

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

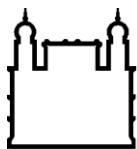
INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Genotipagem de isolados de *Mycobacterium leprae*
de pacientes hansenianos do Brasil

AMANDA NOGUEIRA BRUM FONTES

RIO DE JANEIRO

Maio de 2011



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AMANDA NOGUEIRA BRUM FONTES

Genotipagem de isolados de *Mycobacterium leprae* de pacientes hansenianos do
Brasil

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte
dos requisitos para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Orientadores: Dr. Philip Noel Suffys
Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani

RIO DE JANEIRO
Maio de 2011

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

F683

Fontes, Amanda Nogueira Brum.

Genotipagem de isolados de *Mycobacterium leprae* de pacientes hansenianos do Brasil. / Amanda Nogueira Brum Fontes. – Rio de Janeiro, 2011.

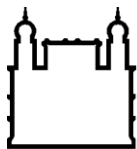
xiv, 180 f. : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2011.

Bibliografia: f. 132-154

1. *Mycobacterium leprae*. 2. VNTR. 3. SNP. 4. Genotipagem molecular. 5. Epidemiologia. 6. Hanseníase. I. Título.

CDD 616.92940981



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AMANDA NOGUEIRA BRUM FONTES

**GENOTIPAGEM DE ISOLADOS DE *MYCOBACTERIUM LEPRAE* DE PACIENTES
HANSENIANOS DO BRASIL**

ORIENTADORES: Dr. Philip Noel Suffys
Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani

Aprovada em: 26/05/2011

EXAMINADORES:

Dra. Euzenir Nunes Sarno – Fundação Oswaldo Cruz - **Presidente**
Dra. Fátima Cristina Onofre Fandinho Montes – Fundação Oswaldo Cruz - **Titular**
Dra. Andréa Carla de Souza Goés – Universidade do Estado do Rio de Janeiro - **Titular**
Dr. Harrison Magdinier Gomes – Fundação Oswaldo Cruz – **Suplente/Revisor**
Dr. Adalberto Rezende Santos – Fundação Oswaldo Cruz - **Suplente**

Rio de Janeiro, 26 de Maio de 2011

*Dedico este trabalho aos dois grandes homens da minha vida:
ao meu avô Benedicto Nogueira e ao meu marido Maurício Paiva.*

Agradecimentos

Aos meus queridos avós, Maria Nogueira (*in memoriam*) e Benedicto Nogueira, dois grandes exemplos em minha vida e sem os quais nada disso teria sido possível.

Ao meu marido Maurício Paiva, pelos seus inúmeros gestos de amor e carinho ao longo de todos estes anos.

À minha mãe Elizabeth Nogueira, por vibrar com minhas conquistas e sempre acreditar no meu potencial.

Ao meu padrinho Roberto Borges, pela presença marcante em momentos decisivos que me conduziram até aqui.

Ao Dr. Philip Noel Suffys, pela orientação que me fez pensar e crescer.

À Dra. Cristina Pessolani, pela co-orientação deste projeto.

Às Doutoradas Euzenir Sarno, Ida Maria Baptista, Maria Manuela Moura, Norma Lucena e Lígia Kerr, por disponibilizarem as amostras que foram analisadas neste estudo.

Aos colaboradores da Universidade do Estado do Colorado, pelo importante apoio dado para o desenvolvimento desta tese.

Ao meu grande amigo e eterno psicólogo Harrison Magdinier. Obrigada pelos ensinamentos profissionais e pessoais!

À Mara Oelemann, minha primeira orientadora científica. Não sei se a culpo ou se a agradeço por ter chegado até aqui.

À Márcia Quinhones, pela solicitude. Não há problema que ela não possa resolver!

À Ida Mary Baptista, uma das minhas grandes incentivadoras. Obrigada por me propor desafios e por confiar no meu trabalho!

À Sidra Vasconcellos e a Lizânia Spinassé, pelas muitas mensagens trocadas no meu último ano de doutoramento. A distância geográfica entre o Rio e Recife ficava bem menor a cada boletim que recebia da Cidade Maravilhosa.

À Lia Lima, pelo bom humor ao longo de todos estes anos de convivência.

À Ana Carolina Barreto, a mais nova integrante desta linha de pesquisa e futura “menina da genotipagem de *M. leprae*”. O seu interesse científico a levará longe!!!

À Luciene Esteves, pelo ombro amigo!

Ao Jorge Salgado, por transformar minhas manhãs com a saudação: “Bom dia, minha Flor!”

Ao Adalberto Rezende, pelo carinho e sinceridade com que trata a todos.

À Aline Moreira. Obrigada por sempre me receber com um imenso sorriso em seu laboratório e pelo grande auxílio na análise de fragmentos.

Ao Marcelo Araújo, pela construção dos inúmeros dendogramas desta tese.

Ao Sr. Salles, pela amabilidade.

Aos demais companheiros dos diversos laboratórios que compõem o antigo “Departamento de Hanseníase”, muito obrigada!

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Fundação Oswaldo Cruz.

À CAPES, pela concessão da bolsa integral.

“Algo só é impossível até que alguém duvide e acabe provando o contrário.”
(Albert Einstein)

Índice

	Página
Lista de símbolos e abreviaturas.....	x
Lista de figuras e tabelas	xii
Resumo.....	xiii
Abstract	xiv
Capítulo I – Introdução	
1. Hanseníase: Agente etiológico	01
2. Modelos Experimentais Animais.....	01
3. Transmissão da Hanseníase	02
4. Formas Clínicas da Hanseníase e Resposta Imune	03
5. Neuropatia Hanseniana	05
6. Estados Reacionais Hansênicos	06
7. Genes e suscetibilidade à Hanseníase	07
8. Hanseníase: Distribuição Geográfica.....	08
9. Diagnóstico da Hanseníase	10
9. 1. Baciloscopia	11
9.2. Testes Laboratoriais Alternativos para o Diagnóstico da Hanseníase: PGL-1 e PCR .	12
10. Tratamento da Hanseníase.....	14
11. Recidiva na Hanseníase.....	15
12. Resistência às Drogas.....	16
13. O Genoma de <i>Mycobacterium leprae</i>	17
14. Variabilidade Genética Bacteriana.....	19
14.1. Variabilidade Genética em <i>Mycobacterium leprae</i>	22
Capítulo II – Objetivos	26
Capítulo III – Materiais e Métodos	27
Capítulo IV – Resultados: Diversidade genética de isolados de <i>Mycobacterium leprae</i> de pacientes hansenianos brasileiros	35

Capítulo V – Resultados: Genotipagem de <i>Mycobacterium leprae</i> de pacientes hansenianos sugere a ocorrência de uma re-infecção ou uma mudança da população bacteriana durante a recidiva da doença	50
Capítulo VI – Resultados: Genotipagem de isolados de <i>Mycobacterium leprae</i> oriundos de lâminas de baciloscopia e biópsias de pele de pacientes hansenianos de diferentes regiões geográficas do Brasil.....	75
Capítulo VII – Resultados: Análise da variabilidade genética de <i>Mycobacterium leprae</i> na cidade de Fortaleza, Ceará.....	110
Capítulo VIII	
Discussão	117
Conclusões.....	131
Referências	132
Anexo I – SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação, Ficha de notificação / Investigação – HANSENÍASE.....	155
Anexo II – Tabelas com os genótipos de <i>Mycobacterium leprae</i> definidos no Brasil.	158
Anexo III – Tabelas com os genótipos de <i>Mycobacterium leprae</i> originários de outros países.....	171
Anexo IV – Dendograma construído com base nos genótipos de <i>Mycobacterium leprae</i> definidos no Brasil e em outros países	177

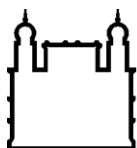
Lista de Símbolos e Abreviaturas

- BAAR** - bacilo álcool ácido resistente
- BB** - borderline borderline
- BL** - borderline lepromatoso
- BT** - borderline tuberculóide
- CFZ** - clofazimina
- DDS** - dapsona
- DEFB1** - beta-defensina 1
- DHPS** - enzima dihidropteroato sintetase
- DNA** - ácido desoxiribolucléico
- ELISA** - ensaio imunoenzimático
- ENH** - eritema nodoso hansênico
- FCN2** - ficolina-2
- FLA** - análise do comprimento do fragmento
- HGDI** - índice discriminatório de Hunter-Gaston
- HLA** - antígeno leucocitário humano
- HLP** - proteína histona
- I** - indeterminado
- IB** - índice baciloscópio
- IFN** - interferon
- IgM** - imunoglobulina M
- IL** - interleucina
- ILB** - índice logarítmico da biópsia
- IM** - índice morfológico
- IS** - sequência de inserção
- kDa** - quilodalton
- LL** - lepromatoso lepromatoso
- LTA** - linfotoxina alfa
- MB** - multibacilar
- MIRU** - unidades repetitivas intercaladas de micobactérias
- MLVA** - análise de múltiplos-lócus variáveis
- MST** - árvore geradora mínima
- NJ** - método para reconstrução de árvores filogenéticas sem raiz a partir de uma matriz; agrupamento de vizinhos

OMS - Organização Mundial da Saúde
PACRG - gene co-regulador da parkina
PARK2 - gene da parkina
PB - paucibacilar
PCR - reação da polimerase em cadeia
PGL-1 - glicolípido fenólico 1
PNL - forma neural pura
PQT - poliquimioterapia
RFLP - polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição
RFM - rifampicina
ROM - rifampicina, ofloxacina e minociclina
RR - reação reversa
RT-PCR - transcrição reversa PCR
SDS - dodecil sulfato de sódio
SNP - polimorfismo de base única
STR - repetições pequenas em *tandem*
TE - Tris-EDTA
TNF - fator de necrose tumoral
TT - tuberculóide tuberculóide
VDR - receptor da vitamina D
VNTR - repetição em *tandem* de número variável

Lista de Figuras e Tabelas

	Página
Figura 1.1. Representação esquemática do espectro clínico e imunopatológico da hanseníase.....	03
Figura 1.2. Distribuição da hanseníase no mundo (OMS, 2009)	10
Tabela 1.1. Índice Baciloscópico (IB) projetado para 100 campos microscópicos (adaptado de Ridley & Jopling, 1962).....	11
Tabela 1.2. Associação entre o índice baciloscópico (IB) e a forma clínica dos pacientes com hanseníase.....	12
Figura 1.3. Genoma circular de <i>M. leprae</i> mostrando a posição e a orientação dos prováveis genes funcionais, pseudogenes e sequências repetitivas (Cole e col., 2001)	18
Tabela 1.3. Estrutura genômica de espécies de Micobactérias.....	18
Figura 1.4. Genótipos de <i>M. leprae</i> definidos por SNPs (Monot e col., 2005).....	24
Figura 1.5. Disseminação da hanseníase pelo mundo (Monot e col., 2009).....	25
Tabela 3.1. Tipo de material analisado, estado de origem e forma clínica dos pacientes.....	27
Tabela 3.2. Repetições selecionadas para o estudo, iniciadores utilizados e tamanho dos fragmentos esperados após amplificação	29
Tabela 3.3. Iniciadores utilizados para genotipagem dos polimorfismos de base única	33
Tabela 7.1. Pares de amostras com genótipos idênticos	113
Tabela 7.2. Pares de amostras que diferem nos microssatélites mais polimórficos (repetições de dinucleotídeos AT).....	113
Tabela 7.3. Pares de amostras que além de diferirem nas repetições de dinucleotídeos (ATs) também apresentaram variação em mais um microssatélite	114
Tabela 7.4. Variável sexo analisada para os 3 grupos identificados no estudo	116
Tabela 7.5. Variável área analisada para os 3 grupos identificados no estudo	116
Figura 8.1. Árvore geradora mínima construída com base nos genótipos de <i>M. leprae</i> identificados em diferentes países através da análise de 14 VNTRs.....	124
Figura 8.2. Árvore geradora mínima construída com base nos genótipos de <i>M. leprae</i> definidos no Brasil utilizando 16 VNTRs.....	128
Figura 8.3. Árvore geradora mínima com os genótipos definidos pelos SNPs coloridos ...	128



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

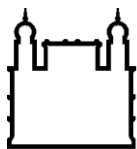
GENOTIPAGEM DE ISOLADOS DE *MYCOBACTERIUM LEPRAE* DE PACIENTES HANSENIANOS DO BRASIL

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Amanda Nogueira Brum Fontes

A hanseníase é uma doença infecto-contagiosa crônica, causada pelo *Mycobacterium leprae*. Após o sequenciamento do genoma deste patógeno, inúmeros esforços têm sido feitos na busca por sequências repetitivas com potencial para diferenciar isolados de *M. leprae*. Atualmente, VNTRs têm sido utilizados com o objetivo de compreender a diversidade genética deste patógeno em áreas com alta prevalência da doença. Além disso, SNPs também têm contribuído para elucidar aspectos referentes à disseminação da hanseníase pelo mundo. Neste estudo, a variabilidade genética de 292 isolados de *M. leprae* oriundos de amostras clínicas de pacientes hansenianos das regiões norte, nordeste e sudeste do país foi avaliada utilizando 16 VNTRs e três SNPs. O polimorfismo dos diferentes VNTRs foi determinado através de MLVA (Multiple-locus VNTR analysis) utilizando FLA (Fragment length analysis), enquanto que os SNPs foram analisados através de PCR-RFLP e/ou sequenciamento. O poder discriminatório dos 16 VNTRs foi de 0.999, sendo que as repetições de dinucleotídeos AT e o trinucleotídeo GAA21 apresentaram os maiores índices de discriminação alélica. Além da genotipagem de isolados de *M. leprae* de biópsias de pele, material de linfa fixado em lâmina de baciloscopia também foi utilizado como uma fonte alternativa para obtenção de DNA deste bacilo. Com relação à genotipagem por SNP, foi possível observar a predominância do genótipo 3, associado à população européia, em Rondônia, Rio de Janeiro e São Paulo. Já o genótipo 4, oriundo da África Ocidental, foi predominante em Pernambuco e Fortaleza. A presença dos diferentes genótipos e sua predominância em determinadas áreas corroboram com o processo de colonização do país que se reflete na atual composição étnica da população brasileira. Com base nos perfis obtidos através dos VNTRs e SNPs, foram identificados seis grupos geneticamente idênticos: quatro do Ceará, um de Rondônia e outro formado entre amostras de Minas Gerais e São Paulo. Nenhuma associação entre os pacientes enquadrados nos grupos da região norte e sudeste do país foi estabelecida. Todavia, foi possível observar que os grupos foram formados entre indivíduos oriundos de mesmo estado ou região geográfica. Com relação aos grupos formados entre as amostras do Ceará, associações entre o gênero masculino e o local de origem das amostras foram estabelecidas com base nos genótipos de *M. leprae*, sugerindo que estes seriam fatores de risco para a transmissão da hanseníase. Neste estudo, também foi possível avaliar amostras de pacientes com hanseníase recidiva para quatro VNTRs e os achados sugerem que estes pacientes foram re-infectados ou que houve mudança da população bacteriana durante a recidiva da doença. Os resultados comprovam que a genotipagem de *M. leprae* é uma ferramenta importante na elucidação de aspectos relativos à transmissão e disseminação da doença pelo mundo.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

GENOTYPING OF *MYCOBACTERIUM LEPRAE* ISOLATES FROM BRAZILIAN LEPROSY PATIENTS

ABSTRACT

TESE DE DOUTORADO

Amanda Nogueira Brum Fontes

Leprosy is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae*. After sequencing the genome of this pathogen, numerous efforts have been made to identify repetitive sequences with potential to differentiate isolates of *M. leprae*. Currently, VNTRs have been used in order to understand the genetic diversity of this pathogen in areas with high prevalence of leprosy. Another form of genetic polymorphism, namely single nucleotide polymorphisms (SNPs), elucidated aspects related to the spread of leprosy in the world. In this study, the genetic variability of 292 *M. leprae* isolates from clinical leprosy patients from the north, northeast and southeast of the country, were analyzed for composition of 16 VNTRs and three SNPs. The genetic variability of different VNTRs was evaluated by MLVA (Multiple-locus VNTR analysis) using FLA (Fragment length analysis) while the SNPs were analyzed by RFLP-PCR and/or sequencing. The discriminatory power of 16 VNTRs was 0.999 and the AT dinucleotides and the GAA21 trinucleotide demonstrated the higher rates of allelic discrimination. In addition to the genotyping of isolates of *M. leprae* derived from skin biopsy samples, lymph fixed in ZN slides was also used as an alternative source to obtain DNA. By SNP typing, we observed the high prevalence of genotype 3, previously associated with Europeans, in the states of Rondônia, Rio de Janeiro and São Paulo. On the other hand, genotype 4, originating from Western Africa, was predominant in Pernambuco and Fortaleza. The presence of different genotypes and their prevalence in certain areas of Brazil is in accordance to the country's history of colonization which reflects in the current ethnic composition of the population. Based on the VNTR and SNP profiles, six identical groups of two isolates each were identified: four from Ceará, one from Rondônia and another composed of samples from Minas Gerais and São Paulo. No association between patients from north and southeast of the country was established, however, most groups were composed by patients from the same state or geographic region. When performing an analysis of genotype similarity with patient data in groups from Ceará, we observed association of male gender and place of origin with *M. leprae* genotype grouping, suggesting these could be risk factors for transmission of leprosy. In this analysis, patients with leprosy relapse were also analyzed for four VNTRs and the results suggest the occurrence of re-infection or of bacterial population shift during disease relapse. The results of this study demonstrate that genotyping of *M. leprae* is an important tool to elucidate aspects of transmission and spread of disease in the world.

1. Hanseníase: Agente Etiológico

O *Mycobacterium leprae* é um patógeno intracelular obrigatório que infecta principalmente células de Schwann de nervos e macrófagos da pele (Kaplan & Cohn, 1986) gerando um quadro clínico de inflamação crônica associado à uma neuropatia periférica que pode resultar em sequelas irreversíveis.

O bacilo pertence ao gênero *Mycobacterium*, ordem Actinomycetales. Apresenta-se sob a forma de bastonete, na maioria das vezes reto ou ligeiramente encurvado, é imóvel, não forma endospóro, esporo ou cápsula e é álcool-ácido resistente (BAAR). O gênero é considerado gram-positivo, embora não seja bem corado pelo método de Gram (Rees, 1985).

Uma característica marcante das micobactérias é a estrutura de sua parede celular cujos componentes principais são o complexo peptidoglicano-arabinogalactana-ácidos micólicos, a família dos fosfatidilinositol manosídeos (PIMs), os polímeros lipomanana (LM) e lipoarabinomanana (LAM). Entre os lipídeos que se localizam na camada mais externa do envelope micobacteriano, merece destaque o glicolípido fenólico 1 (PGL-1) específico de *M. leprae* e encontrado abundantemente na superfície deste bacilo.

Embora este microrganismo tenha sido identificado por Gerhard Henrik Armauer Hansen em 1873, ainda não é cultivável em meio de cultura artificial, dificultando assim o estabelecimento de estudos que elucidem vários aspectos da patogenia causada por este bacilo.

2. Modelos Experimentais Animais

Até pouco tempo acreditava-se que o homem era o único hospedeiro natural de *M. leprae*. Sua multiplicação em outro mamífero foi descrita pela primeira vez por Charles Shepard (1960) após inoculação do patógeno em coxim plantar de camundongos Balb/c. Este mesmo autor demonstrou, alguns anos mais tarde, que camundongos timentomizados apresentavam uma infecção generalizada quando inoculados com *M. leprae* (Shepard, 1962). Desta forma, o posterior desenvolvimento do modelo murino *nu/nu* atímico para o cultivo de *M. leprae* em coxim plantar permitiu que grandes quantidades do bacilo viável fossem obtidas para uso experimental (Truman e col., 2001; Lahiri e col., 2005).

Em 1971, foi descrita a infecção experimental de uma espécie de tatu conhecida como tatu galinha ou de nove bandas (*Dasypus novemcinctus*). A baixa temperatura corporal (30-35°C) e o desenvolvimento da forma disseminada da hanseníase após a inoculação com bacilos derivados de lesões de pacientes fizeram com que esta espécie animal se tornasse um importante modelo experimental para a obtenção de grande quantidade de bacilos. Nesses animais superinfectados, os órgãos internos, com destaque para o fígado e o pâncreas, podem conter mais do que 10^{10} *M. leprae* por grama de tecido. Os bacilos obtidos são então purificados e utilizados nas pesquisas de fisiologia, imunohistoquímica e biologia molecular (Kirchheimer & Storrs, 1971).

Tatus naturalmente infectados foram encontrados nos Estados Unidos há mais de 30 anos (Filice e col., 1977). No exame histopatológico das lesões, foi observado que estas eram idênticas às obtidas experimentalmente, com infiltrados histocitários com grande número de bacilos, havendo comprometimento de nervos, gânglios, baço e fígado. Em 1990, estudos sorológicos mostraram que 16% do tatus analisados no estado da Louisiana, Estados Unidos tiveram contato com o bacilo de *M. leprae* (Truman e col., 1991). Cordona-Castro e colaboradores (2009) conduziram um estudo no qual foi detectado DNA de *M. leprae* em 40.9% dos tatus capturados ao longo de dois anos na região andina da Colômbia. Neste país sul americano o consumo de carne bem como o contato direto com estes animais são comuns, tornando-os importantes reservatórios de *M. leprae* e sugerindo um possível foco de contaminação.

3. Transmissão da Hanseníase

O contágio entre seres humanos através das secreções das vias respiratórias (nariz e boca) tem sido sugerido como a forma mais provável de transmissão da doença. Acredita-se que o contato íntimo e prolongado com os pacientes que apresentam as formas multibacilares da doença seja um fator importante para a transmissão do bacilo. Desta forma, os indivíduos residentes na mesma casa (contatos domiciliares) são considerados um grupo de alto risco para o desenvolvimento da doença.

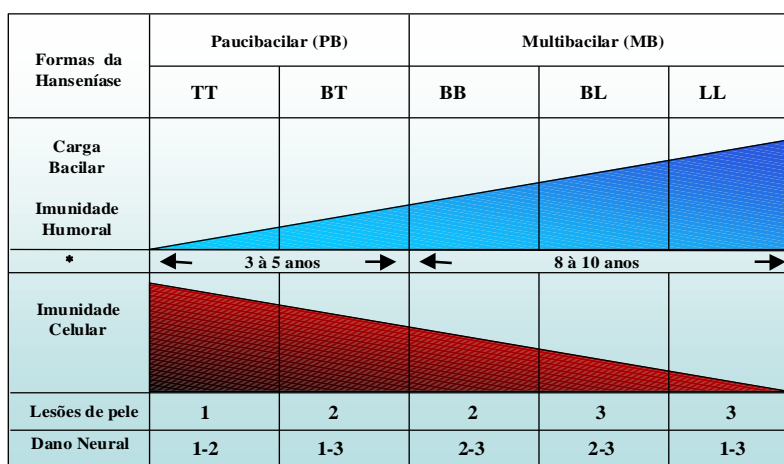
Um estudo recente demonstrou a presença de DNA de *M. leprae* em lavados de pele de pacientes hansenianos (Job e col., 2008), o que sugere que a pele também poderia ser considerada como uma nova via de transmissão no contágio entre pessoas. Apesar dos seres humanos serem o mais importante reservatório de *M. leprae*, estudos realizados em áreas endêmicas também detectaram a presença de DNA deste microrganismo em amostras de água

na Indonésia (Matsuoka e col., 1999) e de solo na Índia (Lavania e col., 2008), sugerindo desta forma que o ambiente poderia servir também como fonte de contágio. Todavia, esses resultados devem ser aprofundados e verificados.

4. Formas Clínicas da Hanseníase e Resposta Imune

Os pacientes com hanseníase podem ser enquadrados em um dos cinco grupos do espectro clínico, dependendo da disseminação da doença e da imunidade celular suscitada no hospedeiro (Ridley & Jopling, 1966). Assim, em um pólo do espectro está a hanseníase lepromatosa (LL): forma clínica com indivíduos apresentando uma intensa resposta imune humoral e uma deficiente resposta imune celular, com alta carga bacilar e reação negativa ao teste cutâneo de lepromina. No outro pólo do espectro está a hanseníase tuberculóide (TT); os indivíduos pertencentes a este grupo apresentam uma baixa resposta imune humoral e uma forte imunidade celular adquirida, desenvolvendo uma hipersensibilidade contra o bacilo de *M. leprae*, com uma carga bacilar tipicamente baixa e reação positiva à lepromina. No entanto, a maioria dos pacientes hansenianos está posicionada entre esses dois pólos formando o grupo “boderline”. Este grupo é definido de acordo com a proximidade ao pólo resistente (boderline tuberculóide, BT) ou suscetível (boderline lepromatoso, BL). O grupo boderline boderline (BB) situa-se entre os dois grupos intermediários (figura 1.1). A forma indeterminada (I) foi proposta como sendo um estágio inicial e transitório da doença, podendo evoluir para uma das cinco formas clínicas estáveis (Jopling & Mc Dougall, 1988).

