specimens. *PLoS neglected tropical diseases*. 2011;5(10):e1354.

Martinez AN, Talhari C, Moraes MO, Talhari S. PCR-based techniques for leprosy diagnosis: from the laboratory to the clinic. *PLoS neglected tropical diseases*. 2014;8(4):e2655.

Martins AC, Miranda A, Oliveira ML, Buhner-Sekula S, Martinez A. Nasal mucosa study of leprosy contacts with positive serology for the phenolic glycolipid 1 antigen. *Brazilian journal of otorhinolaryngology*. 2010;76(5):579-87.

Martins MV, Guimaraes MM, Spencer JS, Hacker MA, Costa LS, Carvalho FM, et al. Pathogen-specific epitopes as epidemiological tools for defining the magnitude of *Mycobacterium leprae* transmission in areas endemic for leprosy. *PLoS neglected tropical diseases*. 2012;6(4):e1616.

Matsuoka M. Global surveillance system to monitor the development of drug resistance in *Mycobacterium leprae*. *Research and Reports in Tropical Medicine*. 2015;6:75-83.

Medeiros CR, Junqueira AG, Schwingel G, Carreno I, Jungles LA, Saldanha OM. [Nurses and doctors turnover: an impasse in the implementation of the Family Health Strategy]. *Ciencia & saude coletiva*. 2010;15 Suppl 1:1521-31.

Mendonça VA, Costa RD, Melo GEBA, Antunes CM, Teixeira A. Immunology of leprosy. *Anais brasileiros de dermatologia*. 2008;83(4):343-50.

Meyers WM, Gormus BJ, Walsh GP, Baskin GB, Hubbard GB. Naturally acquired and experimental leprosy in nonhuman primates. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1991;44(4 Pt 2):24-7.

Mieras L, Anthony R, van Brakel W, Bratschi MW, van den Broek J, Cambau E, et al. Negligible risk of inducing resistance in *Mycobacterium tuberculosis* with single-dose rifampicin as post-exposure prophylaxis for leprosy. *Infectious diseases of poverty*. 2016;5(1):46.

Mira MT, Alcais A, Nguyen VT, Moraes MO, Di Flumeri C, Vu HT, et al. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. *Nature*. 2004;427(6975):636-40.

Modlin RL, Bloom BR. Immune regulation: learning from leprosy. *Hospital practice*. 1993;28(11):71-4, 7-80, 3-4.

Moet FJ, Meima A, Oskam L, Richardus JH. Risk factors for the development of clinical leprosy among contacts, and their relevance for targeted interventions. *Leprosy review*. 2004;75(4):310-26.

Moet FJ, Pahan D, Oskam L, Richardus JH, Group CS. Effectiveness of single dose rifampicin in preventing leprosy in close contacts of patients with newly diagnosed leprosy: cluster randomised controlled trial. *Bmj*. 2008;336(7647):761-4.

Montoya D, Modlin RL. Learning from leprosy: insight into the human innate immune response. *Advances in immunology*. 2010;105:1-24.

Moreira TMA, Pimentel MIF, Braga CAV, Valle CLP, Xavier AGM. Hanseníase na atenção básica de saúde: efetividade dos treinamentos para os profissionais de saúde no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Hansenol Int*. 2002;27(2):70-6.

Moschella SL. Differential Diagnosis of Leprosy. In: Lahiri R, Adams LB, editors. International text book of leprosy 2016.

Moya A, Pereto J, Gil R, Latorre A. Learning how to live together: genomic insights into prokaryote-animal symbioses. Nature reviews Genetics. 2008;9(3):218-29.

Naafs B. Leprosy reactions. New knowledge. Tropical and geographical medicine. 1994;46(2):80-4.

Nayar A, Narayanan JS, Job CK. Histopathological study of early skin lesions in leprosy. Archives of pathology. 1972;94(3):199-204.

Nazario AP, Ferreira J, Schuler-Faccini L, Fiegenbaum M, Artigalas O, Vianna FSL. Leprosy in Southern Brazil: a twenty-year epidemiological profile. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2017;50(2):251-5.

Neira MP, Daumerie D. Remaining challenges towards elimination of leprosy. Leprosy review. 2000;71(3):247-52.

Noordeen SK. Epidemiology and control of leprosy--a review of progress over the last 30 years. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1993;87(5):515-7.

Oskam L, Slim E, Buhrer-Sekula S. Serology: recent developments, strengths, limitations and prospects: a state of the art overview. Leprosy review. 2003;74(3):196-205.

PATRUS ANANIAS MT, GROSSI ARAUJO M, DIAS GONTIJO E, MARTINS GUEDES AC. Estudo do antiPGL-1 em pacientes hansenianos utilizando técnica de ultramicroelisa. Anais brasileiros de dermatologia. 2002;77(4):425-33.