Figura 1.1. Representação esquemática do espectro clínico e imunopatológico da hanseníase



1- Leve, 2-Moderado e 3- Severo. * Tempo de aparecimento da sintomatologia clínica. Modificado de Ridley & Jopling, 1966

A Organização Mundial da Saúde (OMS) sugere, para os locais endêmicos onde métodos diagnósticos laboratoriais não são disponíveis ou confiáveis, a utilização da classificação essencialmente clínica com base no número de lesões cutâneas. Por este método são classificados como hanseníase paucibacilar (PB) os casos com até cinco lesões cutâneas e como hanseníase multibacilar (MB) os com mais de cinco lesões cutâneas (OMS, 1998). As formas TT e BT são consideradas paucibacilares e as formas LL, BL e BB são classificadas como multibacilares. Os valores da sensibilidade e a especificidade da classificação pelo número de lesões cutâneas, quando comparados com os resultados dos exames baciloscópicos, são de 89,6% e 83,8%, respectivamente (Gallo e col., 2003).

A diversidade de formas clínicas na hanseníase se baseia na habilidade do hospedeiro em desenvolver uma resposta imune celular ao *M. leprae*. Por esta razão, a noção de que conjuntos diferentes de genes modificam a suscetibilidade à doença tem sido amplamente aceita. Esses genes podem agir em dois momentos distintos: (I) no controle da infecção *per se*, ou seja, na suscetibilidade à doença independentemente de sua manifestação clínica e (II) uma vez que o indivíduo seja infectado, na definição das diferentes formas clínicas da doença. Essa diferença de resposta imune parece estar associada a padrões que variam desde uma resposta bem sucedida presente nas formas mais brandas da doença, até uma ausência, quase que completa, de resposta imune celular, levando ao desenvolvimento de formas mais graves da doença (Prevedello & Mira, 2007). Desde a década de 80, estudos demonstram que os padrões de resistência versus suscetibilidade são regulados por duas subpopulações de linfócitos T: Th1 e Th2 que produzem citocinas que controlam a resposta imune celular (Mosmann e col., 1986). As citocinas produzidas por Th1 incluem a IL-2, IFN e IL-12, enquanto que as produzidas por Th2 incluem a IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13. Na resposta de Th1, a citocina IFN ativa os macrófagos enquanto que a IL-2 estimula a proliferação de células T antígeno-específicas, resultando na forma mais branda da doença (Cher & Mosmann, 1987). Já na resposta de Th2 que produz citocinas imunoregulatórias (IL-4 e IL-10) há o aumento da resposta humoral que resulta numa infecção progressiva (Sieling & Modlin, 1994). Yamamura e colaboradores, em 1991, através da análise da expressão gênica de citocinas a partir de RNAm extraído de lesões de pacientes hansenianos, verificaram que IL-2, LTA e IFN estavam sendo expressas de forma aumentada na pele de indivíduos com as formas resistentes, ou seja, mais brandas da doença. Todavia, as expressões de IL-4, IL5 e IL10 foram mais pronunciadas na pele dos pacientes com as formas multibacilares.

5. Neuropatia Hanseniana

A infecção das células nervosas tem início a partir da fixação do *M. leprae* à lâmina basal, que envolve o axônio e a célula de Schwann, utilizando como ligante a laminina- $\alpha 2$ (Rambukkana e col., 2002). Este mecanismo de ligação da superfície de células de Schwann via lamininas- $\alpha 2$ não é específico deste patógeno. Outras espécies de micobactérias como *M. tuberculosis*, *M. chelonae* e *M. smegmatis* também apresentam esta mesma capacidade, sugerindo que esta seja uma característica comum às bactérias pertencentes ao gênero *Mycobacterium* (Scollard e col., 2006). Durante a invasão da célula, o complexo *M. leprae*-laminina- $\alpha 2$ utiliza como receptor a α -dístroglicana presente na superfície da célula de Schwann (Rambukkana, 2001).

Outras moléculas como a proteína HLP (do inglês, “Histone-like Protein”) e o PGL-1 também foram descritos como mediadores da interação entre *M. leprae* com seu hospedeiro (Shimoji e col., 1999; Ng e col., 2000). Pessolani e colaboradores (2003) descreveram a capacidade de ligação da HLP a diferentes isotipos de colágeno, sugerindo que esta molécula é capaz de mediar também a interação de *M. leprae* com outros tipos de células e membranas basais.

Após a infecção, o bacilo de *M. leprae* tende a proliferar nas células de Schwann. A explicação para a perda de mielina possui hipóteses controversas. No estudo de Hagge e colaboradores (2002) não foi demonstrada a perda maciça de mielina ou destruição de axônios em virtude da exposição ao bacilo. No mesmo ano, Rambukkana e colaboradores utilizando co-culturas de neurônios e células de Schwann constataram que a desmielinização poderia ser desencadeada pelo PGL-1. Alguns anos mais tarde, e utilizando camundongos que não possuíam linfócitos B e T, o mesmo autor demonstrou que a ligação de *M. leprae* a superfície de células de Schwann mielinizadas seria suficiente para induzir a rápida desmielinização das mesmas (Rambukkana e col., 2004). Todavia estes resultados não estão de acordo com as observações clínicas e histopatológicas da hanseníase, pois pacientes com a forma lepromatosa da doença podem conter bilhões de bacilos e demonstrar pouca ou nenhuma desmielinização. A não concordância entre os resultados experimentais e clínicos está relacionada à ausência de modelos animais que reproduzam com fidelidade a fisiopatologia da hanseníase e ao fato de que o efeito do dano neural pode variar entre os indivíduos.

6. Estados Reacionais Hansênicos

Um agravante do estado clínico dos pacientes com hanseníase é a ocorrência de estados reacionais hansênicos, que são episódios agudos ou subagudos com comprometimento neurológico, cutâneo e sistêmico, isolados ou simultâneos, variando de acordo com cada caso e com o tipo de reação. Os estados reacionais ocorrem por alterações no sistema imunológico com fisiopatologia e fatores desencadeantes ainda não completamente elucidados. Devem ser considerados como uma complicação emergencial cujo diagnóstico e tratamento devem ser precoces para a prevenção de sequelas, principalmente neurológicas. São reconhecidos os seguintes tipos de reações em hanseníase: (i) a reação tipo 1 ou reação reversa (RR); (ii) a reação tipo 2 ou eritema nodoso hansênico (ENH); (iii) a neurite isolada: nos casos em que há comprometimento dos troncos periféricos.

A reação tipo 1 ou reação reversa (RR) afeta principalmente os indivíduos com hanseníase borderline, especialmente durante o tratamento. Neste tipo de reação há o aumento da imunidade celular ao *M. leprae* que causa uma resposta inflamatória de hipersensibilidade tardia eficiente na eliminação do bacilo, mas extremamente danosa ao tecido afetado. Imunologicamente ocorre uma expansão dos linfócitos T *M. leprae*-específicos e produção de IFN- γ , levando à formação de granulomas e ao aumento da atividade microbicida dos macrófagos. Clinicamente caracteriza-se por uma inflamação das lesões cutâneas e quadro de neurite aguda (Scollard e col., 2006). Já a reação tipo 2 ou eritema nodoso hansênico (ENH) ocorre devido à ativação de citocinas como TNF, IL-2, IL-6 e IL-8. Este tipo de reação ocorre com maior frequência nos casos com a forma lepromatosa-lepromatosa, principalmente durante o segundo ano de tratamento com a poliquimioterapia (Nery e col., 1998). A resposta imune celular parece também contribuir para o desenvolvimento deste tipo de reação que, além dos comprometimentos neurológicos e cutâneos, apresenta sintomas sistêmicos como: febre, edema, adenomegalia, obstrução nasal, perda de peso, mialgia e etc (Sarno e col., 1991).

As reações podem ocorrer antes da introdução da poliquimioterapia, durante o tratamento ou até mesmo após a alta terapêutica.

7. Genes e Suscetibilidade à Hanseníase

O período de incubação da infecção varia de meses a anos, mas o aparecimento da sintomatologia clínica normalmente acontece entre o segundo e o quinto ano após a infecção. A forma clínica da doença é determinada pela maior ou menor capacidade do indivíduo de desenvolver uma resposta imunológica específica contra *M. leprae*. Estima-se que 90% da população desenvolvam imunidade protetora adequada na infecção, não apresentando sintomas clinicamente detectáveis (Godal e col., 1972). Muitos indivíduos expostos ao *M. leprae* não desenvolvem a doença, o que sugere que possivelmente exista uma diferença de virulência entre isolados de *M. leprae* ou que a suscetibilidade à hanseníase varia de pessoa para pessoa.

Alguns autores têm descrito que a suscetibilidade à hanseníase possui forte componente genético (Casanova e col., 2002). Nesse contexto diversos estudos têm sido desenvolvidos a partir de genes candidatos que possivelmente teriam um papel no controle da infecção. Os genes candidatos são normalmente selecionados com base em três critérios: (i) possível papel crítico na patogênese da doença (candidatos funcionais); (ii) sua localização em região genômica previamente envolvida no controle da doença (candidatos posicionais); ou (iii) combinação de candidatos funcionais/posicionais. Dentre os genes candidatos envolvidos na definição da suscetibilidade à hanseníase existem duas classes: a dos genes que estão ligados a região do antígeno leucocitário humano (HLA do inglês, “Human leukocyte antigen”) e a dos genes que não estão ligados ao HLA. Vanderborgh e colaboradores (2007) demonstraram que o locus HLA-DRB1 desempenha um importante papel na ativação da resposta imune celular do hospedeiro, sendo que um alelo (HLA-DRB1*10) está associado à suscetibilidade enquanto que outro (HLA-DRB1*04) está associado à resistência.

Estudos recentes têm sugerido que SNPs (do inglês, “Single nucleotide polymorphisms”) presentes nos genes das citocinas fator de necrose tumoral (TNF do inglês, “Tumor Necrosis Factor”) e linfotóxina-alfa (LTA do inglês, “Lymphotoxin alpha”) poderiam explicar os diferentes padrões de resposta observados entre pacientes tuberculóides e lepromatosos (Santos e col., 2002; Alcais e col., 2007). A associação de alelos do gene da LTA e a suscetibilidade à hanseníase *per se* foi observada em duas populações distintas. No entanto, para o gene do TNF esta associação entre determinado alelo e os fenótipos de resistência ou suscetibilidade demonstrou-se inconsistente comparando os dados obtidos em diferentes estudos. Para avaliar o papel da LTA e TNF na resposta do hospedeiro ao patógeno um estudo funcional utilizando camundongos nocaute para essas duas citocinas foi realizado (Hagge e col., 2009). Os resultados demonstraram que os camundongos deficientes para LTA

eram incapazes de recrutar linfócitos, desenvolver e manter granulomas, bem como controlar o crescimento de *M. leprae*. A deficiência de TNF gerou inflamação intensa e aguda nos camundongos, aumentando a taxa de crescimento do bacilo frente à infecção com o patógeno. Esses dados indicam que TNF e LTA são essenciais para a regulação do granuloma e que exercem efeitos diferentes no que se refere à resposta imune mediada por célula em modelo experimental.

Outros genes como IL-10 (Moraes e col., 2004; Moraes e col., 2006), VDR (Roy e col., 1999; Fitness e col., 2004), ficolina-2 (FCN2) (de Messias-Reason e col., 2009), beta-defensina 1 (DEFB1) (Prado Montes e col., 2009) e receptores da família Toll-like (Schuring e col., 2009; Bochud e col., 2009) também têm sido estudados quanto suas influências na suscetibilidade genética do hospedeiro à hanseníase.

Mira e colaboradores (2003) identificaram dois genes no cromossomo 6q25-q26 diretamente relacionados à suscetibilidade do hospedeiro a hanseníase: PARK2 e PACRG. Polimorfismos na região regulatória desses dois genes estariam associados a um fator de risco para o desenvolvimento da doença. Observou-se também que esses dois genes são expressos por Células de Schwann primárias; sendo que PARK2 também é expresso por macrófagos derivados de monócitos, enquanto que PACRG é pouco ativado nessas células (Mira e col., 2004).

8. Hanseníase: Distribuição Geográfica

Apesar do seu agente etiológico de ter sido descoberto no final do século XIX e desde 1943 existirem tratamentos efetivos, a hanseníase ainda é um problema de saúde pública. A doença não tem uma distribuição geográfica uniforme. A falta de conhecimento do número definido de pessoas infectadas e assintomáticas, que podem exercer papel ativo na transmissão da doença, obscurece ainda mais os determinantes que influenciam na distribuição geográfica da doença.

Os países com maiores coeficientes de prevalência encontram-se nas regiões menos desenvolvidas como América Latina, África e Ásia. Brasil e Índia são alguns dos países com maior incidência de hanseníase no mundo: todos têm mais de um caso para cada grupo de 10 mil habitantes.

Em 1982, por sugestão da OMS, a poliquimioterapia (PQT) foi inicialmente implantada nos países endêmicos para hanseníase. Desde então, a taxa de prevalência tem apresentado forte declínio, mas, paradoxalmente, o número de novos casos/ano tem se

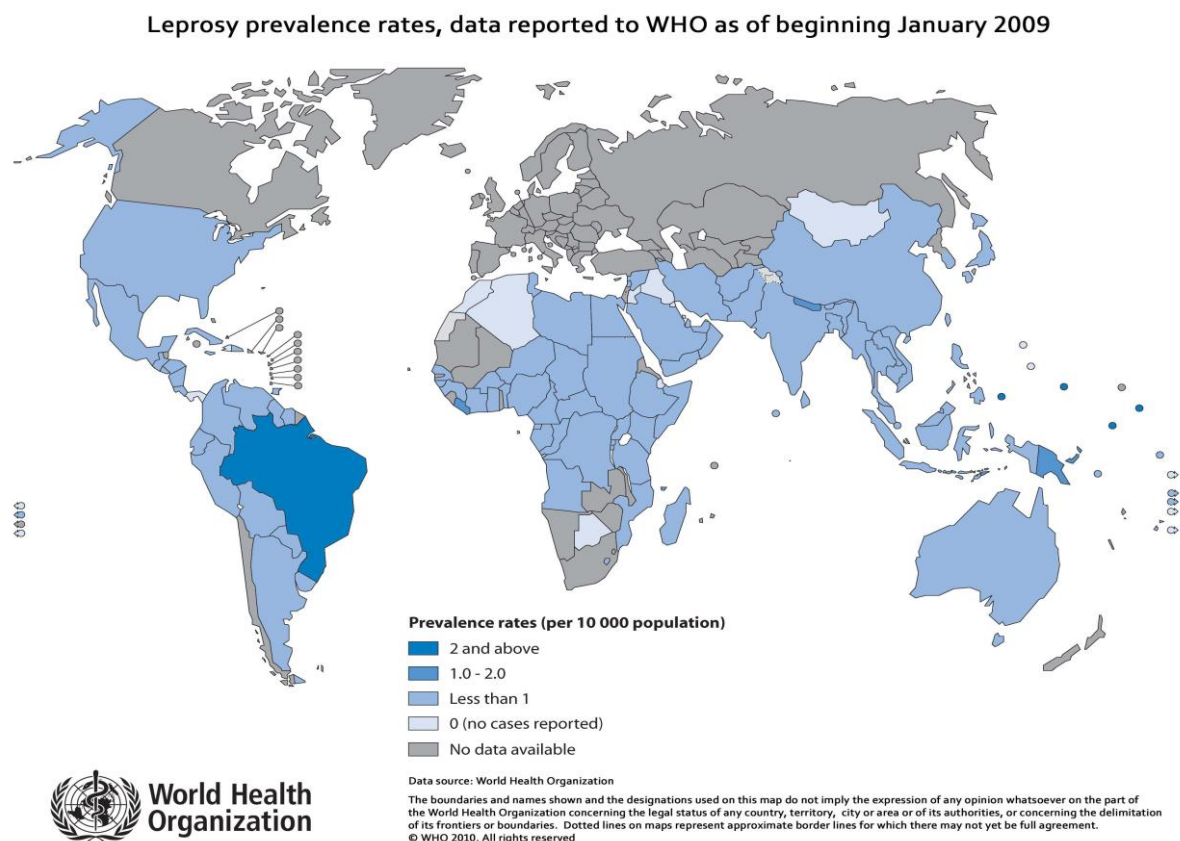
mantido. Essa persistência pode ser atribuída a vários fatores, tais como a intensidade na busca de novos casos, a alta transmissão em certas áreas devido aos indivíduos assintomáticos e transmissores ou à recidiva.

No Brasil, em 2009, o número total de novos casos de hanseníase detectados foi de 37.610 (www.portal.saude.gov.br). A região nordeste apresentou 41% destes casos, sendo os estados do Maranhão e de Pernambuco os que demonstraram as maiores taxas. No outro extremo está a região sul, com o menor número de casos novos detectados da doença: 1.607, sendo o estado do Rio Grande do Sul o que apresentou as menores taxas. Já o coeficiente de prevalência da doença no país, em 2009, foi de 1,99 casos em 10.000 habitantes, sendo a região centro-oeste a que apresenta os maiores coeficientes (5,04 por 10.000 habitantes), prosseguida pela região norte (5,02 por 10.000 habitantes). O número de casos notificados da doença nem sempre representa a totalidade dos casos realmente existentes. Estudos de prevalência oculta estimam que, aproximadamente, 10.000 casos permanecem sem diagnóstico e que este fato decorre de múltiplos fatores tais como: deficiências da rede pública de saúde e a falta de informação da população sobre a doença.

O Brasil tinha como meta acordada com a OMS, a eliminação da hanseníase como problema de saúde pública até o final do ano de 2011, ou seja, uma taxa de prevalência de < 1 doente a cada 10.000 habitantes. No entanto, este compromisso firmado com a OMS foi abandonando em 2009 e uma nova estratégia foi estabelecida: o controle.

A prevalência mundial de novos casos de hanseníase registrados no início de 2010 foi de 211.903 casos, enquanto que em 2009 foi de 244.796 (<http://www.who.int/lep/en/>). Comparando os dois anos é possível verificar uma redução de 13.5% do número de novos casos. Países como Angola, Brasil, República Centro-Africana, Congo, Índia, Moçambique, Nepal e Tanzânia ainda apresentam áreas de alta endemicidade (figura 1.2).

Figura 1.2. Distribuição da hanseníase no mundo (OMS, 2009).



Em azul (>3 pacientes/10.000 habitantes) as demais cores são países de baixa endemicidade (<3 pacientes/10.000 habitantes) ou sem informação.

9. Diagnóstico da Hanseníase

O diagnóstico da hanseníase em si não constitui um problema para a maioria dos casos. Normalmente, uma boa anamnese e um exame clínico cuidadoso permitem quase sempre o diagnóstico. Seguindo o guia de controle da OMS, são avaliados o estado físico do paciente para detecção de eventuais lesões e a perda de sensibilidade em áreas da pele. Normalmente a avaliação da sensibilidade faz parte da rotina no diagnóstico de hanseníase e de outras dermatoses. Os três tipos de sensibilidade avaliados são: a térmica (primeira a ser alterada), seguida da dolorosa e da tátil, bem como espessamento dos nervos. Outros procedimentos podem ser utilizados como complemento no diagnóstico da hanseníase, tais como: (i) determinação do Índice Baciloscópico (IB) por microscopia de linfa; (ii) determinação do índice morfológico (IM) com o objetivo de examinar a morfologia dos bacilos presentes em esfregaços, refletindo desta forma a viabilidade dos bacilos; (iii) o teste de Mitsuda, realizado para a avaliação do grau de defesa do paciente frente ao *M. leprae*; e,

finalmente, (iv) o exame histopatológico, que contribui para a correta classificação do paciente dentro do amplo espectro clínico da doença.

9.1. Baciloscopia

O exame baciloscópico de esfregaços dérmicos (linfa de lóbulos auriculares, cotovelos e lesões) consiste na simples contagem em lente de imersão (objetiva 100x) dos bacilos na linfa após a coloração pelo método de Ziehl-Neelsen. Para os exames histopatológicos, biópsias cutâneas ou do ramo sensitivo dos nervos periféricos são utilizadas. Através da coloração pela técnica de Wade, que detecta a presença de BAAR, torna-se possível a visualização do bacilo. Desse modo, o índice logarítmico da biópsia (ILB) segue os mesmos critérios do índice baciloscópico (IB), exceto pelo fato de se levar em consideração o logaritmo da área ocupada pelos granulomas. O índice baciloscópico (IB) proposto por Ridley & Jopling em 1962 é recomendado pelo Ministério da Saúde nos exames em pacientes hansenianos. Este índice é realizado em 100 campos representativos e apresentado em escala logarítmica que varia de 0 a 6+ (tabela 1.1). O IB está sujeito a numerosas variáveis, tais como: a profundidade do corte, a quantidade de tecido removido, o tamanho e a espessura do esfregaço, etc. Entretanto, se estas variáveis forem reduzidas, os resultados poderão ser praticamente idênticos quando indivíduos diferentes examinarem a mesma lâmina. É possível ainda, estabelecer uma relação entre o índice baciloscópico (IB) e a forma clínica da doença (tabela 1.2).

Tabela 1.1 Índice Baciloscópico (IB) projetado para 100 campos microscópicos (adaptado de Ridley & Jopling, 1962).

IB	LEITURA
0	Não há bacilo em nenhum dos 100 campos examinados
1+	1-10 bacilos, em 100 campos examinados
2+	1-10 bacilos, em cada 10 campos examinados (11-99 bacilos em 100 campos)
3+	10 bacilos, em média, em cada campo examinado
4+	100 bacilos, em média, em cada campo examinado
5+	1000 bacilos, em média, em cada campo examinado
6+	Mais de 1000 bacilos, em média, em cada campo examinado

Tabela 1.2. Associação entre o índice baciloscópico (IB) e a forma clínica dos pacientes com hanseníase.

Classificação Clínica	Índice baciloscópico (IB)
I	Baciloscopia sempre negativa
TT	IB=0, raríssimos casos apresentam bacilos em lesões ativas
BT	IB=1+, raros casos apresentam bacilos
BB	IB=0 a 4+, baciloscopia positiva ou negativa em esfregaços de lesões de pequenos grupamentos bacilares
BL	IB=1+ a 5+, baciloscopia positiva ou negativa em áreas não lesionais; presença de pequenas globias e grupamentos bacilares
LL	IB=3+ a 6+, positiva em todos os sítios mesmo antes das manifestações clínicas. Presença de numerosas e volumosas globias e grupamentos bacilares

9.2. Testes Laboratoriais Alternativos para o Diagnóstico da Hanseníase: PGL-1 e PCR

Dos vários testes laboratoriais realizados para o auxílio no diagnóstico da hanseníase, dois testes imunológicos são feitos: o teste quantitativo de ELISA (do inglês, “Enzyme-linked immunosorbent assay”) e o semi-quantitativo de fluxo lateral (do inglês, “ML flow test”). Ambos são realizados para determinar a presença de anticorpos contra o antígeno específico PGL-1 de *M. leprae*. Estudos anteriores comprovaram que os anticorpos IgM específicos contra o antígeno PGL-1 são encontrados em cerca de 90 a 100% dos pacientes multibacilares e em cerca de 40% dos pacientes paucibacilares, sendo que esses níveis de anticorpos presentes nos pacientes diminuem até o fim do tratamento (Britton & Lockwood, 2004). Observa-se também, correlação entre a forma clínica dos pacientes, os resultados da baciloscopia e os testes de detecção de anticorpos anti-PGL-1, visto que os pacientes paucibacilares são considerados soronegativos e os multibacilares soropositivos (Tomimori-Yamashita e col., 1999; Bühner-Sékula e col., 2001; Schuring e col., 2006). Além disso, verifica-se alta correlação entre os resultados dos testes de ELISA, anti-PGL-1 e de fluxo lateral (Bühner-Sékula e col., 2003). Recentemente, Da Silva e colaboradores (2010) comparando os ensaios sorológicos de ELISA com o teste de fluxo lateral verificaram taxas de detecção de anticorpos anti-PGL-1 de 53,3% e 70%, respectivamente. Por outro lado, há estudos que demonstram a existência de correlação inversa significativa entre os níveis de anticorpos anti-PGL-1 e o teste de Mitsuda (Maeda e col., 2003; Goulart e col., 2008). Os resultados obtidos com os testes imunológicos sugerem que estes podem ser uma ferramenta valiosa para auxiliar na classificação clínica da hanseníase.