Pearson JM, Ross WF. Nerve involvement in leprosy--pathology, differential diagnosis and principles of management. Leprosy review. 1975;46(3):199-212.

Pedley JC. Transmission of leprosy. Chatterjee, BR-The window on leprosy Wardhs: Gandhi Memorial Leprosy Foundation. 1978:54-8.

Penna GO, Pontes MA, Cruz R, Goncalves Hde S, Penna ML, Buhrer-Sekula S. A clinical trial for uniform multidrug therapy for leprosy patients in Brazil: rationale and design. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2012;107 Suppl 1:22-7.

Penna ML, Grossi MA, Penna GO. Country profile: leprosy in Brazil. *Leprosy review*. 2013;84(4):308-15.

Penna ML, Oliveira ML, Carmo EH, Penna GO, Temporaio JG. The influence of increased access to basic healthcare on the trends in Hansen's disease detection rate in Brazil from 1980 to 2006. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2008;41 Suppl 2:6-10.

Penna ML, Penna GO, Iglesias PC, Natal S, Rodrigues LC. Anti-PGL-1 Positivity as a Risk Marker for the Development of Leprosy among Contacts of Leprosy Cases: Systematic Review and Meta-analysis. *PLoS neglected tropical diseases*. 2016;10(5):e0004703.

Pfaltzgraff RE. The management of reaction in leprosy. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association*. 1989;57(1):103-9.

Pimentel MIF, Andrade M, Valle CLP, Xavier AGM, Bittencourt ALP, Macedo LFS. Descentralização do diagnóstico e tratamento da hanseníase no Estado do Rio de Janeiro: avanços e problemas. *Hansen Int*. 2004;29(2):94-100.

Plikaytis BB, Gelber RH, Shinnick TM. Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium leprae* using a nested-primer gene amplification assay. *Journal of clinical microbiology*. 1990;28(9):1913-7.

Rao TD, Rao PR. Enhanced cell-mediated immune responses in erythema nodosum leprosum reactions of leprosy. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases: official organ of the International Leprosy Association*. 1987;55(1):36-41.

Reis EM, Araujo S, Lobato J, Neves AF, Costa AV, Goncalves MA, et al. *Mycobacterium leprae* DNA in peripheral blood may indicate a bacilli migration route and high-risk for leprosy onset. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2014;20(5):447-52.

Reja AH, Biswas N, Biswas S, Dasgupta S, Chowdhury IH, Banerjee S, et al. Fite-Faraco staining in combination with multiplex polymerase chain reaction: a new approach to leprosy diagnosis. *Indian journal of dermatology, venereology and leprology*. 2013;79(5):693-700.

Ridley DS. Histological classification and the immunological spectrum of leprosy. *Bulletin of the World Health Organization*. 1974;51(5):451-65.

Ridley DS, Jopling WH. A classification of leprosy for research purposes. *Leprosy review*. 1962;33:119-28.

Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association*. 1966;34(3):255-73.

Rivero AL, Whitfeld M. An update on the treatment of rosacea. *Australian prescriber*. 2018;41(1):20-4.

Rodriguez G, Pinto R, Gomez Y, Rengifo ML, Estrada OL, Sarmiento M, et al. Pure neuritic leprosy in patients from a high endemic region of Colombia. *Leprosy review*. 2013;84(1):41-50.

Rose P, Waters MF. Reversal reactions in leprosy and their management. *Leprosy review*. 1991;62(2):113-21.

Roset Bahmanyar E, Smith WC, Brennan P, Cummings R, Duthie M, Richardus JH, et al. Leprosy Diagnostic Test Development As a Prerequisite Towards Elimination: Requirements from the User's Perspective. *PLoS neglected tropical diseases*. 2016;10(2):e0004331.

Rudeeaneksin J, Srisungngam S, Sawanpanyalert P, Sittiwakin T, Likanonsakul S, Pasadorn S, et al. LightCycler real-time PCR for rapid detection and quantitation of *Mycobacterium leprae* in skin specimens. *FEMS immunology and medical microbiology*. 2008;54(2):263-70.

Sales AM, Ponce de Leon A, Duppre NC, Hacker MA, Nery JA, Sarno EN, et al. Leprosy among patient contacts: a multilevel study of risk factors. *PLoS neglected tropical diseases*. 2011;5(3):e1013.

Salgado CG, Barreto JG, da Silva MB, Frade MAC, Spencer JS. What do we actually know about leprosy worldwide? *The Lancet Infectious diseases*. 2016;16(7):778.

Sarno EN, Grau GE, Vieira LM, Nery JA. Serum levels of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta during leprosy reactional states. *Clinical and experimental immunology*. 1991;84(1):103-8.

Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. *Clinical microbiology reviews*. 2006;19(2):338-81.

Scollard DM, Gillis TP, Williams DL. Polymerase chain reaction assay for the detection and identification of *Mycobacterium leprae* in patients in the United States. *American journal of clinical pathology*. 1998;109(5):642-6.

Sehgal VN. Reactions in leprosy. Clinical aspects. *International journal of dermatology*. 1987;26(5):278-85.

Shen J, Bathyala N, Kroeger A, Arana B, Pannikar V, Mou H, et al. Bacteriological results and leprosy reactions among MB leprosy patients treated with uniform multidrug therapy in China. *Leprosy review*. 2012;83(2):164-71.

Sieling PA, Modlin RL. Cytokine patterns at the site of mycobacterial infection. *Immunobiology*. 1994;191(4-5):378-87.

Silveira N, Almeida RP. Critical factors for fixing the doctor in the Family Health Strategy. *Public Health Journal*. 2012;22:1293-311.

Smith CM, Smith WC. Chemoprophylaxis is effective in the prevention of leprosy in endemic countries: a systematic review and meta-analysis. MILEP2 Study Group. *Mucosal Immunology of Leprosy. The Journal of infection*. 2000;41(2):137-42.

Smith CS, Noordeen SK, Richardus JH, Sansarricq H, Cole ST, Soares RC, et al. A strategy to halt leprosy transmission. *The Lancet Infectious diseases*. 2014;14(2):96-8.

Smith WC, Aerts A. Contact management is an essential component of leprosy control. *Leprosy review*. 2015;86(1):126-7.

Smith WC, van Brakel W, Gillis T, Saunderson P, Richardus JH. The missing millions: a threat to the elimination of leprosy. *PLoS neglected tropical diseases*. 2015;9(4):e0003658.

Souza EBd, Neves TV, Diniz APM, Reis IB, Valentim IM, Rocha ESD, et al. Percepções da doença e do tratamento pelos pacientes tratados de hanseníase residentes em Palmas-Tocantins. *Hansenol Int*. 2013;38(1/2):56-60.

Spencer JS, Dockrell HM, Kim HJ, Marques MA, Williams DL, Martins MV, et al. Identification of specific proteins and peptides in *Mycobacterium leprae* suitable for the selective diagnosis of leprosy. *Journal of immunology*. 2005;175(12):7930-8.

Stafin I, Guedes VR, Mendes SUR. DIAGNÓSTICO PRECOCE DE HANSENÍASE E AÇÕES ESTRATÉGICAS PARA A SUA DETECÇÃO. *Revista de Patologia do Tocantins*. 2018;5(2):67-73.

Stefani MMA, Avanzi C, Buhner-Sekula S, Benjak A, Loiseau C, Singh P, et al. Whole genome sequencing distinguishes between relapse and reinfection in recurrent leprosy cases. *PLoS neglected tropical diseases*. 2017;11(6):e0005598.

Steingart KR, Sohn H, Schiller I, Kloda LA, Boehme CC, Pai M, et al. Xpert(R) MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2013(1):CD009593.

Steinmann P, Reed SG, Mirza F, Hollingsworth TD, Richardus JH. Innovative tools and approaches to end the transmission of *Mycobacterium leprae*. *The Lancet Infectious diseases*. 2017;17(9):e298-e305.

Stinear TP, Brosch R. Leprosy in red squirrels. *Science*. 2016;354(6313):702-3.

Talhari S, Neves RG, Penna GO, Oliveira MLW. *Hanseníase*. 4ª Ed. ed. Manaus: Gráfica Tropical; 2006.

Tolentino JG. Acute manifestations of leprosy. *International journal of Leprosy*. 1965;33(3):Suppl:570-7.

Truman RW, Andrews PK, Robbins NY, Adams LB, Krahenbuhl JL, Gillis TP. Enumeration of Mycobacterium leprae using real-time PCR. PLoS neglected tropical diseases. 2008;2(11):e328.

Truman RW, Krahenbuhl JL. Viable M. leprae as a research reagent. International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association. 2001;69(1):1-12.

Truman RW, Singh P, Sharma R, Busso P, Rougemont J, Paniz-Mondolfi A, et al. Probable zoonotic leprosy in the southern United States. The New England journal of medicine. 2011;364(17):1626-33.

Ulrich M, Smith PG, Sampson C, Zuniga M, Centeno M, Garcia V, et al. IgM antibodies to native phenolic glycolipid-I in contacts of leprosy patients in Venezuela: epidemiological observations and a prospective study of the risk of leprosy. International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association. 1991;59(3):405-15.

Ustianowski AP, Lockwood DN. Leprosy: current diagnostic and treatment approaches. Current opinion in infectious diseases. 2003;16(5):421-7.

van Beers SM, Hatta M, Klatser PR. Patient contact is the major determinant in incident leprosy: implications for future control. International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association. 1999;67(2):119-28.

van Brakel WH. Measuring leprosy stigma--a preliminary review of the leprosy literature. International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association. 2003;71(3):190-7.

van Brakel WH, Khawas IB, Gurung KS, Kets CM, van Leerdam ME, Drever W. Intra- and inter-tester reliability of sensibility testing in leprosy. International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association. 1996;64(3):287-98.

van Hooij A, Tjon Kon Fat EM, Batista da Silva M, Carvalho Bouth R, Cunha Messias AC, Gobbo AR, et al. Evaluation of Immunodiagnostic Tests for Leprosy in Brazil, China and Ethiopia. *Scientific reports*. 2018;8(1):17920.

van Hooij A, Tjon Kon Fat EM, Richardus R, van den Eeden SJ, Wilson L, de Dood CJ, et al. Quantitative lateral flow strip assays as User-Friendly Tools To Detect Biomarker Profiles For Leprosy. *Scientific reports*. 2016;6:34260.

Verhagen C, Faber W, Klatser P, Buffing A, Naafs B, Das P. Immunohistological analysis of in situ expression of mycobacterial antigens in skin lesions of leprosy patients across the histopathological spectrum. Association of Mycobacterial lipoarabinomannan (LAM) and Mycobacterium leprae phenolic glycolipid-I (PGL-I) with leprosy reactions. *The American journal of pathology*. 1999;154(6):1793-804.

Visschedijk J, Engelhard A, Lever P, Grossi MA, Feenstra P. Leprosy control strategies and the integration of health services: an international perspective. *Cadernos de saude publica*. 2003;19(6):1567-81.

WHO. Chemotherapy of leprosy for control programmes. Technical Report Series, no. 675. Geneva: World Health Organization; 1982.

WHO. WHO Expert Committee on Leprosy: 6th report. Technical Report Series, no. 768. Geneva: World Health Organization; 1988.

WHO. Elimination of leprosy: Resolution of the 44th World Health Organization. Geneva: World Health Organization; 1991.

WHO. Global Strategy for Further Reducing the Leprosy Burden and Sustaining Leprosy Control Activities. Geneva: World Health Organization; 2005.

WHO. Accelerating work to overcome the global impact of Neglected Tropical Diseases: A roadmap for implementation. Geneva: World Health Organization; 2012.

WHO. Global Leprosy Strategy 2016–2020. Accelerating towards a leprosy-free world. Geneva: World Health Organization; 2016.

WHO. Leprosy global situation. *Weekly Epidemiological Record* n° 35. Geneva: World Health Organization 2018. p. 445-56.

WHO. Guidelines for the Diagnosis, Treatment and Prevention of Leprosy. Geneva: World Health Organization; 2018. p. 16-21.

Yan W, Xing Y, Yuan LC, De Yang R, Tan FY, Zhang Y, 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*. 2014;90(3):524-9.

Zhu YI, Stiller MJ. Dapsone and sulfones in dermatology: overview and update. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2001;45(3):420-34.

9 ANEXOS

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ –
FIOCRUZ/IOC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: O papel da reação em cadeia da polimerase (PCR) na identificação da subclínica em contatos de pacientes com hanseníase e no diagnóstico das formas paucibacilares

Pesquisador: Euzenir Nunes Sarno

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 38053314.2.0000.5248

Instituição Proponente: FUNDACAO OSWALDO CRUZ

Patrocinador Principal: FUNDACAO OSWALDO CRUZ

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Outros

Detalhe: Notificação

Justificativa: Prezados senhores, diante da necessidade de melhor acompanharmos a evolução

Data do Envio: 01/02/2018

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.552.085

Apresentação da Notificação:

O pesquisador informa que referente ao projeto supracitado, diante da necessidade de melhor acompanharmos a evolução das lesões cutâneas dos pacientes incluídos neste projeto, incluíram a obtenção de fotos das lesões de pele durante as consultas médicas. Estas fotos serão obtidas de modo a preservar a identidade dos pacientes e poderão ser usadas para fins clínicos e acadêmicos. O TCLE foi acusado acrescentando essa informação e se responsabilizando em preservar a identidade do voluntário.

Objetivo da Notificação:

O pesquisador informa que referente ao projeto supracitado, diante da necessidade de melhor acompanharmos a evolução das lesões cutâneas dos pacientes incluídos neste projeto, incluíram a obtenção de fotos das lesões de pele durante as consultas médicas. Estas fotos serão obtidas de

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.040-360

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3882-9011

Fax: (21)2561-4815

E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 2.552.085

modo a preservar a identidade dos pacientes e poderão ser usadas para fins clínicos e acadêmicos. O TCLE

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Explicitados no TCLE.