As técnicas de amplificação de ácidos nucleicos PCR (do inglês, “Polymerase Chain Reaction”) possuem alto nível de sensibilidade e especificidade, sendo por esta razão amplamente utilizada na detecção direta de DNA microbiano em espécimes clínicos. Antes do sequenciamento completo do genoma de *M. leprae*, a tecnologia da hibridação por *Southern Blotting* permitiu a detecção do bacilo em amostras de pacientes multibacilares (Woods & Cole, 1989). No entanto, no caso dos pacientes paucibacilares a técnica não demonstrou a mesma sensibilidade.

Na década de 90, sistemas de PCR para amplificação de regiões gênicas que codificam para os antígenos 65kDa (Plikaytis e col., 1990), 36kDa (Kampirapap e col., 1998), 18kDa (Scollard e col., 1998), bem como para a sequência repetitiva RLEP (Woods & Cole, 1989) foram desenvolvidos. Métodos de amplificação gênica tendo como alvo elementos repetitivos demonstram maior sensibilidade quando comparados aos sistemas que amplificam elementos de única cópia (Donoghue e col., 2001).

Um estudo conduzido por Santos e colaboradores (1993) analisou as taxas de detecção de *M. leprae* em amostras de sangue, linfa e biópsia de pele para todas as formas clínicas da doença. Os resultados demonstraram que a amplificação a partir de amostras de sangue apresentou resultados inferiores quando comparados aos resultados obtidos com os demais espécimes clínicos. Todavia, a presença de bacilo neste espécime clínico específico pode significar apenas um resquício da infecção após contato com *M. leprae* e não o desenvolvimento da doença em si. Considerando que o trato respiratório superior é a principal porta de entrada e saída de *M. leprae*, pesquisas envolvendo a detecção por PCR a partir de secreção nasal foram realizadas (de Wit e col., 1993; Pattyn e col., 1993; Klatser e col., 1993; Santos e col., 1995). Esses trabalhos não conseguiram estabelecer relação entre a detecção do bacilo na amostra clínica e posterior desenvolvimento da doença. De acordo com estudos posteriores (Beyene e col., 2003; Almeida e col., 2004), pacientes que apresentavam DNA de *M. leprae* em amostras de muco nasal poderiam estar apenas carregando o bacilo muitas vezes de forma transitória sem manifestação explícita da doença.

Atualmente, métodos como PCR convencional, RT-PCR (do inglês, “Reverse-Transcription PCR”), nested PCR e PCR em tempo real (do inglês, “Real-time PCR”) têm sido utilizados para amplificação de sequências presentes no genoma de *M. leprae*. Inúmeros espécimes clínicos como: linfa, sangue, bulbos capilares, secreção nasal, concha nasal inferior, lesão do nervo e lesão ocular podem ser utilizados para obtenção de DNA desse bacilo (Carus e col., 1995; Santos e col., 1997; Torres e col., 2003; Jardim e col., 2005; Patrocínio e col., 2005). No entanto, o nível mínimo de detecção de alguns métodos de PCR pode variar de 1 a 300 bacilos dependendo do sistema utilizado (Woods e Cole, 1989;

Williams e col., 1990; Plikaytis e col., 1990; de Wit e col., 1991; Kramme e col., 2004; Phetsuksiri e col., 2006; Truman e col., 2008).

A tecnologia de PCR em tempo Real, uma forma automatizada da PCR convencional, tem melhorado o diagnóstico molecular de infecções causadas por diferentes patógenos. Esse método quantifica o DNA bacteriano presente em diferentes espécimes clínicos. Por esta razão, desde 2004 pesquisadores vêm utilizando diferentes métodos de PCR em tempo real e genes alvo para diagnosticar e quantificar o número de bacilos de *M. leprae* presentes em diversos tecidos (Lahiri e col., 2005; Rudeeaneksin e col., 2008; Truman e col., 2008). Os resultados obtidos demonstraram que esta técnica apresenta sensibilidade e taxas de detecção similares ou superiores às encontradas em sistemas de PCR convencionais. No entanto, sua utilização está restrita a casos difíceis de diagnosticar como os da forma neural pura (PNL) (Chemouilli e col., 1996; Jardim e col., 2003, Jardim e col., 2005).

10. Tratamento da Hanseníase

Em 1982 foi implantado pela OMS o esquema de poliquimioterapia, composto pelas drogas clofazimina (CFZ), dapsona (DDS) e rifampicina (RFM). Essa estratégia teve bom resultado e a prevalência mundial da hanseníase foi reduzida em aproximadamente 85%, com cura de mais de nove milhões de pacientes (WHO, 1999).

A poliquimioterapia é administrada através do esquema-padrão, de acordo com a classificação operacional do doente em PB ou MB. A informação sobre a classificação do doente é fundamental para selecionar o esquema de tratamento adequado ao seu caso. Para crianças com hanseníase, a dose dos medicamentos do esquema-padrão também é ajustada de acordo com a idade. Já no caso de pessoas com intolerância a um dos medicamentos do esquema-padrão, são indicados esquemas alternativos. Um esquema alternativo conhecido como ROM (Rifampicina, Ofloxacina e Minociclina) pode ainda ser utilizado para tratar exclusivamente pacientes paucibacilares que tenham lesão única e nenhum envolvimento de troncos nervosos. A alta por cura é dada após a administração do número de doses preconizadas pelo esquema terapêutico.

11. Recidiva na Hanseníase

Na hanseníase é considerado como caso de recidiva o paciente que foi tratado regularmente, que recebeu alta por cura e que após um período de incubação variável aparece com sintomas de atividade da doença (Ministério da Saúde, 2000). Em 2009, foram registrados 1.473 casos de recidiva no Brasil, número que equivale a 3.6% do total de casos de hanseníase detectados no país. O estado do Acre apresentou as maiores taxas de recidiva, com 117 casos registrados (7.9%), enquanto que no estado de Rondônia apenas nove casos (0.6%) foram detectados (www.portal.saude.gov.br).

A recidiva caracteriza-se pelo aparecimento de novas lesões nos mesmos locais do primeiro diagnóstico ou em outras áreas da pele e/ou acometimento de nervos periféricos (neurite). Nos casos paucibacilares (PB), é imprescindível o diagnóstico diferencial com a reação reversa, sendo que esta responde favoravelmente com a terapia de corticosteróide sistêmico em doses preconizadas, diferente da recidiva (MS, 2000). Nos casos multibacilares (MB), há a suspeita de recidiva quando os pacientes iniciam reações: (i) após três anos da alta por cura; (ii) durante o tratamento; (iii) mantêm esse quadro por cinco anos (MS, 2000). O desenvolvimento da recidiva na hanseníase pode estar relacionado à: persistência ou resistência do bacilo, imunossupressão, gravidez, formas multibacilares, endemicidade do meio (reinfecção) e ao diagnóstico tardio, terapêutica inadequada ou irregular e erro de classificação (Oliveira, 1997, MS, 2000; Klioze & Ramos-Caro, 2000).

O período de incubação da recidiva na hanseníase obedece à linha sugerida por Pattyn (1990), onde as recidivas precoces resultam de uma terapia inadequada e comumente estão associadas aos pacientes PB. Todavia, as infecções tardias resultam de reinfecções ou reativação de organismos resistentes ocorrendo principalmente em pacientes multibacilares (Girdhar e col., 2000; Norman e col., 2004). Além disso, estudos conduzidos na Índia (Girdhar e col., 2000) e Filipinas (Cellona e col., 2003) demonstraram que taxas mais elevadas de recidiva estão associadas a pacientes com índice baciloscópico, no momento do diagnóstico, igual ou superior a quatro.

O diagnóstico clínico de recidiva deve ser acompanhado de baciloscopia e do estudo histopatológico da lesão. No entanto, a inoculação de bacilos em coxim plantar de camundongo, bem como a aplicação de técnicas moleculares para detecção de mutações em genes relacionados à resistência podem também auxiliar o diagnóstico (MS, 2000; You e col., 2005, da Silva Rocha e col, *in press*) O tratamento é feito com a reaplicação da poliquimioterapia (PQT) padrão, de acordo com a classificação clínica do paciente (MS, 2000).

12. Resistência às Drogas

Os frequentes relatos de resistência à dapsona (DDS), após tratamento em regime de monoterapia, fizeram com que a OMS preconizasse o esquema de poliquimioterapia para tratamento da hanseníase.

A dapsona, uma sulfona sintética, possui mecanismo de resistência ao *M. leprae* associado à mutações no *gene folP* decorrentes de eventos espontâneos ou de translocação. Esse gene codifica a produção da enzima dihidropteroato sintetase (DHPS) que tem mecanismo de atuação na biossíntese do folato em bactérias (Kulkarni & Sydel, 1983). Na maioria dos casos, os organismos resistentes produzem a enzima DHPS de forma alterada, tornando-os refratários à inibição pela sulfona (Kai e col., 1999). O gene *folP* possui ainda dois homólogos *folP1* e *folP2* (Williams e col., 2000), sendo que mutações nos códons 53 e 55 do primeiro homólogo parecem estar associadas ao desenvolvimento de altos níveis de resistência à dapsona em *M. leprae* (Cambau e col., 2006)

Relatos de resistência à rifampicina são menos frequentes, porém eles têm despertado preocupação uma vez que essa droga é o componente bactericida mais importante no tratamento da hanseníase (Levy e col., 1976). As bases genéticas de resistência a este medicamento têm sido estudadas desde a década de 1990. Mutações num pequeno segmento do gene *rpoβ*, que codifica a subunidade-β do DNA dependente da RNA polimerase, estão diretamente associadas à resistência a rifampicina em *M. leprae* (Williams & Gillis, 2004). Todavia, substituições no códon Ser425 são os tipos de mutações mais frequentes (Zhang e col., 2004).

A clofazimina possui atividade antimicrobiana importante, mas o seu mecanismo de ação ainda não foi completamente elucidado. A incidência de resistência à esta droga é baixa quando comparada com as demais. A ligação da clofazimina ao DNA ocorre principalmente em regiões que contenham sequências da base guanina. Por esta razão, as micobactérias, que possuem grande conteúdo GC tornaram-se excelentes alvos para esse tipo de droga. (Ebenezer e col., 2002)

A Ofloxacina é uma carboxiquinolona fluorada que possui atividade moderada (Ji e col., 1994 / Ji, 1998). Seu mecanismo de ação ainda não foi completamente elucidado em *M. leprae*, mas em outras bactérias essa droga impede o processo de replicação através da inibição da DNA girase, que é um tetrâmero que contém duas subunidades A (*GyrA*) e duas subunidades B (*GyrB*) (Drlica e col.1996). Mutações em *GyrA* estão associadas ao desenvolvimento de resistência à ofloxacina em *M. tuberculosis* e em *M. leprae* (Cambau e col., 1994; Takiff e col., 1994, Kim e col., 2003).

Atualmente, além da técnica de inoculação em coxim plantar de camundongos, é possível detectar bacilos resistentes às drogas também por métodos moleculares utilizando diferentes tipos de PCR e sequenciamento. Assim, mutações em genes que codificam regiões no alvo de ação das drogas ou na sua ativação são mais facilmente identificadas (Honore e col., 1993; Williams e col., 1994; Williams e col., 1998; Williams e col., 2000; Williams e col., 2001; Honore e col., 2001; Maeda e col., 2001; Cambau e col., 2002).

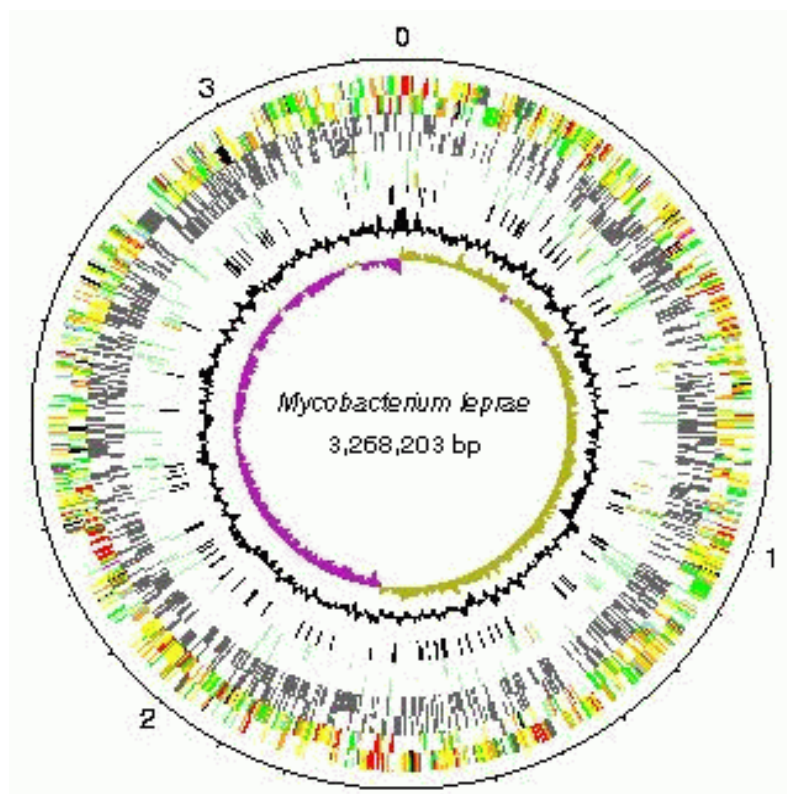
13. O Genoma de *Mycobacterium leprae*

Um grande avanço para o entendimento da biologia de *M. leprae* foi a conclusão do sequenciamento de seu genoma (Cole e col., 2001), composto por 3.268.203 pares de base (pb), conteúdo G+C de 57.8% (figura 1.3) e 1.605 genes que codificam proteínas, valores menores aos encontrados em *M. tuberculosis*, que possui 4.441.532 pb, conteúdo G+C de 65.6% e aproximadamente 4000 genes que codificam proteínas. Esses resultados demonstram uma perda maciça de genes pelo *M. leprae*, o que poderia explicar a taxa de crescimento lenta do bacilo, assim como sua incapacidade de crescimento *in vitro*.

Através de comparações das sequências genômicas entre *M. tuberculosis* e *M. leprae*, foi determinado que aproximadamente 1500 genes, comuns aos dois organismos, continuam funcionais em ambos. Uma análise funcional dos genes preservados em *M. leprae* revela a integridade da maioria das vias anabólicas; entretanto, mutações foram encontradas em genes envolvidos na regulação, na detoxificação, no reparo de DNA e no transporte ou fluxo de metabólitos (revisto por Vissa & Brennan, 2001).

O genoma de *M. leprae* contém 1.116 pseudogenes ou genes degenerados, assim denominados devido à perda de regiões necessárias para a sua transcrição e/ou tradução. Essa taxa é bem maior do que as observadas em outras espécies de micobactérias (tabela 1.3) (Akama e col., 2010). Além disso, o percentual de regiões não codificantes no genoma de *M. leprae* é de 24% enquanto que em *M. tuberculosis* é de 9%.

Figura 1.3. Genoma circular de *M. leprae* mostrando a posição e a orientação dos prováveis genes funcionais, pseudogenes e seqüências repetitivas (Cole e col., 2001).



De fora para dentro: círculos 1 e 2 (sentido horário e anti-horário) genes das fitas – e +, respectivamente; círculos 3 e 4 pseudogenes; 5 e 6 genes específicos de *M. leprae*; 7 seqüências repetitivas; 8 conteúdo G+C; 9 (G+C)/(G-C) desvio do conteúdo G/C. Ver http://www.sanger.ac.uk/Projects/M_leprae ou <http://genolist.pasteur.fr/Leproma/> para informações adicionais.

Tabela 1.3. Estrutura genômica de espécies de Micobactérias

Espécie	Número de pseudogenes	Número de genes	Tamanho do genoma (pb)
<i>M. tuberculosis</i>	6	3.959	4.441.532
<i>M. bovis</i>	27	3.953	4.345.492
<i>M. marinum</i>	65	5.424	6.636.827
<i>M. smegmatis</i>	168	6.897	6.988.209
<i>M. ulcerans</i>	771	4.160	5.631.606
<i>M. leprae</i>	1.116	1.605	3.268.203

Adaptado de Akama e colaboradores (2010)

Acredita-se que o genoma degenerado de *M. leprae* seja resultado de erros na replicação combinados a uma redução na capacidade de reparo do DNA. Este processo provocaria um acúmulo de mutações em genes não mais essenciais para a sobrevivência no ambiente intracelular. O processo denominado de “evolução redutiva” no qual há perda de função do genoma bacteriano tem sido observado unicamente em patógenos intracelulares como: *Rickettsia prowazekii* e *Chlamydia trachomatis* (Andersson & Andersson, 1999). Este mecanismo altera permanentemente o genótipo e resulta na adaptação ao ambiente em que a bactéria vive. Essa perda pode estar relacionada ao fato desses patógenos viverem num ambiente extremamente estável e rico em metabólitos, o que exigiria pouca versatilidade metabólica para a sobrevivência. Os genes perdidos na maioria dos casos codificam enzimas essenciais (isoenzimas) que se apresentam duplicadas no genoma de *M. tuberculosis*, o que reflete uma grande redundância.

O genoma de *M. leprae* é composto por, aproximadamente, 2% de sequências repetitivas. Existem mais de 26 elementos de inserção extintos com quatro famílias de repetições dispersas, presentes em cinco ou mais cópias, sendo RLEP (37 cópias), REPLEP (15 cópias), LEPREP (oito cópias) e LEPRPT (cinco cópias). Embora não se conheça similaridade entre as sequências dos elementos de transposição, a repetição RLEP ocorre predominantemente na terminação 3' dos genes e, em alguns casos, dentro de pseudogenes, sugerindo assim que seja capaz de realizar transposição.

Apesar de existirem regiões conservadas entre os genomas de *M. tuberculosis* e *M. leprae*, aproximadamente 150 genes em *M. leprae* não são compartilhados com *M. tuberculosis*. Alguns desses genes poderiam estar envolvidos na patogenicidade espécie-específica do agente etiológico da hanseníase.

14. Variabilidade Genética Bacteriana

Sequências repetitivas são constituintes comuns do genoma de todos os organismos vivos, no entanto, ocorrem com maior frequência em eucariontes superiores. Existem duas formas principais de DNA repetitivo no genoma bacteriano: as sequências dispersas e as sequências em *tandem*.

As sequências repetitivas dispersas podem corresponder a genes duplicados ou a elementos genéticos móveis presentes em inúmeras cópias, como as sequências de inserção (IS do inglês, “Insertion sequences”). Estas sequências são um importante componente do genoma de bactérias e em função de sua habilidade de realizar transposição possuem

potencial mutacional baseado em sua capacidade de se localizar dentro de regiões codificantes ou reguladoras.

Uma importante sequência de inserção, restrita ao complexo *M. tuberculosis* e presente em 99% dos isolados clínicos é a IS6110. Todas as cópias desse elemento repetitivo possuem sequência idêntica. No entanto, seu número de cópias e localização no genoma variam. Através dessa variação são gerados diferentes padrões de polimorfismos que podem ser observados pelo método de RFLP (do inglês, “Restriction fragment length polymorphism”) (van Embden e col., 1993). Essa metodologia demonstra variabilidade genética entre isolados de *M. tuberculosis* e junto com as informações epidemiológicas tem fornecido valiosas informações sobre as vias de transmissão dessa doença (Kunimoto e col. 2004; Oelemann e col., 2007; Farnia e col., 2008). Em *M. leprae* existem apenas vestígios de elementos de sequências de inserção, mais de 26 fragmentos de genes de transposases com apenas quatro famílias de repetições dispersas: RLEP, REPLEP, LEPREP e LEPRPT.

Repetições em *tandem* podem ser relativamente simples, como as repetições múltiplas de sequências de dois ou três nucleotídeos, ou mais complexas, como as duplicações de segmentos cromossômicos (Lupski, 1996). Os microssatélites correspondem a uma sequência de DNA que contém unidades que se repetem em *tandem* e variam de dois a seis pares de base (pb), sendo também conhecidos como repetições em *tandem* curtas (STR do inglês, “Short tandem repeats”). Já os minissatélites possuem unidades repetitivas que variam de 10 a 100pb, sendo denominados de repetições em *tandem* de número variável (VNTR do inglês, “Variable number of tandem repeats”). Constituem-se em bons marcadores genéticos, especialmente devido à sua abundância, seu alto grau de polimorfismo e à simplicidade nos métodos de tipagem. Em micobactérias, elementos deste tipo e bem caracterizados em *M. tuberculosis* os MIRU-VNTR (do inglês, “Mycobacterial interspersed repetitive unit”) encontram-se dispersos em regiões intergênicas do genoma. Estas repetições possuem de 40 a 100 nucleotídeos e são similares às sequências de minissatélites descritas em humanos. A análise de 12 MIRUs proposta por Supply e colaboradores (2001) foi amplamente utilizada para genotipagem de isolados de *M. tuberculosis* em estudos de epidemiologia da tuberculose, para a definição de estrutura populacional de isolados de *M. tuberculosis* (Mazars e col., 2001) e para estudos filogenéticos e filogeográficos (Sun e col., 2004). Mais recentemente, um conjunto de 24 MIRUs foi definido, incluindo um subgrupo de 15 MIRUs específicos para investigações de natureza epidemiológica (Supply e col. 2006). A resolução dessa técnica é maior do que a calculada para a maioria dos outros métodos de tipagem, sendo similar apenas ao RFLP-IS6110. As sequências contendo MIRUs também foram encontradas em outras

espécies micobacterianas tais como: *M. avium*, *M. paratuberculosis* (Bull e col., 2003), *M. ulcerans* e *M. marinum* (Stragier e col., 2005).

O polimorfismo de DNA resultante das variações de sequências em *tandem* também demonstrou sucesso quando aplicado a outros microrganismos como *Bacillus anthracis* (Read e col., 2002) e *Yersinia pestis* (Klevytska e col., 2001). Em *B. anthracis* a utilização desse tipo de sequência teve início com o descobrimento de uma região denominada *vrnA* (do inglês, “Variable report region A”) (Jackson e col., 1997). A utilização de múltiplos loci com repetição em *tandem* de número variável (MLVA do inglês, “Multiple-locus VNTR analysis”) para genotipagem de isolados de *B. anthracis* teve início em 2000 quando o potencial polimórfico de oito VNTRs, frente a um painel de 400 isolados provenientes de várias partes do mundo, foi avaliado (Keim e col., 2000). Atualmente 25 VNTRs (Lista e col., 2006) têm sido utilizados para diferenciar isolados de *B. anthracis*. Desta forma, a análise através de VNTRs tornou-se o “padrão-ouro” e tem sido amplamente utilizada em estudos conduzidos em diversas partes do mundo (Gierczynski e col. 2004; Fasanella e col., 2005). Em *Yersinia pestis*, a primeira sequência polimórfica descrita era composta por um tetranucleotídeo que apresentava nove possíveis alelos com poder discriminatório de 0.82. (Adair e col., 2000). Posteriormente, um estudo identificou no genoma deste microrganismo 86 VNTRs dos quais apenas 49 tiveram seu potencial polimórfico avaliado (Le Flèche e col., 2001, Klevytska e col., 2001). Alguns anos mais tarde, 180 isolados foram analisados perante um painel de 25 VNTRs e foi possível verificar a existência de 61 genótipos únicos de *Y. pestis* (Pourcel e col., 2004), sugerindo dessa forma um alto poder discriminatório da ferramenta e uma grande variedade genética entre essa espécie de bactéria. Lowell e colaboradores (2005) combinando as informações epidemiológicas com os resultados de MLVA de amostras de *Y. pestis* isoladas de humanos e do ambiente conseguiram estabelecer o verdadeiro sítio de exposição de cada paciente. Atualmente, estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de caracterizar isolados de diferentes partes do mundo utilizando MLVA para uma maior compreensão da expansão e microevolução de *Y. pestis*. (Kingston e col., 2009; Li e col., 2009).

14.1. Variabilidade Genética em *Mycobacterium leprae*

Muitos esforços foram feitos para diferenciar isolados de *M. leprae*. Até o ano de 2000, análises por RFLP utilizando várias sondas não revelaram a existência de cepas dessa bactéria (Clark-Curtiss e col., 1985; Clark-Curtiss & Walsh, 1989; Sela e col., 1989; Williams & Gillis, 1989). A análise de sequências de DNA entre as regiões 16S e 23S do RNA ribossomal também foram idênticas quando diferentes isolados de pacientes multibacilares foram analisados (de Wit & Klatser, 1994).

Embora o genoma de *M. leprae* contenha repetições dispersas, nenhum polimorfismo foi detectado nessas regiões (Woods & Cole, 1990). Todavia através de análises por PCR a sequência repetitiva RLEP foi a única que demonstrou certo potencial para diferenciação de isolados de *M. leprae*. Foram observadas diferenças de intensidade na amplificação e ausência da sequência repetitiva RLEP no gene *pol(A)* de certos isolados de *M. leprae* analisados (Fsihi & Cole, 1995). Até o momento, o potencial dessa sequência na diferenciação dos isolados não foi amplamente estudado.

Os achados anteriores impulsionaram as pesquisas por métodos de diferenciação entre isolados de *M. leprae* utilizando repetições em *tandem* de número variável. A primeira sequência em *tandem* com potencial polimórfico foi identificada por Matsuoka e colaboradores (2000). Nesse trabalho uma repetição de seis nucleotídeos foi encontrada no gene *rpoT* e pequenas variações de seu número de cópia foram observadas entre isolados provenientes de diferentes países. Amostras oriundas do Japão, Coréia e Brasil apresentavam três cópias dessa repetição enquanto que isolados de Haiti e Okinawa (Japão) apresentaram quatro cópias. Devido ao baixo polimorfismo observado esta sequência foi vista como um possível marcador geográfico.

Ainda em 2000, um trinucleotídeo (TTC) foi identificado e variações de número de cópias dessa repetição em amostras de pacientes hansenianos das Filipinas foram observadas: num total de 34 amostras analisadas, 15 tipos de *M. leprae* foram definidos (Shin e col. 2000). Alguns anos mais tarde, essa mesma sequência de trinucleotídeos foi utilizada para diferenciar amostras de pacientes hansenianos de uma área endêmica na Indonésia. Em alguns casos, foram observados genótipos diferentes entre indivíduos de uma mesma família o que poderia sugerir fontes de infecção diferentes para cada paciente (Matsuoka e col, 2004).

Com o objetivo de ampliar o painel de VNTRs utilizados para a diferenciação de isolados de *M. leprae*, Groathouse e colaboradores (2004) investigaram o polimorfismo genético de cinco minissatélites (6-7, 12-5, 18-8, 21-3 e 27-5) e seis microssatélites (C20, AT17, TA18, GTA9, TTC21 e CG6) através da análise de quatro amostras de DNA

purificado. Do total de VNTRs avaliados nove demonstraram-se polimórficos sugerindo assim, um conjunto de possíveis marcadores para diferenciação entre os isolados.

Ainda no ano de 2004, uma colaboração estabelecida entre o nosso grupo de pesquisa e pesquisadores da Universidade do Estado da Louisiana resultou num estudo no qual o polimorfismo e a estabilidade de quatro repetições em *tandem* foram avaliados. Os resultados obtidos demonstraram que os diferentes VNTRs analisados poderiam ser efetivamente utilizados na diferenciação de isolados de *M. leprae* (Truman e col, 2004).

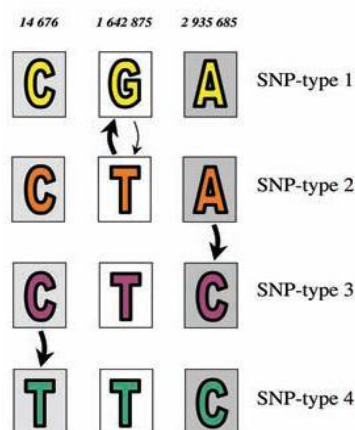
Com o advento das pesquisas utilizando VNTRs, inúmeros estudos foram elaborados com o objetivo de investigar a diversidade genética entre isolados de *M. leprae*. Na Índia, um estudo foi conduzido utilizando três microssatélites (dois trinucleotídeos e um dinucleotídeo) e um número amostral de 33 pacientes. Nesse trabalho amostras de diferentes tecidos (biópsia de pele, linfa, muco nasal e células mononucleares de sangue) de sete pacientes foram também analisadas e o mesmo genótipo foi definido nos diferentes espécimes clínicos. Todavia, quando essa comparação foi feita entre amostras de biópsia de pele e nervo, pequenas discordâncias foram observadas indicando dessa forma a presença de duas subpopulações de bactérias que teriam se expandido independentemente uma da outra. (Young e col. 2004). Resultados similares foram observados pelo mesmo autor alguns anos mais tarde e a discordância entre genótipos de *M. leprae* em diferentes espécimes clínicos de um mesmo paciente parece estar associada à infecção por mais de um isolado, que teria possivelmente predileção por determinados tecidos (Young e col., 2008).

A análise de múltiplos loci contendo VNTRs tem demonstrando, ao longo dos anos, grande potencial para diferenciação de isolados de *M. leprae*. Com o objetivo de reduzir custos e ampliar o número de VNTRs estudados, Kimura e colaboradores (2009) propuseram uma análise baseada em PCR *multiplex*. Desta forma, a amplificação de diferentes VNTRs ocorre concomitantemente; oligonucleotídeos marcados com fluorescência são utilizados para que o número de cópias de cada repetição seja determinado através da análise do comprimento dos fragmentos gerados (do inglês FLA, “Fragment length analysis”). Este método é similar ao proposto para genotipagem de isolados de *M. tuberculosis* (Supply e col., 2006).

Desde 2009, trabalhos envolvendo a genotipagem de isolados de *M. leprae* utilizando PCR *multiplex* e FLA têm sido desenvolvidos em países como: Filipinas (Sakamuri e col., 2009), China (Xing e col., 2009; Weng e col., 2010), Colômbia (Cardona-Castro e col., 2009) e Brasil (Fontes e col., 2009). Desta forma, a variabilidade genética desse patógeno dentro das diferentes populações tem sido amplamente estudada.

Outra forma de variação genética observada no genoma de *M. leprae* são os polimorfismos de base única (SNP do inglês, “Single-nucleotide polymorphism”). Um estudo conduzido por Monot e colaboradores (2005) determinou a existência de quatro genótipos de *M. leprae* baseados em três possíveis SNPs (figura 1.4).

Figura 1.4. Genótipos de *M. leprae* definidos por SNPs (Monot e col., 2005).

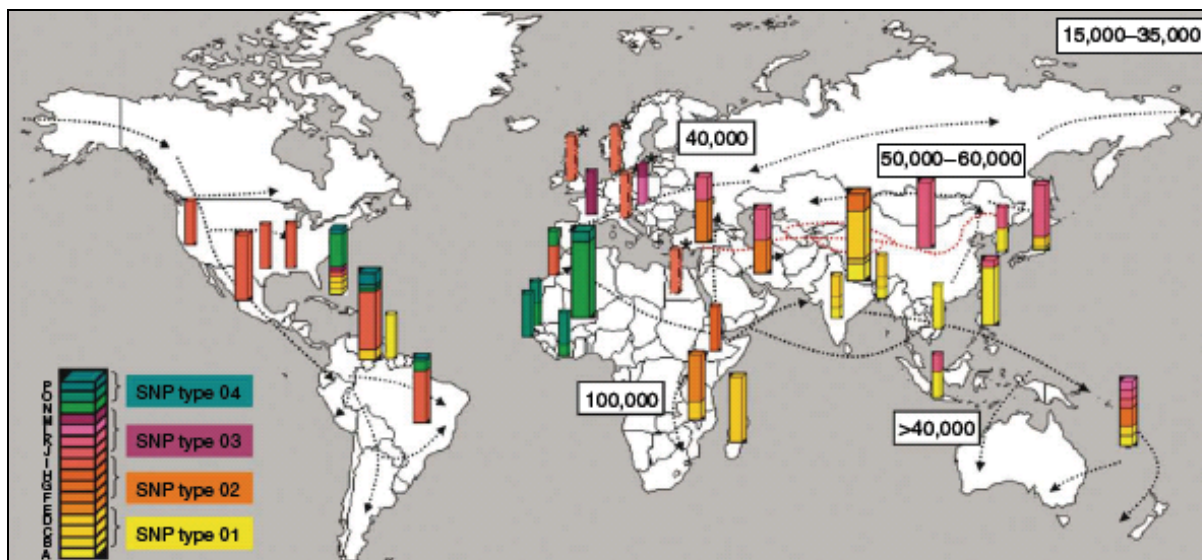


Genótipo 1 é definido quando o nucleotídeo G estiver presente na posição 16422875pb; genótipo 2 é definido quando há a presença do nucleotídeo T; genótipo 3 é definido quando há uma mutação na posição 2935685pb no genoma de *M. leprae* que resulta na substituição do nucleotídeo A por C; genótipo 4 é definido quando há uma mutação na posição 14676pb que resulta na substituição do nucleotídeo C por T. (Adaptado de Monot e col., 2005)

Os resultados obtidos demonstram um padrão muito semelhante de agrupamento filogenético. Além de detectar diferenças entre os isolados, esse estudo foi capaz de fornecer evidências para a formulação de hipóteses a respeito da rota disseminação da hanseníase. Entretanto, algumas partes do mundo não foram representadas, sobretudo o Oriente Médio e a Europa. É sabido que estas regiões tiveram importância histórica no processo de migração humana.

Recentemente, outro estudo analisou amostras do Iran, Turquia, China, Coréia e Japão em busca de novos SNPs para uma maior compreensão dos mecanismos de disseminação da hanseníase entre pessoas e países (Monot e col., 2009). Um total de 400 amostras de 28 regiões foi analisado e 16 tipos de *M. leprae* definidos. Na verdade, os quatro genótipos anteriormente descritos (Monot e col., 2005) foram subdivididos nos demais subtipos. A distribuição global desses novos SNPs demonstrou uma estreita relação entre o genótipo de *M. leprae*, o país de origem e o padrão de migração humana. Os resultados confirmam a hipótese anterior de que a hanseníase teria se originado no leste da África, tendo se disseminado para Ásia, Meio Oeste, Europa e posteriormente para países da África central através do comércio de escravos (figura 1.5).

Figura 1.5. Disseminação da hanseníase pelo mundo (Monot e col., 2009)



As barras estão localizadas no país de origem de cada amostra analisada. As cores representam os quatro principais genótipos definidos e seus subtipos. A espessura das barras corresponde ao número de amostras analisadas (barras finas: 1-5 amostras; barras medianas: 6-29 amostras; barras mais amplas: mais de 30 amostras.) As setas cinzas indicam as rotas humanas, com estimativa do tempo de migração em anos. Os pontos vermelhos indicam a localização da rota da seda.

A rota da seda que ligava Europa a China também parece ter contribuído para a disseminação da hanseníase no mundo. Nas Américas parece mais provável que a doença tenha sido trazida por imigrantes europeus e não via estreito de Bering. Esta interpretação é consistente com os achados paleontológicos que identificaram sinais da doença apenas em esqueletos do período pós-colonial (Ortner, 2003).

A análise filogeográfica de bactérias é uma ferramenta poderosa porque possibilita a compreensão da disseminação do patógeno e as movimentações do hospedeiro. Associações entre genótipos de cepas de *H. pylori* e seus locais de origem, bem como os processos de migração e etnia de seus hospedeiros têm sido estabelecidas (Falush e col., 2003; Wirth e col., 2004; Linz e col., 2007). Estudos com pacientes com tuberculose sugerem que determinadas linhagens desse patógeno se adaptaram a populações específicas (Gagneux e col., 2006).

Os resultados observados nos diferentes estudos sugerem que a variabilidade genética observada em *M. leprae*, através da utilização de VNTRs e/ou SNPs são ferramentas importantes e fazem parte de um novo campo de pesquisas que tem como objetivo elucidar importantes aspectos sobre a transmissão e disseminação desta doença pelo mundo.

Objetivo Geral

Avaliar a variabilidade genética entre isolados de *Mycobacterium leprae* de pacientes hansenianos do Brasil.

Objetivos Específicos

- Utilizar VNTRs e SNPs para a análise da variabilidade genética;
- Implantar a técnica de MLVA (*Multiple-locus VNTR analysis*) para caracterização simultânea dos diferentes VNTRs;
- Identificar os marcadores genéticos mais apropriados para diferenciação;
- Analisar o polimorfismo genético de isolados de *M. leprae* de pacientes residentes em diferentes estados do Brasil como: Rio de Janeiro, São Paulo, Rondônia, Ceará e Pernambuco;
- Avaliar a possibilidade de extrair DNA de *M. leprae* oriundo de esfregaços dérmicos fixados em lâminas de baciloscopia;
- Verificar se há relação entre o genótipo e características demográficas, epidemiológicas ou clínicas dos pacientes;
- Diferenciar, como base no genótipo do patógeno, re-infecção de reativação em pacientes com recidiva de hanseníase.

Local de estudo

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada a Micobactérias do Instituto Oswaldo Cruz da Fundação Oswaldo Cruz, com um período de treinamento sobre a técnica de análises de fragmentos para genotipagem de *M. leprae* realizado entre os meses de julho e agosto de 2007 no Departamento de Microbiologia, Imunologia e Patologia da Universidade do Estado do Colorado –Fort Collins, CO –EUA.

Amostras clínicas e pacientes

Foram analisadas por genotipagem, amostras clínicas (biópsias de pele e esfregaços dérmicos provenientes de lâminas de baciloscopia) de pacientes hansenianos de diferentes estados brasileiros (tabela 3.1.).

Tabela 3.1. Tipo de material analisado, estado de origem e forma clínica dos pacientes.

Estado	Material	LL	B	BB	BL	BT	TT	S/inf	Total
RO	BP	07	09	-	01	-	-	01	18
	ZN	27	31	-	-	-	01	03	62
CE	BP	52	66	-	11	01	03	02	135
PE	BP	02	-	-	-	-	-	-	02
	ZN	21	18	-	-	-	-	-	39
RJ	BP	44	-	-	18	-	-	03	65
	ZN	10	-	-	03	-	-	01	14
SP	BP	25	-	02	04	01	-	09	41
AM	BP	-	-	-	-	-	-	02	02
MG	BP	-	-	-	-	-	-	02	02
MT	BP	-	-	-	-	-	-	01	01
RS	BP	-	-	-	-	-	-	01	01
PA	BP	-	-	-	-	-	-	01	01
Total		188	124	02	37	02	04	26	383

RO: Rondônia; CE: Ceará; PE: Pernambuco; RJ: Rio de Janeiro; SP: São Paulo; AM: Amazonas; MG: Minas Gerais; MT: Mato Grosso; RS: Rio Grande do Sul; PA: Pará; BP: biópsias de pele; ZN: esfregaços dérmicos oriundos de lâminas de baciloscopia; LL: hanseníase lepromatosa; B: hanseníase boderline (estes indivíduos não foram classificados dentro do espectro); BB: hanseníase boderline boderline; BL: hanseníase boderline lepromatosa; BT: hanseníase boderline tuberculóide; TT: hanseníase tuberculóide; S/inf: amostras sem informação acerca da forma clínica do paciente.

Extração de DNA

• Biópsias de pele

As biópsias de pele foram processadas utilizando um *kit* comercial para extração de DNA genômico *Dneasy Tissue Kit* (QIAGEN), seguindo as recomendações do fabricante.

• Esfregaços dérmicos provenientes de lâminas de baciloscopia

Protocolo A (van der Zanden e col., 1998)

Os esfregaços dérmicos foram removidos das lâminas de baciloscopia pela adição de 25uL de água destilada em cada sítio onde o material foi fixado. O total em uL de suspensão obtido foi transferido para um tubo de microcentrífuga no qual foi adicionado mesmo volume da resina Chelex 100 (suspensão aquosa de 15%) (Sigma). A suspensão final foi incubada a 100°C por 30 minutos e centrifugada a 14.462 xg por 5 minutos. O sobrenadante foi então transferido para outro tubo de microcentrífuga e o material foi congelado até ser submetido à PCR.

Protocolo B (Kamble e col., 2010)

Na superfície da lâmina foram adicionados 150uL de tampão de lise (1 mg/mL de PK e 0,05% de tween 20) para remoção do material fixado. A suspensão contendo material oriundo dos diferentes sítios foi transferida para um tubo de microcentrífuga e incubada a 60°C durante a noite. Posteriormente, foram adicionados 30uL de SDS (10%) e o material foi submetido à incubação de 60°C por 1 hora. Em seguida, o material foi submetido à temperatura de 94°C por 15 minutos e centrifugado por 10 minutos a 7378 xg. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de microcentrífuga e precipitado com etanol a - 20°C durante a noite . Após a precipitação o material foi centrifugado a 7378 xg por 15 minutos. O sobrenadante foi então descartado e o *pellet* lavado com etanol. Após a lavagem, o material foi seco à temperatura ambiente, ressuspenso em 30 uL de TE e dissolvido através de uma incubação a 37° C por 1 hora . O material foi congelado até ser submetido à PCR.

MLVA (Multiple-locus VNTR Analysis):

Repetições em *tandem* de número variável, presentes em pseudogenes ou segmentos intergênicos do genoma de *M. leprae*, foram separadas em 4 grupos para análise por PCR *multiplex* utilizando iniciadores marcados com fluorescência (Kimura e col., 2009) (tabela 3.2). Todos os VNTRs selecionados encontravam-se em pseudogenes ou segmentos intergênicos do genoma de *M. leprae*.

Tabela 3.2. Repetições selecionadas para o estudo, iniciadores utilizados e tamanho dos fragmentos esperados após amplificação.

PCR	Repetição	Iniciadores Senso	Iniciadores Anti-senso	TF
C01	AC8b	VIC-gcccacttacctcaaccaac	cctataacggcactcagtcca	390
	GTA9	NED-agccttagtcgcgcatag	tccgctgtccgtccgctga	307
	GGT5	6FAM-gcagcgggtaacagcatagc	tgtctgccttgcgaaacggtc	242
	AT17	PET-tctccaacatgctgcgaca	gtacagcggcctgatcgaa	181
C02	21-3	6FAM-gaatctgaccttcggaatg	cgatgcagcttctctacgg	312
	AC9	NED-agcgcccgttgcgataga	gactggatgtcggcacccc	236
	AT15	PET-caatatgcgggttgccgtctg	ccgtctggctcgatggctggattc	168
	AC8a	VIC-gtgttacgcggaaccaggca	ccatctgttggtactactga	124
C03	27-5	6FAM-attgagcagatggccggtc	agcagtcggcacgccctt	327
	6-7	VIC-gccatcgttgcggttcatc	cggaggaggtgggtacgg	268
	TA18	NED-cgtgcgtcgtgttaggc	gacgtggcaacatcgaagt	230
	GAA21	PET-ctacagggggcacttagctc	ggacctaaaccatcccgtttt	201
C04	18-8	PET-gcccgtctatccgatcaa	gcaaagatcagcagccaat	348
	12-5	VIC-ctggccacttgcggtacgac	ggagaaggaggccgaataca	289
	23-3	6FAM-ccgaagccctggacgaag	gccgtaaaccgctccc	326
	TA10	PET-tagattcaaacgacatgca	tgataatcacgtgttccgc	185

PCR: amplificação por PCR multiplex; C01: combinação 01; C02: combinação 02; C03: combinação 03; C04: combinação 04; TF: tamanho do fragmento esperado após amplificação.

Condições de amplificação: PCR Multiplex

DNA de *M. leprae* (2-5 uL) foi amplificado por PCR em 25 uL de reação contendo 12,5 uL *Qiagen Multiplex PCR Kit* (QIAGEN) e 0,2 uM de cada iniciador. O *kit* da QIAGEN continha 2.5 U (unidades) de DNA polimerase *HotStarTaq*, 200uM de cada desoxirribonucleosídeo trifosfato (dNTPs) e tampão. A PCR foi realizada em um termociclador (Veriti 96 Well Thermal Cycler, Applied Biosystems) nas seguintes condições de temperatura: uma fase inicial a 95°C por 15 minutos, seguida por 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 90 segundos e 72°C por 90 segundos, com uma fase de extensão final de 72°C por 10 minutos.

Eletroforese em gel de agarose

Os produtos amplificados (10 uL) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% a 80V em TBE 0,5X (Tris-borato e EDTA pH 8,0). Após a corrida, o DNA foi corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz ultravioleta em um transluminador.

Análise de fragmentos

O resultado da amplificação foi diluído e 1 uL deste material foi combinado a 8.7uL de formamida Hi-Di™ (Applied Biosystems) e 0,3 uL do padrão de DNA LIZ-500 (Applied Biosystems). Posteriormente, o material foi desnaturado por 3 minutos a 94°C e submetido à eletroforese de capilar no sequenciador automático ABI 3130 (Applied Biosystems). O número de cópias de cada repetição foi determinado através da análise do comprimento dos fragmentos gerados utilizando o software *Peak Scanner* versão 1.0 (Applied Biosystems)

Condições de amplificação: PCR utilizando apenas um par de iniciadores não marcados com fluorescência

DNA de *M. leprae* (2-5 uL) foi amplificado por PCR em 50 uL de reação contendo 25 uL de *HotStarTaq Master Mix* (QIAGEN) e 0,5 uM de cada iniciador. O mix continha 2,5 unidades de DNA polimerase *HotStarTaq*, 200 uM de cada dNTP e tampão. A PCR foi

realizada em um termociclador (Veriti 96 Well Thermal Cycler, Applied Biosystems) nas seguintes condições de temperatura: uma fase inicial a 95°C por 15 minutos, seguida por 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e uma extensão final de 10 minutos a 72°C.

Purificação dos produtos de PCR para sequenciamento

As amostras positivas após PCR foram purificadas utilizando as colunas de sílica do *QIAquick PCR Purification kit* (QIAGEN), de acordo com as recomendações do fabricante. O material purificado foi posteriormente analisado em agarose 2% para estimativa da quantidade a ser aplicada na reação de sequenciamento.

Reação de sequenciamento

Os produtos amplificados foram diluídos para uma concentração em torno de 1-10 ng, a este material foram adicionados os iniciadores no sentido 5'-3' ou 3'-5' numa concentração de 3,2 pmol de cada e 0,5 uL do *Big Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing kit* que contem nucleotídeos livres (dNTPs), nucleotídeos marcados com fluorescência (ddNTPs), cloreto de magnésio (MgCl₂), tampão e a enzima Taq Polimerase. A reação de sequenciamento foi realizada em um termociclador (Veriti 96 Well Thermal Cycler, Applied Biosystems) nas seguintes condições de temperatura: 30 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos.

Precipitação da reação de sequenciamento

Ao produto da reação de sequenciamento foram aplicados 30 uL de isopropanol 75%, que foram incubados por 15 minutos à temperatura ambiente e centrifugados a 1180 xg por 45 minutos a 20°C. Após a centrifugação, a placa foi invertida em papel toalha para eliminação do líquido. Ao pellet foram adicionados 50 uL de etanol 75% e uma centrifugação a 1180 xg por 15 minutos a 20°C foi realizada. Novamente a placa foi invertida em papel toalha para a remoção de todo o líquido. O *pellet* foi seco em um termociclador por 10 minutos a temperatura de 60°C. Posteriormente, o material foi ressuspensão em 10 uL de formamida Hi-

Di™ (Applied Biosystems), aquecido a 95°C por 3 minutos e imediatamente colocado em gelo.

Sequenciamento de DNA

As amostras amplificadas foram sequenciadas utilizando o sequenciador automático ABI 3730 (Applied Biosystems) que faz parte do Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde (PDTIS) da Fiocruz.

Análise dos eletroferogramas de sequenciamento

A variação do número de cópias de cada VNTR foi analisada identificando as sequências flaqueadoras das sequências repetitivas através do programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA) versão 4.0.

Análise dos Resultados: genotipagem por sequenciamento e análise de fragmentos

O número de cópias encontrado em cada locus foi introduzido no programa de computador Bionumerics (Applied Maths, Gent, Bélgica) em formato de tabela através de um protocolo chamado *Open Database Connectivity* (OBDC). Posteriormente, foram criadas matrizes de similaridade, dendrogramas e árvores filogenéticas utilizando o índice de similaridade calculado pelo coeficiente categórico e os algoritmos *Unweighted Pair group Arithmetic averages* (UPGMA), *Neighbor-Joining* (N-J) e *Minimum Spanning Tree* (MST).