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

A revisão do TCLE está clara e preserva a identidade do voluntário da pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Notificação sobre alteração de TCLE.

Recomendações:

Apresentar relatórios parciais (anuais) e relatório final do projeto de pesquisa é responsabilidade indelegável do pesquisador principal.

Qualquer modificação ou emenda ao projeto de pesquisa em pauta deve ser submetida à apreciação do CEP Fiocruz/IOC.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz (CEP FIOCRUZ/IOC), em sua 236ª Reunião Ordinária, realizada em 20.03.2018, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, manifesta-se pela aprovação da notificação enviada.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	projeto.docx	01/02/2018	Euzenir Nunes Sarno	Postado
Outros	tclemenor.docx	01/02/2018	Euzenir Nunes Sarno	Postado
Outros	tclepb.docx	01/02/2018	Euzenir Nunes Sarno	Postado

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.040-360

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3882-9011

Fax: (21)2561-4815

E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -
FIOCRUZ/IOC



Continuação do Parecer: 2.552.085

Outros	carta.docx	01/02/2018	Euzenir Nunes Sarno	Postado
--------	------------	------------	------------------------	---------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 20 de Março de 2018

Assinado por:
José Henrique da Silva Pilotto
(Coordenador)

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)

Bairro: Manguinhos **CEP:** 21.040-360

UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



Ministério da Saúde - Fundação Oswaldo Cruz- FIOCRUZ
Laboratório de Hanseníase – Ambulatório Souza Araújo

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

No início do meu tratamento no Ambulatório Souza Araújo, Laboratório de Hanseníase, IOC-FIOCRUZ estou sendo informado e esclarecido sobre questões importantes e necessárias, as quais estão relacionadas abaixo:

Aceito e entendo que:

Serei submetido a exames laboratoriais e demais procedimentos para confirmar a doença que fazem parte da rotina médica e são realizados de acordo com as normas do Programa de Controle da Hanseníase, determinado pelo Ministério da Saúde do Brasil.

Nenhum dos exames emite radiação ou apresenta contra-indicações para crianças e são realizados de acordo com rotinas padronizadas por pessoal capacitado e treinado para este fim.

Esses exames e procedimentos são: coleta de sangue, baciloscopia, teste cutâneo para avaliação da imunidade celular (Teste de Mitsuda), biópsia de pele, biópsia de nervo (sendo este último solicitado quando necessário para casos particulares) e aplicação da vacina BCG (para os contatos sadios dos pacientes).

As amostras coletadas de minha biópsia ou do meu sangue serão armazenadas, sem identificação nominal, de forma segura e em locais especialmente preparados para a conservação das mesmas.

Estou ciente e entendo que:

Fui informado sobre minha doença, modo de transmissão, meus direitos e deveres bem como sobre a necessidade dos familiares e contatos mais próximos indicados por mim, serem examinados. Fui informado também sobre os medicamentos a serem tomados e o tempo de tratamento, assim como da possibilidade da ocorrência de quadros reacionais.

Estou ciente de que:

Os procedimentos como biópsia de pele, coleta de sangue e baciloscopia, poderão ser novamente realizados durante o período de meu tratamento, caso apresente alguma intercorrência.

Estou ciente dos benefícios esperados

Pois, os procedimentos realizados trarão maior qualidade ao meu tratamento e acompanhamento. As informações coletadas são fundamentais para futuras análises que possam ampliar o conhecimento sobre a hanseníase, contribuindo para o avanço da ciência.

Estou ciente da forma de acompanhamento e assistência

Durante todo o meu tratamento serei acompanhado pela equipe médica do Ambulatório Souza Araújo e receberei os cuidados e orientações necessárias de enfermagem, assistência social e fisioterapia.

Estou ciente de que:

Se eu ou meus familiares tivermos alguma dúvida, poderemos procurar os profissionais do ambulatório Souza Araújo para esclarecimentos em relação ao tratamento, procedimentos e realização de pesquisas, pessoalmente ou através dos telefones 2562- 1594 ou 2562- 1571, de 2ª à 5ª feira, no horário de 9:00 às 16:00 horas

Enfermeira: Nádia Cristina Düppe

Médicos: Dr. Jose Augusto da Costa Nery

Dra. Anna Maria Sales

Dra. Márcia Maria Jardim Rodrigues

Assistente Social: Rita Maria de Oliveira Pereira

Todas as informações coletadas sobre meu estado de saúde serão mantidas em sigilo, preservando meu direito de privacidade.

Reafirmo que li e tenho pleno entendimento das informações recebidas e assim assino este termo de consentimento juntamente com o profissional responsável pela minha orientação.