Análise de polimorfismos de base única (SNP do inglês, “Single Nucleotide Polymorphism”)

Para a amplificação dos SNPs nas posições de 14.676, 1.642.875 e 2.935.685 do genoma de *M. leprae* (Cole e col. 2005) foram utilizados três pares de iniciadores descritos por Sakamuri e colaboradores (2009) (tabela 3.3.).

Tabela 3.3. Iniciadores utilizados para genotipagem dos polimorfismos de base única.

Posição dos polimorfismos de base única	Sequência dos iniciadores
14.676	(senso) 5'aat gga atg ctg gtg aga gc 3'
	(anti-senso) 5' caa tgc atg cta gcc tta atg a 3'
1.642.875	(senso) 5' tgc tag ttt aac cga gta ctg cta 3'
	(anti-senso) 5' gta gta gtc ttc caa gtt gtg gtg 3'
2.935.685	(senso) 5'atc tgg tcc ggg tag gaa tc 3'
	(anti-senso) 5' acc ggt gag cgc act aag 3'

Amplificação por PCR dos polimorfismos de base única

DNA de *M. leprae* (2-5 uL) foi amplificado por PCR em 50 ul de reação contendo 10 mM Tris-HCL (pH 8,3), 50 mM de cloreto de potássio (KCl), 200 uM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 2,5 unidades de Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Life Technologies) e 0,2 uM de cada iniciador. A PCR foi realizada em um termociclador (Veriti 96 Well Thermal Cycler, Applied Biosystems) e as condições de ciclagem foram as seguintes: desnaturação de 94°C por 3 minutos, prosseguida de 45 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos e uma extensão final de 72°C por 10 minutos.

Digestão Enzimática

Após a primeira PCR para amplificação da região contendo polimorfismo na posição 2.935.685 do genoma de *M. leprae*, as amostras positivas foram digeridas com 5 U (unidades) da enzima de restrição *Bst*U1 por 1 hora a 60°C. O material resultante da amplificação da

região contendo polimorfismo na posição 14.676 do genoma de *M. leprae* foi digerido com 5 U da enzima de restrição *SmlI* por 1 hora a 55°C.

Eletroforese

O produto da PCR bem como o resultado da digestão utilizando enzimas de restrição foram analisados por eletroforese em gel de agarose 3%.

Sequenciamento da região contendo polimorfismo na posição 1.642.875 do genoma de *Mycobacterium leprae* e análise dos resultados

O produto amplificado para detecção de polimorfismo na posição 1.642.875 foi purificado utilizando o *QIAquick PCR Purification kit* (QIAGEN) de acordo com as recomendações do fabricante. Posteriormente, o material foi submetido à reação de sequenciamento, precipitado e sequenciado através do sequenciador automático ABI 3730 (Applied Biosystems). A mudança de nucleotídeos foi analisada através do programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA) versão 4.0.

Genetic diversity of *Mycobacterium leprae* isolates from Brazilian leprosy patients.

A diferenciação de isolados de *M. leprae* é um grande desafio para biólogos moleculares de todo o mundo. Atualmente, marcadores baseados em repetições em *tandem* denominados de VNTRs bem como polimorfismos de base única (SNPs) têm sido utilizados com o objetivo de compreender a variabilidade genética desse microrganismo, aspectos ligados à transmissão e disseminação da hanseníase pelo mundo.

A primeira etapa do meu doutoramento consistiu na análise da variabilidade genética de 16 VNTRs e 3 SNPs mediante um painel de 89 amostras brasileiras provenientes, majoritariamente, dos estados do Rio de Janeiro e São Paulo. Parte deste estudo foi conduzido na Universidade do Estado do Colorado, em parceria com pesquisadores que desenvolveram a técnica de MLVA (*Multiple-locus variable analysis*) e FLA (*Fragment length analysis*) para diferenciação de isolados de *M. leprae*.

A metodologia empregada e os resultados obtidos estão descritos no artigo que segue e que foi publicado no periódico “**Leprosy Review**” em setembro de 2009.

Genetic diversity of *Mycobacterium leprae* isolates from Brazilian leprosy patients

AMANDA NOGUEIRA BRUM FONTES*,
RAMA MURTHY SAKAMURI**,
IDA MARIA FOSCHIANI DIAS BAPTISTA***,
SOMEI URA***, MILTON OZÓRIO MORAES****,
ALEJANDRA NÓBREGA MARTÍNEZ****,
EUZENIR NUNES SARNO****,
PATRICK J. BRENNAN**,
VARALAKSHMI D. VISSA** & PHILIP NOEL SUFFYS*
*Laboratório de Biologia Molecular Aplicada a Micobactérias,
Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil
**Department of Microbiology, Immunology and Pathology,
Colorado State University, Fort Collins, Colorado, USA
***Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, São Paulo, Brazil
****Laboratório de Hanseníase, Instituto Oswaldo Cruz, Brazil

Accepted for publication 10 September 2009

Summary

Introduction Leprosy is a chronic disease caused by infection with *Mycobacterium leprae*, an obligate intracellular parasite. A problem in studying the transmission of leprosy is the small amount of variation in bacterial genomic DNA. The discovery of variable number of tandem repeats (VNTRs) allowed the detection of strain variation in areas with a high prevalence of leprosy. Four genotypes of *M. leprae* based on three single-nucleotide polymorphism (SNPs) were also discovered to be useful for analysis of the global spread of leprosy.

Methods In this present study, we examined the allelic diversity of *M. leprae* at 16 select VNTR and three SNP loci using 89 clinical isolates obtained from patients mainly from the neighbouring states of São Paulo and Rio de Janeiro Brazil.

Results and conclusion By use of a PCR-RFLP-based procedure that allows the recognition of SNP types 3 and 4 without the need for the more expensive DNA sequencing steps, characterisation of the main *M. leprae* genotypes was easy. When applied on the study population, it was found that the SNP type 3 is most frequent in these two states of Brazil, and that VNTRs provided further discrimination of the isolates. Two Short Tandem Repeats (STRs) were monomorphic, with the remaining 14 STRs represented by two to 18 alleles. Epidemiological associations with,

township or state were not evident in this random collection and require further investigations. In phylogenetic trees, branches formed by all 16 STRs clearly separated SNP type 3 organisms from the other types while the allelic patterns of two minisatellite loci 27-5 and 12-5 were highly correlated with SNP type 3. This strain typing study provide the basis for comparison of *M. leprae* strain types within Brazil and with those from other countries, and informed selection of genomic markers and methods for future studies.

Introduction

Leprosy is a slow, chronic infection caused by *Mycobacterium leprae* and still a major health problem in developing countries; notably Brazil. Genotyping of causative agents of infectious diseases is a powerful tool for epidemiological analysis of transmission. Successive genetic studies performed since 2000 revealed polymorphic regions in the genome of *M. leprae*¹ which might be useful for genotyping. Variable numbers of tandem repeats (VNTR), such as runs of di- or trinucleotides, have been examined as potential typing markers and found to vary in copy number between strains of *M. leprae*.²⁻¹⁰ Another elegant study investigated single nucleotide polymorphisms (SNPs) and found that following the reductive evolution and genome decay events undergone by the leprosy bacillus, the genomes of extant isolates are highly conserved and SNPs are rare.^{1,11} Three SNPs were found to be informative and have been used to understand the evolution and global spread of *M. leprae*.¹¹ Here we present findings of a study comparing the performance of three SNPs and multiple-locus VNTR analysis (MLVA). Biopsy samples from Brazilian leprosy patients were analysed in order to begin to understand the ecology of *M. leprae* in this region.

Material and Methods

PATIENTS AND CLINICAL SAMPLES

This study was performed on skin biopsies derived from 89 leprosy patients who had been submitted to standardised diagnostic procedures based on presence of skin lesions, nerve damage and microscopy-based detection of acid-fast bacilli. Among these, 70 cases (79%) had conclusive data on the clinical form of the disease and included 53 cases of lepromatous leprosy (LL), 14 patients with borderline lepromatous leprosy (BL), two individuals with borderline-borderline leprosy (BB) and a single case of the borderline tuberculoid disease form. Most patients were residents of two regions of Brazil, Rio de Janeiro ($n = 41$) and São Paulo ($n = 41$); few cases were from other states such as Amazonas ($n = 2$), Minas Gerais ($n = 2$), Mato Grosso ($n = 1$), Rio Grande do Sul ($n = 1$) and Pará ($n = 1$) (Figure 1). Skin biopsies were collected according to standard diagnostic procedures and only after informed consent.

DNA EXTRACTION

Two protocols were used for DNA extraction: biopsies from 21 patients (all from Rio de Janeiro) were processed by subjecting them to three freeze/thaw cycles ($-70^{\circ}\text{C}/95^{\circ}\text{C}$), incubation with proteinase K at 60°C for 18 h, phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24;1)



Figure 1. State map of Brazil showing the residential origin of the patients included in this study. The states represented in this study are shown in grey and the number of patients is indicated.

extraction and precipitation with isopropanol.⁵ The other samples were treated with the DNeasy Blood & Tissue Kit, (Qiagen Inc. Valencia, CA), following the manufacturers recommendations.

MLVA ANALYSIS OF VNTRS

The 16 STR loci were separated into four groups for multiplex PCR using fluorescent labeled 5' forward primers (Kimura *et al.*;¹² Sakamuri *et al.*; in this series¹³). The amplicons were denatured and submitted to capillary electrophoresis (ABI 3730 Genetic Analyzer, Applied Biosystems), and copy numbers were determined by analysis of the fragment lengths using internal sizing standards with the GeneMapper software v 3.7 (Applied Biosystems).

DIRECT SEQUENCING OF THE VNTRS

When MLVA did not yield satisfactory data to determine the VNTR copy number, single PCR reactions were performed using the HotStartTaq Master Mix (Qiagen Inc.), 0.5 µM of

each primer pair and 2 μ l of *M. leprae* DNA extract. After denaturing the DNA at 94 °C for 15 min, PCR was carried out in a thermocycler (Veriti 96 Well Thermal Cycler, Applied Biosystems), by submitting samples to 35 cycles consisting of 94 °C for 30 s, 60 °C for 30 s and 72 °C for 30 s, with a final extension at 72 °C for 10 min. A 5 μ l sample of each reaction mixture was run on a 3% agarose gel and PCR products submitted to direct sequencing after purification on Qiaquick Spin Columns (Qiagen Inc.), on an ABI Prism 3730 automated DNA sequencer using the ABI PRISM BigDye Terminator v 3.0 sequencing kit (Applied Biosystems). Both DNA strands were analysed using forward and reverse primers and using the *MEGA* software (Version 4.0).¹⁴

SNP GENOTYPE ANALYSIS

For differentiation of SNP types 1/2 from 3/4 and characterisation of type 3 and 4, we used a PCR-RFLP-based procedure as described by Sakamuri *et al.*¹⁵ Briefly, differentiation between types 1/2 from 3/4 was obtained by restriction analysis of the locus at nucleotide 2,935,685, by incubating 5 μ l of PCR product (generated with primers ATC TGG TCC GGG TAG GAA TC and ACC GGT GAG CGC ACT AAG) with 5 units of *Bst*UI (New England Biolabs, Beverly, MA) at 60 °C for 1 hour. Upon analysis on 3% agarose gel, digestion indicates genotype 3 or 4 while lack of digestion means the presence of genotype 1 or 2. For further differentiation of genotypes 3 and 4, restriction analysis of the PCR product including the locus at nucleotide 14 676 (generated with AAT GGA ATG CTG GTG AGA GC and CAA TGC ATG CTA GCC TTA ATG A) was performed incubating with 5 Units of *Sml*I for 1 hour at 50 °C; digestion indicates SNP type 4 while lack of digestion is typical for type 3. In addition, for differentiation of types 1 and 2, sequencing of the SNP at position 1,642,875 was performed as described by Monot *et al.*¹¹ Evaluation of association of SNP type with frequency in patients from Rio de Janeiro or São Paulo was assessed by the Chi Square independence test using Epi Info software (CDC, Version 3.5.1).

PHYLOGENETIC ANALYSIS

For phylogenetic analysis, we selected 72 of the 89 samples, excluding the 17 that lacked allele definition of one or more VNTR locus (Table 1).

The data were analysed with Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA), maximum parsimony (MP) and Neighbor Joining (NJ) algorithms in PAUP4.0b software (<http://paup.csit.fsu.edu/>) and for a minimum spanning tree (MST) in Bionumerics (Version 4.1, Applied Maths, Belgium, <http://www.applied-maths.com/bionumerics/bionumerics.htm>).

Results

FREQUENCY OF THE *M. LEPRAE* GENOTYPES AS DEFINED BY SNP ANALYSIS

We were able to get conclusive results regarding SNP types in 79 (89%) of the samples while samples from eight patients (four from Rio de Janeiro and São Paulo) either could not be characterised, due either to lack of PCR amplification products or of clinical material (Table 1). Another two samples from RJ could be determined only as being either of type 1 or 2 because there was no more residual template. The SNP type 3 was predominant in the

Table 1. VNTR genotypes of *M. leprae* from RJ, SP and other states (AM, MG, MT, RS, PA)

ID	Form	(AC)8b	(GTA)9	(GGT)5	(AT)17	21-3	(AC)9	(AT)15	(AC)8a	27-5	6-7	(TA)18	(GAA)21	(TA)10	23-3	12-5	18-8	SNP
VNTR genotypes of <i>M. leprae</i> from Rio de Janeiro																		
21633 ¹	LL	7	11	4	14	2	8	16	8	5	6	19	13	6	2	4	8	1
21850 ¹	LL	7	11	4	14	2	8	15	8	5	6	18	13	6	2	4	8	1
21920 ¹	LL	7	11	4	14	2	8	15	8	5	6	19	13	6	2	4	8	1 or 2 R
19936	BL	7	11	4	12	2	8	13	9	5	6	13	17	4	2	4	8	1
20255	LL	7	10	4	9	2	8	21	9	5	6	10	19	5	2	4	8	1
21392	LL	7	12	4	15	2	8	14	8	5	6	20	13	6	2	4	8	1
22636	LL	7	12	4	14	2	8	16	7	5	6	18	13	6	2	4	8	1
20825	BL	1	10	4	11	2	8	16	9	5	6	12	19	5	2	3	8	1 or 2 R
20822	BL	7	9	4	12	2	8	17	7	5	5	32	10	7	2	4	5	4
20180	LL	7	15	4	14	2	8	14	9	5	6	17	12	10	2	4	6	4
23353	LL	7	11	4	13	2	7	17	8	5	5	12	9	8	2	4	6	4
MLT/RJ	NA	7	9	4	12	2	8	19	9	5	6	17	12	5	2	4	8	4
21706	BL	7	15	4	14	2	7	13	8	4	6	28 or 18	12	7	2	4	8	4
23825	LL	8	15	4	15	2	8	10	8	4	6	21	16	8	2	3	8	3
21548 ²	LL	7	10	4	11	2	8	10	8	4	7	NA	11	8	2	4	8	3
21866 ²	BL	7	10	4	11	2	8	10	8	4	7	NA	11	12	2	4	8	3
21263	LL	7	10	4	11	2	8	10	8	4	7	18	11	9	2	4	9	3
22368	LL	7	9	4	14	2	8	10	8	4	7	14	15	11	2	4	8	3
21898	LL	7	11	4	11	2	9	18	9	4	6	15	11	6	2	5	8	3
21844	BL	7	12	4	15	2	8	14	9	4	6	14	10	9	2	5	8	3
21372 ³	BL	7	12	4	15	2	8	19	9	4	5	14	10	9	2	5	8	3
21230 ³	BL	7	12	4	15	2	8	20	9	4	5	14	10	9	2	5	8	3
19856	BL	7	8	4	16	2	8	19	9	4	5	16	12	7	2	5	8	3
19914	LL	7	10	4	14	2	8	23	10	4	6	18	13	6	2	5	8	3
20008	LL	7	9	4	12	2	8	20	9	4	6	20	12	8	2	5	6	3
20241	LL	7	10	3	10	2	8	18	10	4	8	14	11	8	2	5	9	3
20368	LL	7	10	4	13	2	8	19	9	4	6	15	10	7	2	5	8	3
21190	LL	7	10	4	11	2	8	25	9	4	6	20	12	10	2	5	8	3
21644	LL	7	10	4	11	2	8	15	9	4	5	15	13	9	2	5	6	3
21726	LL	7	11	4	14	2	8	28	9	4	6	23	10	7	2	5	8	3
22494	LL	7	8	4	13	2	8	20	9	4	7	14	11	6	2	5	8	3
22670	LL	7	11	3	11	2	8	17	10	4	7	14	14	8	2	5	9	3
22830	LL	7	9	4	13	2	8	24	9	4	6	18	11	7	2	5	8	3

Table 1. continued

ID	Form	(AC)8b	(GTA)9	(GGT)5	(AT)17	21-3	(AC)9	(AT)15	(AC)8a	27-5	6-7	(TA)18	(GAA)21	(TA)10	23-3	12-5	18-8	SNP	
23186	LL	7	9	4	12	2	8	14	9	4	7	15	11	7	2	5	8	3	
23321	LL	7	9	4	12	2	8	18	10	4	7	23	10	9	2	5	8	3	
23806	LL	7	9	4	11	2	8	15	10	4	6	17	11	6	2	5	9	3	
19930 ⁴	BL	7	9	4	10	2	8	16	10	4	6	21	11	7	2	5	9	3	
<i>Genido (001)</i>	NA	I	I	I	I	2	7	14	8	4	6	NA	10	8	2	5	6	I	
<i>Inaldi (002)</i>	NA	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	10	2	5	8	I	
20476	LL	7	9	4	9	2	8	15	11	4	6	21	11	9	2	5	8	I	
21847	LL	7	11	4	11	2	9	17	9	4	6	15	11	6	2	5	8	NS	
VNTR genotypes of <i>M. leprae</i> from Sao Paulo																			
AH/SP ⁴	LL	7	9	4	10	2	8	14	9	4	6	21	11	7	2	5	9	3	
557/SP	LL	7	9	4	10	2	8	18	9	4	6	15	11	10	2	5	9	3	
LS/SP ⁵	BT	7	10	4	10	2	8	15	9	4	6	NA	11	6	2	5	8	3	
ZR/SP ⁵	BB	7	10	4	10	2	8	15	8	4	6	15 or 23	11	6	2	5	8	3	
501/SP	LL	7	10	4	10	2	8	15	8	4	6	22 or 23	11	9	2	5	6*	3	
540/SP	LL	7	7	4	10	2	8	13	8	4	6	16	13	9	2	5	7*	3	
548/SP	LL	7	12	4	12	2	8	11	8	4	6	14	15	10	2	5	6*	3	
RM/SP	BB	7	12	4	12	2	8	17	9	4	6	15	11	7	2	5	8	3	
379/SP	LL	7	10	4	14	2	8	16	9	4	6	18	10	9	2	5	8	3	
476/SP	LL	7	10	4	14	2	8	24	9	4	6	NA	10	7	2	5	8	3	
478/SP	LL	7	10	4	12	2	8	19	9	4	6	16	9	8	2	5	8	3	
484/SP	LL	7	10	4	14	2	8	19	9	4	6	20	12	12	2	5	8	3	
510/SP	LL	7	9	4	15	2	8	21	9	4	6	14	10	8	2	5	8	3	
512/SP ⁶	LL	7	9	4	14	2	8	26	9	4	6	14	10	11	2	5	8	3	
567/SP ⁶	NA	7	9	4	14	2	8	15	9	4	6	14	10	11	2	5	8	3	
518/SP	NA	7	12	4	11	2	9	22	9	3	7	15	14	11	2	5	6*	3	
535/SP	LL	7	10	4	14	2	8	14	9	4	6	20	12	10	2	5	3*	3	
537/SP	LL	7	13	4	14	2	8	16	9	4	6	14	10	10	2	5	8	3	
539/SP	LL	7	9	4	12	2	8	12	9	4	6	16	11	10	2	5	8	3	
551/SP	LL	7	10	4	11	2	9	21	9	4	6	17	10	7	2	5	7	3	
555/SP	LL	7	9	4	10	2	8	21	9	4	6	21	14	7	2	5	9	3	
556/SP	LL	7	9	4	13	2	8	15	9	4	7	15	13	10	2	5	6*	3	
558/SP	LL	7	8	4	13	2	8	13	9	4	7	14	11	6	2	5	8	3	
564/SP	NA	7	10	4	14	2	8	21	9	4	6	18	10	7	2	5	8	3	
569/SP	LL	7	10	4	9	2	8	19	9	4	6	14	12	12	2	5	9	3	
570/SP	BL	7	9	4	13	2	8	19	9	4	6	13	10	11	2	5	8	3	
571/SP	LL	7	10	4	11	2	8	25	9	4	6	15	10	10	2	5	7	3	

Table 1. continued

ID	Form	(AC)8b	(GTA)9	(GGT)5	(AT)17	21-3	(AC)9	(AT)15	(AC)8a	27-5	6-7	(TA)18	(GAA)21	(TA)10	23-3	12-5	18-8	SNP	
585/SP	NA	7	12	4	13	2	8	17	9	4	6	NA	11	12	2	5	NS	3	
588/SP	LL	7	9	4	10	2	7	13	9	4	6	15	10	10	2	5	9	3	
PFM/SP	BL	7	10	4	12	2	8	15	9	4	6	16	10	7	2	5	8	3	
545/SP	LL	7	9	4	13	2	7	15	10	4	6	NA	11	8	2	5	8	3	
479/SP	LL	7	10	4	11	2	8	28	11	4	6	14	10	10	2	5	8	3	
578/SP	NA	I	10	3	11	2	8	21	11	4	7	15	12	11	2	5	8*	3	
582/SP	NA	7	10	4	13	2	8	13	9	5	6	NA	10	8	2	4	I	3	
580/SP	LL	NS	11	4	14	2	9	17	8	NS	6	14	15	12	2	NS	2*	3	
JBF/SP ⁷	LL	7	9	4	13	2	8	15	9	4	7	15	13	7	2	5	8	3	
581/SP	NA	8	10	4	20	2	6	15	8	5	6	20	14	8	2	4	3*	4	
586/SP	BL	NS	11	4	12	2	8	13 or 17	10	4	5	NA	10	8	2	5	3*	NS	
JPS/SP	BL	7	9	4	13	2	8	21	10	5	6	NA	12	8	2	4	3*	I	
AAB/SP	NA	I	10	I	11	I	8	17	8	4	6	NA	10	10	2	5 or 6	I	I	
565/SP	NA	7?	10	4	10	I	8	12	9	4	6	I	12	11	2	5	8	I	
VNTR genotypes of <i>M. leprae</i> from other states (AM, MG, MT, RS, PA)																			
RAS/AM	NA	7	9	4	13	2	8	17	10	4	8	14	13	9	1	5	7	1	
577/AM	NA	7	10	4	13	2	8	17	9	5	6	14	13	10	2	4	8	1	
JRB/MG ⁷	NA	7	9	4	13	2	8	15	9	4	7	15	13	7	2	5	8	3	
544/MG	NA	7	11	3	10	2	8	16	10	4	6	14	10	11	2	5	7	3	
594/MT	NA	7	11	4	13	2	8	14	8	4	6	NA	11	11	2	5	9	3	
566/RS	NA	7	11	4	12	2	8	12	9	4	6	17	11	10	2	5	8	3	
568/PA	NA	7	10	4	18	2	7	26	8	5	6	25	13	8	2	4	6*	4	

NA: Not available; NS: Unable to perform PCR due to shortage of the DNA template; I: NO PCR product; *Alleles determined by agarose gel; ? Not sure, weak product; Data in italics: not included for phylogenetic analysis; grey shaded fields: relate alleles of loci 27-5 and 12-5 with SNP genotype.
^{1,2,3,5,6}*M. leprae* isolates from same state with highly similar VNTR profiles which grouped together in the NJ tree (Figure 2).
^{4,7} Isolates with similar VNTR profile seen in a different state.