Nome _____

Assinatura _____

Data ____ / ____ / ____

Responsável pela Orientação _____

Em caso de menores de 18 anos

Como responsável você autoriza (escreva o nome):

se tornar um participante do estudo descrito.

Nome do responsável _____

Assinatura do responsável _____

ANEXO C - TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DOS PACIENTES COM HANSENÍASE PAUCIBACILAR

TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DOS PACIENTES COM HANSENÍASE PAUCIBACILAR

Título do projeto: O papel da reação em Cadeia da Polimerase na identificação de infecção subclínica em contatos de pacientes com hanseníase e no diagnóstico das formas paucibacilares

Identificação do voluntário

Nome: _____

Documento de identidade nº: _____

Sexo: _____ Data de nascimento: ___/___/___

Endereço: _____ Tel
efones de contato: _____

Instituição onde será realizada a pesquisa: Laboratório de Hanseníase, Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Fiocruz. Ambulatório Souza Araujo - Fiocruz Endereço: Av Brasil, nº 4365 – Manguinhos – CEP: 21040-360 – RJ - Brasil Telefone/Fax: 21 2562-1588

Pesquisador responsável: _____

Data do preenchimento: ___/___/___

Assinatura do pesquisador responsável

Informações ao voluntário

Estamos convidando você para participar como voluntário de um projeto de pesquisa desenvolvido por pesquisadores desta instituição. Quando a hanseníase é muito recente, pode se parecer com outras doenças de pele. Nesta pesquisa queremos estudar um exame que identifique a doença logo no início, para que a pessoa possa fazer o tratamento antes de ter sequelas. A hanseníase tem cura através das medicações que matam o agente causador.

Descrição do estudo

Serão convidados para participar desta pesquisa homens e mulheres adultos, que tenham lesões suspeitas de hanseníase, atendidos no Ambulatório Souza Araújo da Fundação Oswaldo Cruz, que é um Centro de Referência para pesquisas em hanseníase. Você não fará nenhum procedimento diferente daqueles já preconizados para o diagnóstico da hanseníase pelo Ministério da Saúde do Brasil. Os exames serão realizados na primeira consulta e o tratamento será iniciado, se for necessário. Você será chamado para uma segunda consulta, após 1 ano, para ser examinado pelo médico e pelo fisioterapeuta para avaliarem se houve melhora da lesão. Os seus dados serão descritos no seu prontuário médico e depois serão passados para o computador para serem utilizados na pesquisa.

Riscos possíveis

Desconforto para a coleta de sangue, raspado dérmico e biópsia de pele poderá ocorrer e consistem em dor momentânea. Em alguns casos, poderá ocorrer um pequeno inchaço e vermelhidão nesses locais. Há risco de infecção nos locais da coleta, portanto toda coleta será realizada com material descartável e precedida de rigorosa antisepsia local. Se houver infecção esta será tratada.

Armazenamento de amostras biológicas para uso em pesquisas futuras

As amostras de raspado dérmico, soro e biópsia serão guardadas no laboratório do centro de referência para que possam ser utilizados em novas pesquisas que precisem de amostras de pacientes com hanseníase.

Esclarecimentos sobre as garantias dos pacientes que quiserem participar do estudo

1- Você pode pedir esclarecimento aos profissionais de saúde, em qualquer momento, se tiver

alguma dúvida em relação à participação na pesquisa, ou sobre riscos, benefícios e resultados.

2- Sua participação nesta pesquisa é totalmente voluntária. Se você não quiser mais participar da pesquisa você pode retirar seu consentimento a qualquer momento. Isto não vai trazer nenhum prejuízo ao atendimento rotineiro, a que tem direito na unidade de saúde aonde vem sendo tratado. Os responsáveis pelo estudo poderão interromper a participação dos pacientes voluntários neste estudo se eles acharem que esta seja a melhor conduta para você.

3- Todas as informações da pesquisa serão sigilosas. Ninguém divulgará o nome dos participantes e os resultados dos exames identificados com o nome dos participantes. Se for solicitado por lei, somente o grupo de estudo, o Ministério da Saúde (Brasil) e os Comitês de Ética terão acesso às informações confidenciais que identificam o paciente pelo nome. Você não será identificado em qualquer relatório ou publicação que resulte deste estudo.

4- A participação nesta pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, você não receberá nenhuma gratificação pela participação no estudo. Porém, durante o acompanhamento, você terá direito ao ressarcimento das despesas com transporte para as visitas às unidades de saúde relacionadas com a pesquisa.

5- As amostras de sangue e outras que serão guardadas no nosso laboratório só serão utilizadas para novos estudos após a aprovação dos respectivos comitês de ética em pesquisa e o sigilo sobre as informações particulares de cada pessoa que participou da pesquisa será mantido. As fotos serão tiradas das manchas da pele de um modo que as pessoas não sejam reconhecidas. Estas fotos serão usadas para avaliar a melhora destas manchas e poderão ser também usadas em aulas, em cursos para profissionais da área de saúde e em congressos. As informações de contato de cada um dos pacientes serão mantidas, caso haja necessidade de informá-lo sobre novos resultados de exames realizados após a finalização do estudo que possam ser de benefício no cuidado da sua saúde.

Perguntas e contatos

Nós estaremos disponíveis para responder suas perguntas relacionadas à hanseníase e sobre esta pesquisa. Todas as dúvidas e perguntas podem ser feitas diretamente à pesquisadora responsável no Ambulatório Souza Araújo ou pelo e-mail: rbarbi@gmail.com (Raquel R. Barbieri).

O Comitê de Ética em Pesquisa - CEP é um centro que existe em todas as instituições que realizam pesquisas envolvendo seres humanos no Brasil. Ele foi criado para defender os interesses das pessoas que participam dos estudos, garantindo a segurança dos participantes e também contribuindo para que os estudos sejam realizados com qualidade. Endereço do Comitê de ética em Pesquisa do IOC-FIOCRUZ- RJ: Avenida Brasil, 4.036 - Sala: 705 (Prédio da Expansão) Mangueiras, RJ - CEP: 21.040-360 - Tels: (21) 3882-9011 Fax: (21) 2561-4815. Horário de funcionamento: 8:00h às 17:00h E-mail: etica@fiocruz.br

Para ser um voluntário nesta pesquisa você deverá assinar este termo de consentimento. O termo será assinado em duas vias e todas as páginas deverão ser rubricadas no momento da assinatura. Você receberá uma via desse termo de igual teor. Essa via deverá ficar guardada com você pois, nela contém as informações da pesquisa e o contato dos pesquisadores.

EU, _____, LI AS INFORMAÇÕES CONTIDAS ACIMA E COMPREENDI CLARAMENTE A MINHA PARTICIPAÇÃO NO REFERIDO ESTUDO E CONSINTO VOLUNTARIAMENTE PARTICIPAR DO MESMO.

Local: _____ Data _____

Assinatura do voluntário

Assinatura do pesquisador

Assinatura da testemunha

Ethical Approval

This study was approved by the Ethics in Research Committee of the Oswaldo Cruz Foundation
CAAE: 38053314.2.0000.5248, number: 976.330–10/03

ANEXO D - TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DOS PACIENTES COM HANSENÍASE PAUCIBACILAR DE 12 A 17 ANOS DE IDADE

TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DOS PACIENTES COM HANSENÍASE PAUCIBACILAR DE 12 A 17 ANOS DE IDADE

Título do projeto: O papel da reação em Cadeia da Polimerase na identificação de infecção subclínica em contatos de pacientes com hanseníase e no diagnóstico das formas paucibacilares

Identificação do voluntário de 12 a 17 anos

Nome: _____

Documento de identidade nº: _____

Sexo: _____ Data de nascimento: ___/___/___

Endereço: _____ Tel
efones de contato: _____

Instituição onde será realizada a pesquisa: Laboratório de Hanseníase, Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Fiocruz. Ambulatório Souza Araujo - Fiocruz Endereço: Av Brasil, nº 4365 – Manguinhos – CEP: 21040-360 – RJ - Brasil Telefone/Fax: 21 2562-1588

Pesquisador responsável: _____

Data do preenchimento: ___/___/___

Assinatura do pesquisador responsável

Informações ao voluntário de 12 a 17 anos

Estamos convidando você para participar como voluntário de um projeto de pesquisa desenvolvido por pesquisadores desta instituição. Quando a hanseníase é muito recente, pode se parecer com outras doenças de pele. Nesta pesquisa queremos estudar um exame que identifique a doença logo no início, para que a pessoa possa fazer o tratamento antes de ter sequelas. A hanseníase tem cura através das medicações que matam o agente causador.

Descrição do estudo

Serão convidados para participar desta pesquisa homens e mulheres adultos, que tenham lesões suspeitas de hanseníase, atendidos no Ambulatório Souza Araújo da Fundação Oswaldo Cruz, que é um Centro de Referência para pesquisas em hanseníase. Você não fará nenhum procedimento diferente daqueles já preconizados para o diagnóstico da hanseníase pelo Ministério da Saúde do Brasil. Os exames serão realizados na primeira consulta e o tratamento será iniciado, se for necessário. Você será chamado para uma segunda consulta, após 1 ano, para ser examinado pelo médico e pelo fisioterapeuta para avaliarem se houve melhora da lesão. Os seus dados serão descritos no seu prontuário médico e depois serão passados para o computador para serem utilizados na pesquisa.