Table 2. Allele types, frequency and allelic diversity of *M. leprae* VNTR loci in Brazilian leprosy patients

Locus name	(AC)8b	(GTA)9	(GGT)5	(AT)17	21-3	(AC)9	(AT)15	(AC)8a	27-5	6-7	(TA)18	(GAA)21	(TA)10	23-3	12-5	18-8
Brazil- Rio de Janeiro																
Allelic diversity*	0.053	0.812	0.1	0.85	0	0.28	0.927	0.62	0.43	0.561	0.915	0.833	0.853	0	0.544	0.446
Allele type and frequency	7 37 8 1 NA 3	8 2 9 10 10 4 NA 2	2 3 3 4 4 37 NA 2	2 9 9 10 10 2 11 6 12 4 13 4 14 9 15 5 16 1 NA 2	2 2 2 NA NA 1 NA 1	3 40 7 8 8 34 9 3 NA 1	10 1 11 3 13 3 14 5 15 5 16 4 17 5 18 4 19 4 20 4 21 1 23 1 24 1 25 1 28 1 NA 1	7 2 8 8 9 23 10 6 11 1 NA 1	4 28 5 5 12 12 NA 1 NA 1	5 6 6 25 7 8 8 1 NA 1	10 1 12 2 13 1 14 7 15 5 16 1 17 3 18 5 19 2 20 3 21 2 23 2 32 1 NA 6	9 1 10 8 11 12 12 6 13 7 14 1 15 1 16 1 17 1 19 2 20 3 21 2 23 2 NA 1	4 1 5 3 6 10 7 8 8 7 9 7 10 3 11 1 12 1	0 2 1 41	3 2 4 16 5 23 9 5	5 1 6 5 8 30 9 5
Brazil- São Paulo																
Allelic diversity*	0.055	0.688	0.05	0.842	0	0.27	0.954	0.475	0.188	0.298	0.853	0.772	0.853	0	0.146	0.614
Allele type and frequency	7 36 8 1 NA 4	7 1 8 1 9 13 10 19 11 2 12 4 13 1	1 3 3 4 4 NA NA 1	9 1 9 10 10 6 11 6 12 6 13 8 14 9 15 1 20 1	1 2 2 NA NA 2	6 1 7 2 8 35 9 3	11 1 12 2 13 4 14 2 15 9 16 2 17 4 18 1 19 4 21 6 22 1 24 1 25 1 26 1 28 1	8 7 9 29 10 3 11 2	3 1 4 36 5 3 NA 1	5 1 6 34 7 6	13 1 14 9 15 8 16 4 17 1 18 2 20 3 21 2 22 1 NA 10	9 1 10 16 11 10 12 6 13 3 14 3 15 2	6 3 7 8 8 7 9 3 10 10 11 6 12 4	0 2 1 41	4 3 5 36 NA 2 8 21 9 5 NA 6	3 2 4 4 6 6 7 3 8 21 9 5 NA 6

Table 2. continued

Locus name	(AC)8b	(GTA)9	(GGT)5	(AT)17	21-3	(AC)9	(AT)15	(AC)8a	27-5	6-7	(TA)18	(GAA)21	(TA)10	23-3	12-5	18-8	
Population	Brazil (Other than Rio de Janeiro and Sao Paulo)																
Allelic diversity*	0	0.762	0.286	0.715	0	0.286	0.952	0.762	0.477	0.524	0.7	0.667	0.905	0.286	0.477	0.81	
Allele type and frequency	7	9 10 11	2 3 4	1 6 12 13 18	1 2	7	1 12 14 15 16 17 26	8 9 10 2	5 2 8	6 7 8	5 1 1 17 25 NA	14 15 17	3 11 13 4 10 11	7 8 9 10 11 2	1 1 2 6	4 5 5	2 6 7 8 9 1
Population	Brazil- General																
Allelic diversity*	0.05	0.76	0.09	0.86	0	0.27	0.92	0.57	0.43	0.44	0.873	0.81	0.86	0.00	0.41	0.056	

* Simpson's diversity index.¹⁶

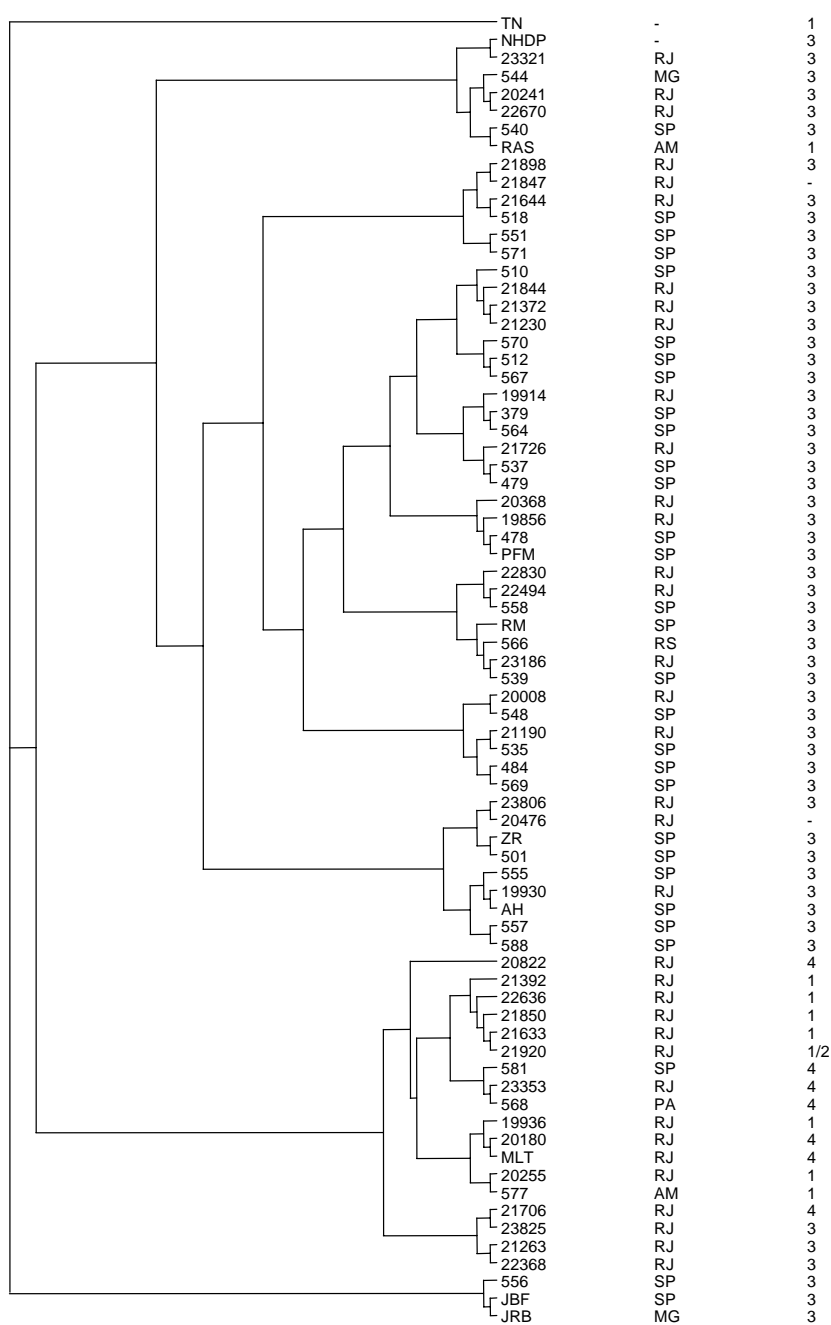


Figure 2. Distance tree generated using the Neighbor joining (NJ) method from VNTR data based on 72 Brazilian *M. leprae* isolates for which allele definition was available for all 16 loci (Table 1). The columns to the right of the tree (left to right) indicate the sample ID, state of origin of patient and *M. leprae* SNP type. TN and NHDP63 are reference strains. Alleles for TN were obtained from the sequenced strain. 1 NHDP63 is an armadillo derived clinical isolate used for VNTR strain typing .5,12.

study population ($n = 64$, 79%) and observed in 24 cases (65%) from Rio de Janeiro, 36 (97%) from São Paulo, two from Minas Gerais and one case from Mato Grosso and from Rio Grande do Sul. In addition, the SNP type 4 was detected in five cases (14%) from Rio de Janeiro and one patient from São Paulo and from Pará. Both patients from Amazonas carried bacilli of SNP type 1, observed also among six cases (16%) from Rio de Janeiro. Upon evaluation of eventual association of SNP type with frequency in patients from Rio de Janeiro or São Paulo, SNP type 3 was significantly more frequent in São Paulo than Rio de Janeiro ($X^2 = 10.66$, $P = 0.001$) while SNP type 1 was more frequently observed in Rio de Janeiro ($X^2 = 4.5$, $P = 0.03$).

GENOTYPING AS DETERMINED BY ANALYSIS OF 16 VNTRS

In our study population, 15 out of 16 the VNTR loci were observed to be polymorphic while the STR locus 21-3 was invariable, presenting two repeat copies in the amplified DNA from all samples (Table 1). When observing the discriminatory power of the different STRs, highest allelic diversity was presented at locus (AT)15, presenting 18 different alleles that ranged in copy number between 10 and 28 copies, 15 copies being the most frequent type. Allele numbers for the loci (TA)18 and (AT)17 were 14 and 10, respectively, both showing a copy number of 14 as being most common. Less variable were (AC)8b, (GGT)5 and 23-3, presenting two alleles each. The discriminatory power as defined by the Simpson's discriminatory index ranged from 0.92 [(AT)15] to 0 [21-3] and we did not observe any marker that presented region associated variation (Table 2).¹⁶

When observing both STR and SNP based genotypes, a correlation was observed between the alleles of loci 27-5 and 12-5 and SNP: all except one isolate that presented the 4:5 allele combination was SNP type 3 (Table 1).

PHYLOGENY

Grouping of genotypes was essentially the same when observing the NJ (Figure 2) or MST (data not shown). In general, the samples that could not be analysed for SNP type were also those that had more than one STR locus left undetermined (Table 1) and the fact that 72 samples had an almost complete set of STR typing data and SNP scores available allowed us to determine the relation between these markers for phylogeny studies. When observing clustering as represented in the NJ tree, a close relation was observed between alleles defined by SNP types and by STRs as the type 3 genotypes were separately grouped from the rest of the SNP genotypes (type 1 and 4) (Figure 2). Exceptions were four samples, including one sample of type 1 (RAS/AM) and three of type 3 (23825/RJ, 21263/RJ and 22368 /RJ).

When looking at cluster size and composition, only two samples were found to be identical and were from different States (JBF/SP and JRB/MG). Upon decreasing stringency of cluster definition and observation of similar genotypes (seven clusters with highest similarity that included six with two samples and one with three; Table 1), we could observe a tendency for samples to be clustered according to origin (five of these groups were composed of samples from patients from the same state). Nonetheless, no particular grouping of samples from Rio de Janeiro or São Paulo was observed in the overall NJ tree (Figure 2) or the UPGMA, MP and MST trees (data not shown).

Discussion

Recent advances in the molecular characterisation of isolates of *M. leprae* can lead to alternative approaches for their detection and differentiation, and for the understanding of several other aspects of leprosy.¹⁷ Genome variability was identified on the basis of two types of genetic analysis: SNP identification, for recognition of major genotypes of *M. leprae*, and STR mapping by MLVA, in an attempt to further describe the strain types, their distribution, and the relationship, if any, between the genotypes and disease phenotypes.^{11,4,7} As far as we know, data on the genetic variability of isolates from Brazilian leprosy patients are not available. We, therefore, characterised a set of SNPs and VNTRs of *M. leprae* present in skin biopsy samples from patients, residents mainly of Rio de Janeiro and São Paulo. Our analysis demonstrated that this collection of 89 samples, obtained from different patients who had been selected randomly, presented 80 different genotypes as determined by combination of all STRs and related with the three observed SNP defined genotypes, consisting mainly of type 3. We also found a small proportion of SNP type 4, a type postulated to have originated in Western Africa and transmitted to the new world during slave trade.¹¹ Since both São Paulo and Rio de Janeiro are located in Southeast Brazil, the ethnically most diverse part of the country and populated by Caucasians (59%), Africans and mixed-race (40%), the largest percentage of Asian Brazilians (0.8%) and Amerindians (0.2%), the detection of SNP type 3 and 4 *M. leprae* is plausible.¹¹ SNP type 1 was noted in six cases from Rio de Janeiro, two from Amazonas and one from São Paulo. Although SNP type 3 is overwhelmingly present in our study population, we still observed a significantly higher frequency of SNP type 3 in São Paulo and of SNP type 1 in Rio de Janeiro; this calls for a well designed study. We imagine, however, that sampling bias could be involved, as most samples from São Paulo are from patients that are residents from the region of Bauru, while the samples from Rio de Janeiro have a more widespread origin (data not shown). We also observed that the expensive [\$7 or more per PCR amplicon in a typical sequencing facility] and time-consuming sequencing procedure for SNP type determination can be replaced by PCR-restriction enzymes analysis [less than \$4 per sample for reagent (enzyme and agarose) costs for all three SNPs] and was efficiently introduced in our study. Our experimental approach allowed us to determine the alleles for all or most of the 16 STRs in a large fraction of our sampling. The overall Hunter Gaston Discrimination Index (HGDI) considering all 16 STRs was 0.997 and similar to the value of 0.995 observed for the 12 MIRU-VNTR typing system established for *M. tuberculosis*.¹⁸ There is a need for additional sampling in Brazil to evaluate the use of VNTR based typing for different situations including epidemiology and phylogenetics. As observed in earlier studies, the HGDI of the individual STRs is highly variable and ranged from 0.00 [21-3] to 0.92 [(AT)15], yet no significant differences were observed when comparing allelic properties from isolates from Rio and Sao Paulo. We evidenced some links between the genotypes composed either by SNP or VNTRs. The allele combination of the STRs 27-5 and 12-5, that, in a 4-5 copy number combination, were almost exclusive for SNP genotype 3, while that for SNP type 4 was 5-4. This pattern was also observed in samples from Colombia (in this series).¹⁹ The VNTR and SNP association was also clear from the organisation of the phylogenetic trees, being either NJ (Figure 2) or MST (data not shown), where in the SNP type 3 strains were separated from the rest when the grouping was constructed on all (or almost all) VNTRs. This strong association between genotype organisation as defined by different kind of genetic markers, such as DR-spacers, MIRUs or SNPs, has also been observed in *M. tuberculosis*.²⁰

A limited number of genotyping assays for *M. leprae* is available and it might be too early to jump to conclusions regarding similarity or difference between data from our study and from others. Nonetheless, we have the impression that regional differences in the allelic range (number of alleles) and frequencies of each of the STR loci might exist. In our study, only two copies of STR 21-3 were observed while Zhang *et al.*⁷ observed three different alleles of this locus; interestingly, this difference was not observed when comparing copy number of STR 23-3, exclusively presenting two copies in both studies. Predominance of particular alleles could also be different between countries, as suggested observing the major copy number of markers (GAA)₂₁ and (TA)₁₈ as reported by us and by Weng *et al.*²¹ Although region associated genotypic particularities are known to occur for other mycobacterial species, further studies are needed to make clear to what extent this occurs in *M. leprae*.^{22–26}

Acknowledgements

We are greatly indebted to the Genomic Platform for DNA Sequencing (PDTIS-Fiocruz). These studies were funded by NIH, NIAID grants AI-047197, AI-063457, and Contract NO1-AI-25469, by the Heiser Program for Research on Leprosy and Tuberculosis of the New York Community Trust through IDEAL – Initiative for Diagnostic and Epidemiological Assays for Leprosy, by the CNPq (401283/2005-4) and the Damien Foundation (ILEP).

References

- ¹ Cole ST, Eiglmeier KJ, Parkhill KD *et al.* Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature*, 2001; **409**: 1007–1011.
- ² Matsuoka M, Maeda S, Kai M *et al.* *Mycobacterium leprae* typing by genomic diversity and global distribution of genotypes. *Int J Leprosy*, 2000; **68**: 121–128.
- ³ Shin YC, Lee H, Lee H *et al.* Variable numbers of TTC repeats in *Mycobacterium leprae* DNA from leprosy patients and use in strain differentiation. *J Clin Microbiol*, 2000; **38**: 4535–4538.
- ⁴ Grothouse NA, Rivoire B, Kim H *et al.* Multiple polymorphic loci for molecular typing of strains of *Mycobacterium leprae*. *J Clin Microbiol*, 2004; **42**: 1666–1672.
- ⁵ Truman R, Fontes AB, De Miranda AB *et al.* Genotypic variation and stability of four variable-number tandem repeats and their suitability for discriminating strains of *Mycobacterium leprae*. *J Clin Microbiol*, 2004; **42**: 2558–2565.
- ⁶ Young SK, Taylor GM, Jain S *et al.* Microsatellite mapping of *Mycobacterium leprae* populations in infected humans. *J Clin Microbiol*, 2004; **42**: 4931–4936.
- ⁷ Zhang L, Budiawan T, Matsuoka M. Diversity of potential short tandem repeats in *Mycobacterium leprae* and application for molecular typing. *J Clin Microbiol*, 2005; **43**: 5221–5229.
- ⁸ Matsuoka M, Zhang L, Morris MF *et al.* Polymorphism in the rpoT gene in *Mycobacterium leprae* isolates obtained from Latin American countries and its possible correlation with the spread of leprosy. *FEMS Microbiol Lett*, 2005; **243**: 311–315.
- ⁹ Monot M, Honoré N, Balière N *et al.* Are variable-number tandem repeats appropriate for genotyping *Mycobacterium leprae*? *J Clin Microbiol*, 2008; **46**: 2291–2297.
- ¹⁰ Young SK, Ponnighaus JM, Jain S *et al.* Use of Short Tandem Repeat Sequences to Study *Mycobacterium leprae* in Leprosy Patients in Malawi and India. *PLoS Negl Trop Dis*, 2008; **2**: e214.
- ¹¹ Monot M, Honoré N, Garnier T *et al.* On the origin of leprosy. *Science*, 2005; **308**: 1040–1042.
- ¹² Kimura M, Sakamuri RM, Grothouse NA *et al.* Rapid Variable-Number Tandem Repeat (VNTR) genotyping for *Mycobacterium leprae* clinical specimens. *J Clin Microbiol*, 2009; **47**: 1757–1766.
- ¹³ Sakamuri RM, Harrison J, Gelber R, *et al.* A continuation: study and characterisation of *M. leprae* short tandem repeat genotypes and transmission of leprosy in Cebu, Philippines. (Submitted in this Series) *Lepr Rev*, 2009; **80**.
- ¹⁴ Tamura K, Dudley J, Nei M *et al.* MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*, 2007; **24**: 1596–1599.

- ¹⁵ Sakamuri RM, Kimura M, Li W *et al.* Population based molecular epidemiology of leprosy in Cebu, Philippines. *J Clin Microbiol*, 2009; **47**: 2844–2854.
- ¹⁶ Hunter PR, Gaston MA. Numerical Index of the Discriminatory Ability of Typing Systems: an Application of Simpson's Index of Diversity. *J Clin Microbiol*, 1988; **26**: 2465–2466.
- ¹⁷ Matsuoka M. Recent advances in the molecular epidemiology of leprosy. *Jpn J Leprosy*, 2009; **78**: 67–73.
- ¹⁸ Kremer K, Arnold C, Cataldi A *et al.* Discriminatory power and reproducibility of novel DNA typing methods for *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *J Clin Microbiol*, 2005; **44**: 4498–4510.
- ¹⁹ Cardona-Castro N, Beltran-Alzate JC, Romero-Montoya IM *et al.* Identification and comparison of *Mycobacterium leprae* genotypes in two geographical regions of Colombia. (Submitted in this series) *Lepr Rev*, 2009; **80**: 316–321.
- ²⁰ Filliol I, Motiwala AS, Cavatore M *et al.* Global Phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* Based on Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Analysis: Insights into Tuberculosis Evolution, Phylogenetic Accuracy of Other DNA Fingerprinting Systems, and Recommendations for a Minimal Standard SNP Set. *J Bacteriol*, 2006; **188**: 759–772.
- ²¹ Weng X, Wang Z, Liu J *et al.* Identification and distribution of *Mycobacterium leprae* genotypes in a region of high leprosy prevalence in China: a 3-year molecular epidemiological study. *J Clin Microbiol*, 2007; **45**: 1728–1734.
- ²² Penna ML, Wand-Del-Rey-de-Oliveira ML, Penna G. Spatial distribution of leprosy in the Amazon region of Brazil. *Emerg Infect Dis*, 2009; **15**: 650–652.
- ²³ Penna G, Pinto LF, Soranz D *et al.* High incidence of diseases endemic to the Amazon region of Brazil, 2001–2006. *Emerg Infect Dis*, 2009; **15**: 626–632.
- ²⁴ Rodrigues-Júnior AL, do O VT, Motti VG. Spatial and temporal study of leprosy in the state of São Paulo (Southeastern Brazil), 2004–2006. *Rev Saude Publica*, 2008; **42**: 1012–1020 (English, Portuguese).
- ²⁵ Amaral EP, Lana FC. Spatial analysis of Leprosy in the microregion of Almenara, MG, Brazil. *Rev Bras Enferm*, 2008; **61**: 701–707 (Portuguese).
- ²⁶ Gauy JS, Hino P, dos Santos CB. Spatial distribution of leprosy cases in Ribeirão Preto, Brazil, 2004. *Rev Lat Am Enfermagem*, 2007; **15**: 460–465.

Genotyping of *Mycobacterium leprae* from Brazilian leprosy patients suggest the occurrence of re-infection or of bacterial population shift during disease relapse.

Os casos de recidiva associados à resistência às drogas da poliquimioterapia representam um grave problema e desde a década de 60 vários relatos têm sido descritos. A detecção molecular de resistência tem se baseado na observação de mutações em genes que codificam regiões envolvidas no alvo de ação das drogas ou de sua ativação. Desta forma, a detecção de resistência a um determinado medicamento poderia estar relacionada à uma reativação da doença. Além desta ferramenta, a diferenciação de isolados de *M. leprae* através de sequências repetitivas presentes em seu genoma poderia também contribuir de forma efetiva para a distinção entre os casos de reativação e re-infecção na hanseníase.

Com o objetivo de diferenciar os casos de recidiva, amostras de biópsias de pele coletadas durante a fase inicial da doença e a fase de recaída de 8 pacientes foram analisadas utilizando como ferramenta quatro microssatélites e o sequenciamento de genes associados à resistência às drogas (*rpoB*, *folP1*, *gyrA* e *gyrB*). A metodologia empregada e os resultados obtidos estão descritos no artigo que segue, o qual foi aceito para publicação no periódico “**Journal of Medical Microbiology**” em maio de 2011.

1 **Genotyping of *Mycobacterium leprae* from Brazilian leprosy patients suggest the**
2 **occurrence of re-infection or of bacterial population shift during disease relapse**

3
4 Adalgiza da Silva Rocha¹, Alexandre Araujo Cunha Santos¹, Patrícia Pignataro², José
5 Augusto Nery², Antônio Basílio de Miranda⁴, Diego Fonseca Soares¹, Amanda Nogueira
6 Brum Fontes¹, Alice Miranda², Helen Ferreira², Neio Lucio Boéchat³, Maria Eugênia Novisck
7 Gallo², Euzenir Nunes Sarno², Maria Leide W. De Oliveira⁵ and Philip Noel Suffys¹

8
9 ¹Laboratory of Molecular Biology Applied to Mycobacteria, Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz,
10 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

11 ²Leprosy Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

12 ³Multidisciplinary Laboratory, University Hospital Clementino Fraga Filho, Federal
13 University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

14 ⁴Laboratory of Functional Genomic and Bioinformatics, Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Rio
15 de Janeiro, RJ, Brazil

16 ⁵Training Center on Dermatology, University Hospital Clementino Fraga Filho, Federal
17 University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

18
19 Correspondence: Adalgiza da Silva Rocha, adsrocha@hotmail.com

20 Philip Noel Suffys; psuffys@ioc.fiocruz.br

21
22 Running title: genotyping of *M. leprae* from relapse cases

23 **SUMMARY**

24 We performed genotyping of *Mycobacterium leprae*, present in skin biopsy samples that were
25 collected during the initial and the relapse stage from eight leprosy patients, suffering from
26 disease relapse. Sequence analysis of part of the *M. leprae* genes *rpoB*, *folP1*, *gyrB* and *gyrA*
27 did not show genetic change that supported the presence of drug resistant bacilli. However,
28 we observed a synonymous nucleotide change at position 297 of *gyrA* among five of these
29 patients, one being C to T and four presenting T to C at 297. Additional genotyping by
30 analysis of the four Short Tandem Repeats TTC21, GTA9, AT17 and TA18 showed that the
31 *gyrA* SNP change was accompanied by a change in STR genotype. Our data suggest that
32 leprosy relapse in this series of cases, living in an area endemic for leprosy, could be caused
33 by *M. leprae* that have a genotype that is different from the one that caused initial disease.