Riscos possíveis

Desconforto para a coleta de sangue, raspado dérmico e biópsia de pele poderá ocorrer e consistem em dor momentânea. Em alguns casos, poderá ocorrer um pequeno inchaço e vermelhidão nesses locais. Há risco de infecção nos locais da coleta, portanto toda coleta será realizada com material descartável e precedida de rigorosa antisepsia local. Se houver infecção esta será tratada.

Armazenamento de amostras biológicas para uso em pesquisas futuras

As amostras de raspado dérmico, soro e biópsia serão guardadas no laboratório do centro de referência para que possam ser utilizados em novas pesquisas que precisem de amostras de pacientes com hanseníase.

Esclarecimentos sobre as garantias dos pacientes que quiserem participar do estudo

1- Você pode pedir esclarecimento aos profissionais de saúde, em qualquer momento, se tiver

alguma dúvida em relação à participação na pesquisa, ou sobre riscos, benefícios e resultados.

2- Sua participação nesta pesquisa é totalmente voluntária. Se você não quiser mais participar da pesquisa você pode retirar seu consentimento a qualquer momento. Isto não vai trazer nenhum prejuízo ao atendimento rotineiro, a que tem direito na unidade de saúde aonde vem sendo tratado. Os responsáveis pelo estudo poderão interromper a participação dos pacientes voluntários neste estudo se eles acharem que esta seja a melhor conduta para você.

3- Todas as informações da pesquisa serão sigilosas. Ninguém divulgará o nome dos participantes e os resultados dos exames identificados com o nome dos participantes. Se for solicitado por lei, somente o grupo de estudo, o Ministério da Saúde (Brasil) e os Comitês de Ética terão acesso às informações confidenciais que identificam o paciente pelo nome. Você não será identificado em qualquer relatório ou publicação que resulte deste estudo.

4- A participação nesta pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, você não receberá nenhuma gratificação pela participação no estudo. Porém, durante o acompanhamento, você terá direito ao ressarcimento das despesas com transporte para as visitas às unidades de saúde relacionadas com a pesquisa.

5- As amostras de sangue e outras que serão guardadas no nosso laboratório só serão utilizadas para novos estudos após a aprovação dos respectivos comitês de ética em pesquisa e o sigilo sobre as informações particulares de cada pessoa que participou da pesquisa será mantido. As fotos serão tiradas das manchas da pele de um modo que as pessoas não sejam reconhecidas. Estas fotos serão usadas para avaliar a melhora destas manchas e poderão ser também usadas em aulas, em cursos para profissionais da área de saúde e em congressos. As informações de contato de cada um dos pacientes serão mantidas, caso haja necessidade de informá-lo sobre novos resultados de exames realizados após a finalização do estudo que possam ser de benefício no cuidado da sua saúde.

Perguntas e contatos

Nós estaremos disponíveis para responder suas perguntas relacionadas à hanseníase e sobre esta pesquisa. Todas as dúvidas e perguntas podem ser feitas diretamente à pesquisadora responsável no Ambulatório Souza Araújo ou pelo e-mail: rrbarki@gmail.com (Raquel R. Barbieri).

O Comitê de Ética em Pesquisa - CEP é um centro que existe em todas as instituições que realizam pesquisas envolvendo seres humanos no Brasil. Ele foi criado para defender os interesses das pessoas que participam dos estudos, garantindo a segurança dos participantes e também contribuindo para que os estudos sejam realizados com qualidade. Endereço do Comitê de ética em Pesquisa do IOC-FIOCRUZ- RJ: Avenida Brasil, 4.036 - Sala: 705 (Prédio da Expansão) Mangueiras, RJ - CEP: 21.040-360 - Tels: (21) 3882-9011 Fax: (21) 2561-4815. Horário de funcionamento: 8:00h às 17:00h E-mail: etica@fiocruz.br

Para ser um voluntário nesta pesquisa você deverá assinar este termo de consentimento. O termo será assinado em duas vias e todas as páginas deverão ser rubricadas no momento da assinatura. Você receberá uma via desse termo de igual teor. Essa via deverá ficar guardada com você pois, nela contém as informações da pesquisa e o contato dos pesquisadores.

EU, _____, LI AS INFORMAÇÕES CONTIDAS ACIMA E COMPREENDI CLARAMENTE A MINHA PARTICIPAÇÃO NO REFERIDO ESTUDO E CONSINTO VOLUNTARIAMENTE PARTICIPAR DO MESMO.

Local: _____ Data _____

Assinatura do voluntário

Assinatura do responsável pelo voluntário com idade entre 12 e 17 anos

Assinatura do pesquisador

Assinatura da testemunha

Ethical Approval

This study was approved by the Ethics in Research Committee of the Oswaldo Cruz Foundation
CAAE: 38053314.2.0000.5248, number: 976.330–10/03