34

35 INTRODUCTION

36

37 Since the introduction of standardized multi-drug therapy (MDT) schemes as
38 established by the World Health Organization in 1981 (Grosset *et al.*, 1989), a considerable
39 decrease of the prevalence of leprosy in many endemic countries has been observed.
40 Nonetheless, only recently a decline of disease incidence rate has been observed in some
41 regions. As the new cases are considered a major indicator of the maintenance of disease
42 transmission (Rinaldi *et al.*, 2005), this points out that there is still a need for better measures
43 to control leprosy (WHO, 2008). Relapsed cases could be a new source of disease
44 transmission, but differentiating diagnosis of disease relapse and reactional states poses some
45 difficulties in the field, contributing to continuing disease transmission in some situations
46 (Shetty *et al.*, 2001; Linder *et al.*, 2008) or over diagnosis of relapse in others.

47 Leprosy relapse is either due to incorrect patient handling, or to inadequate drug intake,
48 leading to the reappearance of drug susceptible and/or resistant bacilli, of persistent bacteria
49 or due to re-infection with *Mycobacterium leprae* after cure (Oliveira *et al.*, 2002; Reddy &
50 Cherian, 1991). These peculiarities of leprosy have important implications for the case
51 management and the control of multibacillary (MB) leprosy, since examination and skin
52 smears are not sensitive enough to monitor short- or long-term efficacy of chemotherapy. A
53 reliable determination of the relapse rate is the single most important parameter to determine
54 the efficacy of multi-drug therapy (MDT) (Linder *et al.*, 2008; Oskam *et al.*, 2008).

55 On a global level, hardly any data are available on the relative contribution of these
56 factors to disease relapse and we here present data obtained by genotyping of *M. leprae*
57 isolates obtained from a selection of patients that are part of a larger study for determination
58 of the importance of the relapse among leprosy patients in Brazil.

59 The recent discovery of genetic variability among isolates of *M. leprae*, based mainly
60 on differences of copy numbers of a set of Short Tandem Repeats (STRs) and a set of SNPs,
61 allowed recognition of bacterial strains, a better definition of species phylogeny and
62 differentiation between relapse due to drug resistance and reinfection (Ramasoota, P *et al.*,
63 2000; Cambau *et al.*, 2002; You *et al.*, 2005; Matsuoka *et al.*, 2000; Monot *et al.*, 2008).
64 Combining genetic analysis of the genes *rpoB*, *folPI*, *gyrA* and *gyrB* and VNTR typing in
65 samples from the first and second disease in eight leprosy relapse cases, we propose that re-
66 infection may provoke relapse.

67

68 **METHODS**

69

70 ***Patients***

71 The present study was based on evaluation of samples from eight leprosy patients as
72 part of a project that was designed for more accurate determination of the frequency of relapse
73 among Brazilian leprosy patients (“*Magnitude and characterization of leprosy relapse cases*
74 *in patients that had been submitted to WHO multi-drug therapy and identification of resistant*
75 *M. leprae strains in five Brazilian states*”; MCT-CNPq/MS-SCTIE-DECIT – Nº 35/2005).
76 Among these relapse cases, we were able to collect skin biopsy samples both during the first
77 and the second disease episode from eight cases, all residents of the City of Rio de Janeiro
78 and diagnosed at the “Ambulatório Souza de Araújo” of the Leprosy Laboratory at the
79 Oswaldo Cruz Institute (Fiocruz, Rio de Janeiro). These cases were not selected for any
80 particular reason but were the only confirmed as being suffering from relapse and had a
81 clinical sample available taken during both diagnosis of initial disease and relapse.

82 All were considered as suffering from leprosy relapse, as based on standardized and
83 optimized procedures for diagnosis and epidemiological criteria for definition of relapse,
84 including diagnosis of active clinical leprosy by an expert professional and confirmation by
85 bacteriologic analysis of slit skin smears and histopathological exams; all this after having been
86 considered cured from the first disease after being submitted to the Brazilian Leprosy
87 Program treatment regimens. For this project in particular, additional criteria than those
88 traditionally used for definition of relapse were used, adopting more stringent exclusion
89 criteria such as lack of biopsy samples and not having completed treatment. In addition,
90 patients were diagnosed only in leprosy reference centers with diagnosis quality control and
91 sharing uniform procedures (Oliveira et al., 2006-2007). Also, we also made sure that

92 patients had been treated only by official treatment regimens as adopted by the National
93 Leprosy Program. Note that in Brazil, a particular MDT scheme was used (“DNDS”) that
94 included daily 600 mg doses of rifampicin during three initial months, replaced by the MDT
95 scheme as recommended by WHO since 1986.

96

97 *Clinical samples*

98 As part of the diagnostic procedure, slit skin smear sample was collected from four
99 sites. A skin biopsy was collected using a 6 mm punch and cut in half, submitting one part to
100 fixation in 10% neutral buffered-formalin and paraffin embedding for histopathology exam
101 and the other part to snap freezing or immersion in 70% ethanol for PCR analysis.

102

103 *Histopathology of the skin biopsies*

104 The formalin-fixed specimens were serially cut in 5 µm-thick sections and stained with
105 hematoxylin-eosin and Wade’s stain for visualization and counting of acid-fast bacilli using
106 the logarithmic index (Ridley and Hilson, 1967) and disease classification according to Ridley
107 and Jopling (1966). Sections were viewed and captured on a Nikon Eclipse E400 microscope
108 (Nikon, Japan) equipped with a Cool Snap Pro camera (Media Cybernetics, USA) and Image
109 Pro plus 4.0 software.

110 Among the eight cases, all received MDT for MB disease during both disease stages,
111 except for the two cases that were diagnosed in 1987 and received, a common treatment
112 scheme before MDT introduced (Table 1).

113

114 *Extraction of nucleic acids*

115 The frozen or ethanol fixed samples (the latter after being rehydrated by immersing
116 during 10 min in milli-Q) were cut into small pieces and macerated by performing strokes
117 using disposable sterile sticks (Scienceware, Bel-Art Products, Pequannock, USA) in 1.5 ml
118 micro centrifuge tubes and after addition of 500 µl of milli-Q water and 100 µl of zirconium
119 beads (0.1 mm; BioSpec Products, Bartlesville, USA), 150 to 200 µl of Sephaglas was added
120 (Flexiprep, GE Healthcare) and the suspension mixed vigorously during 10 sec, centrifuged at
121 12,400 g for 3 min and the supernatant removed. The tissue/beads/Sephaglas/DNA-
122 containing pellet was suspended in 200 µl of washing buffer (20 mM Tris-HCl - pH 7.5, 2
123 mM EDTA, 200 mM NaCl) and absolute ethanol added to a final concentration of 60%. The
124 mixture was mixed vigorously during 3 min and after sedimentation by centrifuging and
125 removal of the supernatant, the pellet washed with 70% ethanol and air-dried at RT. For
126 DNA elution, 50 to 150 µl of water milli-Q (depending on the pellet size) was added and after
127 mixing and incubation during 5 min at RT, centrifuged at 13,000 rpm for 1 min. The
128 supernatant was transferred to another tube and stored frozen.

129

130 ***Amplification and sequencing analysis of part of rpoB, folP1, gyrB and gyrA***

131 Part of the genes *rpoB*, *folP1*, *gyrB* and *gyrA* were analyzed by direct sequencing of
132 PCR products generated using conditions described previously;, including the use of
133 amplification primers *MrpoBF* (5' GGT GGT CGC CGC TAT CAA G 3') and *MrpoBR* (5'
134 TTT GCG GTA CGG TGT TTC G 3')(Ramasoota *et al.*, 2000), *folPF* (5' TAC TTA CTG
135 TAA TCC CCT GTG CTG 3') and *folPR* (5' TTG ATC CTG ACG ATG CTG TC 3') (You *et*
136 *al.*, 2005), *gyrBF* (5` ACT GAT CCT CGA AGT TCT GAA CTG 3`) and *gyrBR* (5`CAA
137 TGC CGT AAT AAT TGC TTG AA 3`) and *gyrAR* (5` CAT CGC TGC CGG TGG GTC
138 ATT A 3`) and *gyrAF* (5` CCC GGA CCG TAG CCA CGC TAA GTC 3`) (Cambau *et al.*,
139 2002) generating PCR products of respectively 289, 173, 187 and 178 bp.

140 Because of the lack *M. leprae* species specific generation of PCR products using the
141 PCR conditions for *gyrA*, we designed a new set of primers, *gyrANF* (5` TAA GTC AGC
142 ACG GTC AGT CG 3`) and *gyrANR* (5` GAC ACA CAA TAA CGC ATC GC 3`), that
143 generated a 189 bp fragment only when *M. leprae* DNA was present (data not shown). As an
144 additional control measure, each PCR reaction contained at least one negative control. In
145 addition, sequences obtained from *M. leprae* were different from that of *M. tuberculosis* and
146 other mycobacterium species, potential sources of contamination.

147 Amplification was performed in a PCR mixture of 50 µl containing 0.25 mM of each
148 dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-Cl (pH 8.3); 30 pmoles/µl of each primer
149 pair and 1 U of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen do Brasil) and by submitting for 5 min to
150 94°C, followed by a touch-down procedure consisting of denaturation at 94°C for 45 sec and
151 annealing at 68°C to 63°C at 45 sec, introducing a 1°C decrease per cycle during the first six
152 cycles. The subsequent 35 cycles were of 94°C for 45 sec, 62°C s for 45 sec and 72 °C for 90
153 s, followed by a final extension at 72°C for 10 min.

154 After verification of PCR product quantity and quality on 3% agarose gel, amplicons
155 were purified using the ChargeSwitch PCR Clean-Up Kit (Invitrogen do Brasil) and
156 sequenced using the same primers as those for generating the PCR fragment of each gene,
157 using the ABI Big Dye 3.1 Terminator Ready Reaction Kit (Applied Biosystems do Brasil).

158 Sequence data presented here are those obtained after using the forward and reverse
159 primers and, in most cases, having repeated the experiment. In the case of the
160 characterization of the *gyrA* SNP, sequence analysis was performed also after generation of
161 the 189 bp fragment using *Pfu* DNA polymerase (Promega).

162 Sequences were generated on an ABI 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) and
163 introduced into SeqScape (Applied Biosystems) and compared with the *M. leprae* sequences
164 NC002677 and z14314 (*rpoB*), AL023093 (*folP1*), NC002677 (*gyrB*) and NC002677 (*gyrA*),

165 available at Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/>). As a control during PCR
166 amplification and sequencing reactions, we included an aliquot of *M. leprae* DNA prepared
167 from Armadillo tissue, kindly donated by Dr Patrick Brennan (Colorado State
168 University,USA).

169

170 ***Genotyping by VNTR analysis***

171 For VNTR analysis, we selected four STRs, TTC21, GTA9, AT17 and TA18,
172 described at the time of study to be capable of differentiating between unrelated isolates of *M.*
173 *leprae* (Truman et al., 2004). For analysis of the copy number, we performed direct
174 sequencing of PCR products. In brief, amplification was performed in a 50 µl reaction
175 sample containing 10 mM Tris-HCL (pH 8.3), 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.2 mM
176 deoxynucleoside triphosphate mix and 2.5 U of AmpliTaq DNA polymerase (Applied
177 Biosystems, Foster City, Calif.), 100 pmol of each primer for AT 17 (5' ACC CGG AAT
178 TCC TCC AAG 3') and (5' GCC AGA AGC GTC ATC TGT TC 3'), TA18 (5'CCG CGT
179 TAG CAT AGG CAA T 3') and (5' AAC GGT TAG GTC GAG ACC AC 3') while for GTA
180 (5' CGC AGA TGC AAC GAT CAC 3') and (5' AAT ATG CAT GCC GGT GGT 3') were
181 used 50 pmol. After denaturing the DNA at 94 °C for 10 min, PCR was carried out in a
182 thermocycler (Veriti 96 Well Thermal Cycler, Applied Biosystems), by submitting samples to
183 40 cycles consisting of 94°C for 30 sec, 60°C for 30 sec and 72°C for 30 sec, with a final
184 extension at 72°C for 10 min. The primer sequences and PCR conditions for TTC21 were
185 described previously (Shin et al 2000). For evaluation of PCR yield, gel electrophoresis was
186 performed using five ul of the PCR product and amplicons were purified on Qiaquick Spin
187 Columns (Qiagen Inc.), followed by sequencing using the ABI PRISM BigDye Terminator v
188 3.0 sequencing kit (Applied Biosystems) and analysis on an ABI Prism 3730 automated DNA
189 sequencer (Applied Biosystems). Sequencing was performed of both DNA strands using

190 forward and reverse primers and sequences analysed using the *MEGA* software (Version 4.0)
191 (Tamura *et al.*, 2007).

192

193 **RESULTS**

194

195 *Patient's characteristics and diagnosis*

196 Initially, the eight cases included in this study were considered as leprosy relapse
197 cases and due to the availability of clinical samples during the first and second disease stage,
198 submitted to genotyping. Time for diagnosis of relapse varied between nine and 15 years
199 with an average of 12 years. However, upon more careful verification of the clinical data,
200 patient H was recognized as suffering from the Type I reactional state and not from disease
201 relapse; this case was maintained in our study as a control case.

202 Clinical data available from the eight patients are summarized in Table 1. All were
203 residents of neighborhoods of Rio de Janeiro that are known to be highly endemic for leprosy
204 and high bacterial loads were observed in the biopsy samples taken during both disease
205 stages, by microscopic analysis of slit skin smear sample, as part of the diagnosis as suffering
206 from MB leprosy.

207 All these patients had MB disease confirmed by histological examination which allowed
208 further differentiation into BL or LL forms of leprosy. Also all were released as cured after
209 receiving official treatment regimen (Brazil/MDT or WHO/MDT).

210

211 *Sequencing of rpoB, folP1, gyrB and gyrA*

212 From each of the eight patients, a skin biopsy sample was available for DNA analysis
213 from first and second disease period and from all good quality sequences could be generated
214 for the fragments of *rpoB*, *folP1*, *gyrB* and *gyrA*. The sequence of the fragments of the first
215 three genes was found to be identical to that of the reference DNA or sequences described for
216 drug susceptible strains (data not shown), indicating that none of the formerly described drug

217 resistant associated SNPs were present (Table 1) ((Ramasoota *et al.*, 2000; You *et al.*, 2005;
218 Cambau *et al.*, 2002).

219 In the case of the *gyrA* fragment sequence however, we observed the transition from T
220 to C or C to T at position 297 of *gyrA*. The presence of a T at this position was observed in at
221 least one of the samples of the seven relapse cases while both of the samples from the control
222 patient H (no relapse) presented *gyrA*-C (Table 2). When concentrating on allele frequency
223 among the samples available, we observed a C in seven of the 16 alleles (44%) while T was
224 present in the other nine (56%); among the patients, a T was present in seven of the eight
225 patients (88%). Upon analysis and comparison of the SNP composition from each of both
226 samples of each of the patients, a transition was observed among five of the seven relapse
227 cases (71%), one (20%) carrying T, and the other four (80%) C at position 297 of *gyrA*; the
228 other two cases had the allele with T in both of their samples (Table 2).

229

230 ***Genotyping of the four STRs TTC21, GTA9, AT17 and TA18***

231 Due to the limited amount of processed sample available for DNA analysis, we were not
232 able to determine the copy number of the four *M. leprae* STRs in all samples and all patients.
233 As presented in Table 2, five of the relapse cases yielded the genotype as defined by either
234 four or three of the STRs.

235 Identical STR copy number in both samples, although defined by copy number of only
236 three of the four STRs, was observed in the two cases that also presented identical *gyrA* allele
237 (E and F). On the other hand, a change in at least two or three of the STRs was observed in
238 the three patients that also presented a modification of the *gyrA* SNP (Table 2).

239

240 **DISCUSSION**

241

242 After introduction of MDT, relapses rates became generally low (WHO, 2004). However,
243 after WHO surveillance introduction from 2009 many countries informed not only relapse but
244 also drug resistant cases (WHO, 2009). The difference in relapse frequency as defined by
245 these studies is probably due to differences in definition of what should be considered as a
246 relapse case and of what is cured in leprosy , and of modification of diagnostic procedures
247 that not always yielded a clear difference between relapse and reactional states (Opromolla,
248 1994). According to Pannikar *et al* (1989), “Re-infection is one of the causes of relapses: a
249 person who contracts leprosy probably has a larger chance of re-infection than another person,
250 considering the former’s susceptibility”. This however is not generally accepted, as even LL
251 patients present more intense immunological response under MDT treatment (Desikan 1995)
252 Nonetheless, we believe that in regions that are highly endemic for leprosy, especially in the
253 crowded peripheral areas of metropolitan cities, treatment does not present as good coverage
254 as in other regions, therefore being more exposed to disease transmission and increasing the
255 risk for re-infection. Rafi *et al* (1995) also considered that re-infection could be responsible
256 for relapse.

257 For Ramu (1995), the incubation period is generally “bizarre” in the re-infection. Skin and
258 nerve lesions do not correspond to those original lesions. Shaw *et al* (2000) agreed with the
259 long incubation period and suggests that in high prevalent areas, such as these patients
260 presented, re-infection should be considered.

261 The absence of genotypes indicative for drug resistance observed presently also suggests
262 that treatment failure is not a major cause of disease relapse. The contribution of alternative
263 mechanisms such as reinfection or the appearance of latent or minor fractions of the bacterial
264 population is reasonable. This is supported by our observation of the high frequency of a

265 genotype change, as defined by the SNP at 297 in the *gyrA* gene. In the present patient
266 population, we observed the presence of the T allele in 56% of the samples and 88% of the
267 patients, a frequency that is considerably higher than that observed in the whole study
268 population of relapse cases mentioned before (da Silva Rocha, A et al. unpublished results).
269 As the occurrence of SNPs, is considered a rare event in *M. leprae* (Monot *et al.* 2005).
270 According to both STR and SNP typing, the author identified four populations of *M. leprae*,
271 defined as SNP types 1, 2, 3 and 4, circulating across continents, (Monot et al., 2005). Our
272 data on combined analysis of these four genotypes defined by SNPs and the nature of the
273 *gyrA* SNP at 297 demonstrated that the *gyrA* T allele was always SNP type 3, while the *gyrA*
274 C allele was associated either with SNP types 1 or 4 (our unpublished results). This
275 association between the conventional SNP types and the one we defined in *gyrA*, suggest that
276 the latter may serve as an additional phylogenetic marker, representing two major *M. leprae*
277 populations in Brazil.

278 Also, the high frequency of allele change in the relapse cases observed presently could be
279 representative for a genotype that has been selected from a bacterial population that is
280 composed of multiple isolates with different genotypes during development of disease
281 relapse. We observed that the genotype data as defined by the SNP 297-*gyrA* were supported
282 by the VNTR data (Table 2).

283 In summary, sequence analysis of the genes *rpoB*, *folP*, *gyrB* and *gyrA* and of four STRs
284 of *M. leprae* present in samples from a set of leprosy patients strongly suggests that selection
285 of a bacteria subpopulation or re-infection, and not development of drug resistance, is mainly
286 responsible for disease relapse. The use of molecular tools to differentiate between relapse
287 and re-infection was suggested earlier by Oskam et al. (2008) but without experimental
288 evidence. Our data suggests that in most cases, there is no need for the use of alternative
289 schemes for the therapeutic treatment of these cases of relapse. However, as this study was

290 performed on patients that were residents of Rio de Janeiro only, further studies are needed to
291 evaluate whether this is a isolated feature of relapse patients from this region of the country.
292 The importance of the need for further investigation of leprosy relapse is evidenced by the
293 observation that in the Northeast region of Brazil, 34 % of relapse cases present multi-family
294 leprosy cases (Brito, et al. 2005).

295

296 **ACKNOWLEDGEMENTS**

297 We thank the CNPq (309059/2009-7 and 401296/2005-9) and NIH (R01 AI047197) for
298 financial support

299

300

301 **REFERENCES**

302

303 Brito, M. F. M., Gallo, M. E. N. & Ximenes, R. A. A., 2005. O retratamento por recidiva em
304 hanseníase Retreatment of leprosy relapse. *An Bras Dermatol.* 80, 255-60.

305

306 Cambau, E., Bonnafous, P., Perani, E., Sougakoff, W., Ji, B., Jarlier, V., 2002. Molecular
307 detection of rifampin and ofloxacin resistance for patients who experience relapse of
308 multibacillary leprosy. *Clin Infect Dis.* 34, 39-45.

309

310 Cole, S. T., Eiglmeier, K., Parkhill, J., James, K.D., Thomson, N.R., et al., 2001. Massive
311 gene decay in the leprosy bacillus. *Nature.* 409, 1007–1111.

312

313 da Cunha, M. D., Cavaliere, F. A. M., Hércules, F. M., Duraes, S. M. B., de Oliveira, M. L.
314 W.-D. & de Matos, H. J., 2007. Os indicadores da hanseníase e as estratégias de eliminação
315 da doença, em município endêmico do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Cad. Saúde Pública,*
316 *Rio de Janeiro.* 23, 1187-1197.

317

318 Desikan, K.V., 1995. Relapse, reactivation or reinfection? *Indian J Lepr.* 6, 73-11.

319

320 Fontes, A. N. B., Sakamuri, R. M., Baptista, I. M. F. D., Ura, S., Moraes, M. O., Martínez, A.
321 N., Sarno, E. N., Brennan, P. J., Vissa, V. D. & Suffys, P. N., 2009. Genetic diversity of
322 *Mycobacterium leprae* isolates from Brazilian leprosy patients. *Lepr Rev,* 80, 302-15.

323

324 Goulart, I. M. B., Souza, O. B, Marques, C. R., Pimenta, V. L., M. A. G. and Goulart, L. R.,
325 2008. Risk and Protective Factors for Leprosy Development Determined by Epidemiological
326 Surveillance of Household Contacts. *Clinical and Vaccine Immunology*. 15, 101–105.
327
328 Guillemin, I., Jarlier, V. & Cambau, E., 1998. Correlation between Quinolone Susceptibility
329 Patterns and Sequences in the A and B Subunits of DNA Gyrase in Mycobacteria.
330 *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 42, 2084–2088.
331
332 Grosset, J., Guelp, C., Bobin, P., et al., 1989. Study of 39 documented relapses of
333 multibacillary leprosy after treatment with rifampin. *Int J Lepr*. 57, 607 – 614.
334
335 Kaimal, S. and Thappa, D. M., 2009. Relapse in leprosy. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*.
336 75, 126-135.
337
338 Kim, S.-K., Lee, S.-B., Kang, T.-J. & Chae, G.-T., 2003. Detection of gene mutations related
339 with drug resistance in *Mycobacterium leprae* from leprosy patients using Touch-Down (TD)
340 PCR. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 36, 27-32.
341
342 Linder, K.; Zia, M., et al., 2008. Relapses versus reactions in multibacillary leprosy: proposal
343 of new relapse criteria. *Tropical Medicine and International Health*. 13, 295-309.
344
345 Matrat, S., Cambau, E., Jarlier, V. & Aubry, A., 2008. Are All the DNA Gyrase Mutations
346 Found in *Mycobacterium leprae* Clinical Strains Involved in Resistance to Fluoroquinolones.
347 *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 52, 745-747.
348

349 Matsuoka, M., Kashiwabara, Y., Namisato M., 2000. A *Mycobacterium leprae* isolate
350 resistant to dapsone, rifampin, ofloxacin and sparfloracin. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 68,
351 452-5.

352

353 Monot, M., Honoré, N., Garnier, T., Araoz, R., Coppé, J.-Y. et. al., 2005, On the Origin of
354 Leprosy. *Science.* 308, 1040 – 1042.

355

356 Monot, M., Honoré, N., Balie`re, C., Ji, B., Sow, S., Brennan, P. J. & Cole, S. T., 2008. Are
357 Variable-Number Tandem Repeats Appropriate for Genotyping *Mycobacterium leprae*?
358 *Journal of Clinical Microbiology.* **46**, 2291–2297.

359

360 Monot, M., Honoré, N., Garnier, T., Araoz, R., Coppée, J.Y., Lacroix, C., Sow, S., Spencer, J.
361 S., Truman, R. W., Williams, D. L., Gelber, R., Virmond, M., Flageul, B., Cho, S. N., Ji, B.,
362 Paniz-Mondolfi, A., Convit, J., Young, S., Fine, P. E., Rasolofo, V., Brennan, P.J. & Cole, S.
363 T., 2005. On the origin of leprosy. *Science.* 308, 1040-2.

364

365 Ministério da Saúde, 2009. Instruções Normativas – Portaria Nº. 125/SVS-SAS, de 26 de
366 Março de 2009. *Diário Oficial da União.* Nº – 59. Ministry of JHealth (2009). Normative
367 Instructions – Publication Number 125/SVS-SAS, 26th of March of 2009. Official Diary of
368 the Union. Number 59.

369

370 Oliveira, M.L.W. et al., 2006 – 2007. Research Project: (“*Magnitude and characterization of*
371 *leprosy relapse cases in patients that had been submitted to WHO multi-drug therapy and*
372 *identification of resistant M. leprae strains in five Brazilian states*” MCT-CNPq / MS-SCTIE-
373 DECIT – Nº 35/2005).

374

375 Oliveira, M. L. W, Pierro, A. P. S., Silveira, P. A. M., Campos, M. M. C. & Vilela, M. F.,
376 2002. Relapse of lepromatous leprosy after WHO/MDT with rapid bacterial growth. *Leprosy*
377 *Review.* 73, 386-8.

378

379 Opromolla, D. V. A. , Costa, H. C. & Oliveira, P. R. D., 1993. Resistência medicamentosa
380 múltipla secundária na hanseníase. *Hansen Int.* 18, 11-16.

381

382 Opromolla, D.V. A., 1994. Recidiva ou reação reversa. *Hansen Int.* 19, 10 – 16.

383

384 Oskam, L., Dockrell, H. M, Brennan, P. J., Gillis, T., Vissa, V., Richardus, J. H. and
385 Members of the IDEAL Consortium, 2008. Molecular methods for distinguishing between
386 relapse and reinfection in leprosy. *Tropical Medicine and International Health* 13, 1325–
387 1326.

388

389 Pannikar, V.; Jesudasan, K, Vijayakumaran, P. and Christian, M., 1989. Relapse or late
390 reversal reaction? *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 57, 526-8.

391

392 Rafi, A; Donoghue, H. D. and Stanford, J. L., 1995. Application of polymerase chain reaction
393 for the detection of *Mycobacterium leprae* DNA in specimens from treated leprosy patients.
394 *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 63, 42-7.

395

396 Ramasoota, P., Wongwit, W., et al., 2000. Multiple mutations in the *rpoB* gene of
397 *Mycobacterium leprae* strains from leprosy patients in Thailand. *Southeast Asian J. Trop.*
398 *Med. Health.* 31, 493-497.

399

400 Ramu, G., 1995. Clinical features and diagnosis of relapses in leprosy. Indian J Lepr. 67, 45-
401 59. Review

402

403 Reddy, P. K. & Cherian, A., 1991. Relapse in leprosy after multidrug therapy and its
404 differential diagnosis with reversal reaction. Indian J Lepr. 63, 61-9.

405

406 Ridley D. S. & Jopling W. H., 1966. Classification of leprosy according to immunity. A five-
407 group system. Int J Lepr Other Mycobact Dis. 34, 255–73.

408

409 Ridley D. S. & Hilson G. R., 1967. A logarithmic index of bacilli in biopsy. I. Method. Int J
410 Lepr Other Mycobact Dis. 35, 184-6.

411

412 Rinaldi, A., 2005. The Global Campaign to Eliminate Leprosy. *PLoS Medicine* |
413 www.plosmedicine.org. 2, 1222 – 1225.

414

415 Schurr, E., Alcaïs, A., de Léséleuc, L. & Abel, L., 2006. Genetic predisposition to leprosy: A
416 major gene reveals novel pathways of immunity to *Mycobacterium leprae*. *Seminars in*
417 *Immunology*. 18, 404–410.

418

419 Shaw, I. N., Ebenezer, G., Rao, G. S., Natrajan, M. M. and Balasundaram, B., 2000. Relapse
420 as histoid leprosy after receiving multidrug therapy (MDT); a report of three cases. Int J Lepr
421 Other Mycobact Dis. 68, 272-6.

422

423 Shetty, V. P., et al., 2005. Clinical, histopathological and bacteriological study of 52 referral
424 MB cases relapsing after MDT. *Lepr Rev.* 76, 241 – 252.
425

426 Shin, Y. C., et al., 2000. Variable numbers of TTC repeats in *Mycobacterium leprae* DNA
427 from leprosy patients and use in strain differentiation. *J Clin Microbil.* 38, 4535 – 4538.
428

429 SINAN, 2007. Sistema de Informação de Agravos de Notificação.
430

431 Sousa, A. L. O. M., et al., 2007. *Mycobacterium leprae* DNA associated with type 1 reaction
432 in single lesion paucibacillary leprosy treated with single dose rifampin, ofloxacin, and
433 minocycline. *Am J Trop Med Hyg.* 77, 829 – 833.
434

435 Talhari, S., Damasco, M. H. S., Schettini, A. P., et al., 1986. Secondary dapsone resistant
436 leprosy in Brazil: a preliminary report. *Lepr Rev.* ,57-8.
437

438 Truman, R., Fontes, A. B., De Miranda, A. B., Suffys, P. and Gillis, T., 2004. Genotypic
439 variation and stability of four variable-number tandem repeats and their suitability for
440 discriminating strains of *Mycobacterium leprae*. *J Clin Microbiol.* 42, 2558-65.
441

442 Walker, S. L. & Lockwood, D. N. J., 2006. The clinical and immunological features of
443 leprosy. *Br Med Bull.* 77 and 78, 103–121.
444

445 WHO., 2008. Global leprosy situation, beginning of 2008. 83, 293-300.
446

447 WHO., 2009. Drug resistance in leprosy: reports from selected endemic countries. **84**, 103 –
448 121. WHO.WER.n° 21, 2009. www.who.int\wer. 84, 185-196.
449
450 WHO., 1994. The leprosy unit division of control of tropical diseases. Risk of relapse in
451 leprosy. WHO/CTD/Lep/94.1.
452
453 You, E.-Y., Kang, T. J., Kim, S.-K., Lee, S.-B. & Chae, G.-T., 2005. Mutations in genes
454 related to drug resistance in *Mycobacterium leprae* isolates from leprosy patients in Korea.
455 Journal of Infection. 50, 6 – 11.
456
457 Young, D. B. & Cole, S.T., 1993. Leprosy, Tuberculosis, and the New Genetics. Journal of
458 Bacteriology. 175, 1 – 6.
459
460 Young, S. K., Taylor, G. M, Jain, S. et al., 2004. Microsatellite Mapping of *Mycobacterium*
461 *leprae* Populations in Infected Humans. Journal of Clinical Microbiology. 42, 4931 – 4936.
462
463 Young, S. K., Ponnighaus, J M., Jain, S., Lucas, S., Suneetha, S., Lockwood, D N. J., Young,
464 D. B. & Fine, P. E. M., 2008. Use of Short Tandem Repeat Sequences to Study
465 *Mycobacterium leprae* in Leprosy Patients in Malawi and India. PLoS Negl Trop Dis 2, 214
466

467 **Table 1. Patient data.**

Patient	Sex	Age	Clin. Form D	Diag Date (D)	IB	MB Treatment	Diag Date (R)	Clinic Form	IB
Regime									
A	M	51	BL	2307/1992	?	MDT/Brazil	06/11/2003	BL	5+
B	M	56	BL	1909/1988	4+	MDT/WHO	23/04/2001	LL	6+
C	M	51	LLs	1609/1987	6+	MDT/Brazil	17/01/1997	BL	4+
D	M	44	BL	27/08/1987	5+	MDT/Brazil	05/06/2000	BL	3,5+
E	M	32	BL	25/05/1988	4+	MDT/WHO	19/05/2003	LL	6+
F	F	74	LLs	17/01/1990	5+	MDT/WHO	28/01/2002	LLs	6+
G	M	59	LLs	17/01/1990	4+	MDT/WHO	04/08/1999	LLs	4+
H	M	40	LL	2003	6+	MDT	2003	LL	4+
				control	No relapse		control		

468

469 Abbreviations: BL, borderline lepromatous leprosy; LL, lepromatous leprosy; DNDS/MB 600 mg of rifampicin and 100 mg of dapsone per day during 90 days,
 470 DDS, 100 mg dapsone only per day; MDT/MB, 600 mg of rifampicina, 300 mg of clofazimine and 100mg of dapsona each month (supervised) and, 100 mg of
 471 dapsone and 50 mg of clofazimine per day, 12 or 24 mensal doses. Cases B, C and E, has changed the clinical form, case H is a control. Patients C, F and G came
 472 back with new lesion(s); the remaining relapse reactivated the old lesion. Only patient D had type 1 reaction, all the others had type 2 reaction.

473 **Table 2: genotyping data.**

Patients	Sample	Sequencing			SNP	VNTR
		<i>rpoB</i>	<i>folP1</i>	<i>gyrB</i>	<i>gyrA</i>	TTC21/GTA9/AT17/TA18
A	20216 (D)	WT	WT	WT	C	ND
	24305 (R)	WT	WT	WT	T	13/10/13/14
B	18904 (D)	WT	WT	WT	T	10/10/12/ND
	23229 (R)	WT	WT	WT	C	12/9/13/30
C	18433 (D)	WT	WT	WT	T	16/11/14/22
	21743 (R)	WT	WT	WT	C	10/10/14/ND
D	18418 (D)	WT	WT	WT	T	10/10/13/15
	22798 (R)	WT	WT	WT	C	12/12/ND/14
E	18740 (D)	WT	WT	WT	T	13/10/14/15
	24106 (R)	WT	WT	WT	T	13/10/14/ND
F	19502 (D)	WT	WT	WT	T	12/ND/11/14
	23597 (R)	WT	WT	WT	T	12/13/11/14
G	19500 (D)	WT	WT	WT	T	9/ND/13/14-15
	22477 (R)	WT	WT	WT	C	ND
H	24327 (D)	WT	WT	WT	C	ND
control	24493 (R)	WT	WT	WT	C	ND

474

475 Abbreviations: D, date of first diagnosis; R, date of relapse diagnosis; C, cytosine; T, thymidine; ND,
476 not determined.

477

Genotyping of *Mycobacterium leprae* present on Ziehl-Neelsen stained microscopic slides and in skin biopsy samples from leprosy patients in different geographic regions of Brazil

Neste trabalho amostras oriundas dos estados do Rio de Janeiro, Ceará, Pernambuco e Rondônia foram avaliadas com o objetivo de analisar a variabilidade genética de *M. leprae* de diferentes regiões do Brasil; para isso foram utilizados 16 VNTRs e 3 SNPs. Além da análise de biópsias de pele este estudo propõe a utilização de material oriundo de lâminas de baciloscopia (esfregaços dérmicos) como uma fonte alternativa para obtenção de DNA de *M. leprae*.

A metodologia empregada e os resultados obtidos estão descritos no artigo que segue e que será submetido ao “**Journal of Medical Microbiology**”.

**Genotyping of *Mycobacterium leprae* present on Ziehl-Neelsen stained microscopic slides
and in skin biopsy samples from leprosy patients in different geographic regions of
Brazil**

Amanda Nogueira Brum Fontes^a, Harrison Magdinier Gomes^a, Marcelo Ivens de Araujo^a,
Edson Cláudio Araripe de Albuquerque^b, Ida Maria Foschiani Dias Baptista^c, Maria Manuela
da Fonseca Moura^d, Denise Rezende^d, Maria Cristina Vidal Pessolani.^e, Flávio Alves Lara^e,
Norma Lucena Cavalcanti Licinio da Silva^f, Euzenir Nunes Sarno^b, Varalakshmi D. Vissa^g,
Patrick J. Brennan^g and Philip Noel Suffys^a

^a Laboratório de Biologia Molecular Aplicada a Micobactérias, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

^b Laboratório de Hanseníase, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

^c Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, São Paulo, Brazil

^d Universidade Federal de Rondônia

^e Laboratório de Microbiologia Celular, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

^f Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, Pernambuco, Brazil.

^g Department of Microbiology, Immunology and Pathology, Colorado State University, Fort Collins, Colorado, USA

ABSTRACT

Leprosy is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae* and still a health problem in Brazil. Very recently variable number tandem repeats (VNTRs) and single-nucleotide polymorphism (SNPs) have been exploited in the genome of *M. leprae* and examined as potential genotyping markers. As few data on *M. leprae* genotypes from Brazilian patients exist, we analysed 16 VNTRs and three SNPs in clinical material from 115 Ziehl-Neelsen slides and 51 skin biopsy samples, derived from 164 patients, 22 residents from the state of Rio de Janeiro (13.3%), 80 from Rondônia (48.2%), 41 from Pernambuco (24.7%) and 23 from Ceará (13.9%). All skin biopsy samples had their genotypes defined by SNPs, while 48 (94.1%) were characterized by 16 VNTRs, two (3.9%) by 15 VNTRs and a single sample (2%) by 11 VNTRs. We evaluated two different procedures for extracting *M. leprae* DNA from Z-N stained slides, one including Chelex and the second proteinase K/SDS treatment. Among the 76 samples processed using the first procedure, 23 (30.2%) were positive for 16 or 15 VNTRs and bacterial index of samples ranged from 1.75 to 5.25. Among the 39 samples processed according to second procedure, 11 (28.2%) yielded genotypes defined by either 16 or 15 VNTRs and the bacterial index of this material ranged from 0.5 to 4.5.

Overall, we found that SNP type 4 was predominant in samples from Ceará and Pernambuco while SNP type 3 was found predominantly in Rondônia and Rio de Janeiro. According to combined VNTRs and SNPs based genotypes, one identical group composed of two samples from Rondônia and seven similar groups, being four of these composed of samples from the same state or region, suggesting a tendency to form groups according to the origin of the isolates. Upon analysis of the relation between alleles defined by VNTRs and SNPs, we confirmed the association between allele combined allele copy number of loci 27-5 and 12-5 and SNP type observed earlier in RJ and SP in the other states also. In addition, 35 samples, that included biopsies and Z-N slides, were analyzed for VNTRs nature by both

direct sequencing of PCR products and PCR multiplex using fluorescent fragment length analysis (MLVA). We also observed differences in allele copy numbers as determined by direct PCR sequencing and by MLVA analysis in a part of the repeats in a considerable number of samples, differences in TA18 being predominant. In conclusion, our study strongly suggests the existence of geographic-related *M. leprae* genotypes in Brazil and showed that Z-N slides, a less invasive and easier to transport sample, is an alternative source for *M. leprae* genotyping.

INTRODUCTION

Leprosy remains a public health problem in Brazil and in 2009, the number of new leprosy cases detected was 37.610, with the northeast region alone presenting 41% of the cases and the states of Maranhão and Pernambuco having the highest rates. At the contrary, the southern region has the lowest number of new cases, Rio Grande do Sul presenting the lowest numbers (<http://portal.saude.gov.br>). The global registered prevalence of leprosy at the beginning of 2011 stood at 211,903 cases, while the number of new cases detected during to 2009 was 244,796 (<http://www.who.int/lep/en>). The disease is caused by infection with *Mycobacterium leprae* and the diagnosis based on observation of clinical symptoms, sometimes supported by bacteriologic and histopathology data. Although leprosy is one of the oldest recorded infectious diseases, little is known about the factors that influence disease transmission, evolution from exposure to infection and to active disease, and what determines the clinical outcome.

Some studies have explored the use of genotyping for differentiation of bacterial strains as a tool during epidemiologic studies and recently, multiple-locus variable number tandem repeats analysis (MLVA) of a set of micro- and mini-satellites of *M. leprae* demonstrated to be a fingerprinting procedure for differentiation to the strain level (Shin *et al.*, 2000, Grouthouse *et al.*, 2004, Truman *et al.*, 2004, Zhang *et al.*, 2005, Kimura *et al.*, 2009). In addition, single nucleotide polymorphisms (SNPs) were observed that are useful in studies to elucidate the introduction and spread of leprosy in countries and on a global level and allowed the reconstruction of the evolution and global spread of *M. leprae* (Monot *et al.*, 2005, 2009). On the other hand, VNTRs, due to their higher mutation rate, are useful for analyzing transmission patterns in the communities, to distinguish between reactivation and re-infection and to study bacterial population structure on local and global levels. This has been demonstrated during studies that determined a large panel of VNTRs in *M. leprae*

derived from patients of countries such as China (Weng *et al.*, 2007), India (Young *et al.*, 2008), Philippines (Sakamuri *et al.*, 2009), Thailand (Srisungnam *et al.*, 2009), Mexico (Matsuoka *et al.*, 2009) and Colombia (Cardona-Castro *et al.*, 2009).

Our earlier findings based on analysis of VNTRs and SNPs in samples from Brazilian patients that were mainly residents of Rio de Janeiro and São Paulo, localized in the Southeast region of the country, demonstrated a high genetic variability (Fontes *et al.*, 2009). We now present genotype that were partly obtained by the use of Ziehl-Neelsen stained slides and also skin biopsy samples from patients from other regions of the country, including Ceará, Pernambuco, Rio de Janeiro and Rondônia.

MATERIALS AND METHODS

Patients and clinical samples.

Included in this study were 51 skin biopsies from different leprosy patients that had been submitted to standardized diagnostic procedures based on the determination of the presence of skin lesions, nerve damage and microscopic analysis for the presence of acid-fast bacilli. These samples were frozen immediately after collection and stored at -20°C until DNA extraction was done. Patients were either residents of Ceará (n=23, 45.1%) or of Pernambuco (n=02, 3.9%), two states in Northeast Brazil, of Rio de Janeiro (n=8, 15.7%), Southeast Brazil and of Rondônia (n=18, 35.3%), North Brazil. Of all these patients were diagnosed as multibacillary (MB); only one case from Ceará was paucibacillary (PB). Samples had been collected between 2002 and 2009, more specific in 2002 for the two samples from Pernambuco, between 2007 and 2009 in the case of the 31 samples from Ceará (n=23) and Rio de Janeiro (n=8) and between 2007 and 2008 for the 18 patients from Rondônia.

In addition, we analysed 115 Ziehl-Neelsen slides obtained from different MB patients, residents of Pernambuco (n=39, 33.9%), Rio de Janeiro (n=14, 12.2%) and Rondônia (n=62, 53.9%). Slides were prepared at different periods: in the case of Rondônia in 2001 (n=1), 2005 (n=6), 2006 (n=7), 2007 (n=30) and 2008 (n=15); three samples had no information about time of preparation. Samples from Rio de Janeiro were collected in 2008 (n=10) and 2009 (n=4) while samples from Pernambuco were collected in 2004 (n=1), 2007 (n=6) and 2008 (n=32). The slides had been stored at room temperature without permitting contact.

The Bacterial Index (BI) of the Z-N slides ranged between 1.75 and 5.25 in material from Rondônia, between 2.0 and 4.75 in Rio de Janeiro and between 0.5 to 4.5 for Pernambuco. Leprosy disease subtype classification of the patients is shown in Table 1.

Both Z-N slides and skin biopsies samples of two patients were analyzed in order to compare the genotypes obtained. Patient one had a skin biopsy (POC 3792) and Z-N slide (L16) collected in 2007; the skin biopsy of patient two (POC3821) and Z-N slide (L30) were collected in 2008.

Nucleic acid extraction

Skin biopsies were processed using the DNeasy Blood & Tissue Kit, (Qiagen Inc. Valencia, CA), following the manufacturer's recommendations. Two different protocols for extraction of nucleic acids from material present on Z-N slides were used. Samples from Rondônia and Rio de Janeiro were treated as described by van der Zanden *et al.* (1998), in brief, consisting of the application of 25 ul of distilled water on each of the three fixed and stained AFB containing tissue sites of the glass slides, removal of the fixed material from the glass surface by scraping with a clean microscopic slide and collecting in a single microcentrifuge tube. The sample was mixed with a same volume of 15% Chelex-100 (Sigma-Aldrich) in water, incubated for 30 min at 97°C, centrifuged at 14.462 xg for 10 min, the supernatant transferred to another microcentrifuge tube and stored at -20°C. The Z-N slides from Pernambuco were processed according to Kamble *et al.* (2010), and in brief, consisted of adding 150 ul of lysis buffer (1mg/ml proteinase K and 0.05% Tween 20) on the single tissue smear present on these slides, followed by scraping and collection as described above. After incubation at 60°C overnight, 30 ul of 10% SDS was added, followed by one hour incubation at 60°C and 15 min at 94°C. After centrifugation, the supernatant was transferred and ethanol added to a final concentration of 70%, inducing precipitation of nucleic acids by incubation at -20°C. The supernatant was discarded and the pellet was washed again with ethanol. The pellet was air dried and re-suspend in 30 ul of water.

PCR and sequencing.

At first stage, 35 DNA extracts from Rondônia patients, 18 from skin biopsies and 17 from Z-N slides, were submitted to PCR and direct sequencing of the loci TTC21, TA18, AT17 and GTA9, as described by Truman *et al.* (2004). The PCR reactions were performed in a 50 ul sample composed of 25ul of *HotStarTaq Master Mix* (QIAGEN) and 0.5uM of each primer. The mix contained 2.5 units of *HotStarTaq* DNA polymerase, 200 uM of each dNTP, buffer and 2 to 5 ul of *M. leprae* DNA extract. After denaturing the DNA at 94 °C for 15 min, PCR was carried out in a thermocycler (Veriti 96 Well Thermal Cycler, Applied Biosystems), by submitting samples to 35 cycles consisting of 94°C for 30 sec, 60°C for 30 sec and 72°C for 30 sec, with a final extension at 72°C for 10 min. For evaluation of PCR yield, gel electrophoresis was performed using five ul of the PCR product and amplicons were purified on Qiaquick Spin Columns (Qiagen Inc.), followed by sequencing using the ABI PRISM BigDye Terminator v 3.0 sequencing kit (Applied Biosystems) and analysis on ABI Prism 3730 automated DNA sequencer (Applied Biosystems). Sequencing was performed of both DNA strands using forward and reverse primers and sequences analysed using the *MEGA* software (Version 4.0) (Tamura *et al.*, 2007).

Genotyping by MLVA analysis

A selection of 91 DNA extracts (prepared from 51 skin biopsies and 40 Z-N slides) were submitted to genotyping by MLVA analysis of 16 VNTRs, as described by Kimura *et al.* (2009). In brief, for each sample, four multiplex PCR reactions were performed that generated 16 amplicons. Allele copy number was determined by denaturation of amplicons and capillary gel electrophoresis on the sequencer ABI 3130 Genetic Analyzer, using the

internal molecular weight sizing standards (LIZ 500) and copy number definition with the Peak Scanner software (Applied Biosystems).

Single Nucleotide Polymorphism genotype analysis

For differentiation of SNP types, we used a procedure that combined PCR-RFLP and direct sequencing, as described by Sakamuri *et al.* (2009). In brief, differentiation of types 1/2 from 3/4 was obtained by submitting to PCR-RFLP analysis the locus including the SNP at nucleotide position 2,935,685, through incubation at 60°C for 1 hr of 5µl of PCR product with 5 units of *Bst*UI (New England Biolabs, Beverly, MA). Digestion indicates genotype 3 or 4 while no digestion means the presence of genotype 1 or 2. For further differentiation of genotypes 3 and 4, restriction enzyme analysis of the PCR product that includes the SNP at nucleotide position 14,676, achieved by incubating 5 ul of PCR product with 5 U of *Sml*I for one hour at 50°C; digestion indicates SNP type 4 while lack of digestion is typical for type 3. Finally, alleles containing either SNP type 1 or 2 were determined by sequencing as described by Monot *et al.* (2005).

Phylogenetic analysis

For phylogenetic analysis, we selected genotypes obtained from 78 of the 91 samples, excluding 13 that lacked allele definition of one or more VNTR loci or of SNP (Tables 2, 3A and 3B). Genotype similarity was determined using the program Bionumerics (Version 6.5, Applied Maths, Belgium), by construction of a similarity matrix using the Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) and the Dice similarity coefficient.

RESULTS

Genotyping results using skin biopsy samples

The 51 biopsy samples were submitted to genotyping, using both the 16 VNTR MLVA procedure and SNP analysis. All samples (100%) could be defined for SNP type, while 48 (94.1%) were characterized by 16 VNTRs, two (3.9%) by 15 VNTRs and a single sample (2%) by 11 VNTRs. Samples genotyped only for 15 VNTRs were from Ceará and Rondônia and the analysis failed for the VNTRs 18-8 and AT15, respectively. The sample genotyped for 11 VNTRs were from Ceará and belonged to a paucibacillary patient and in this case the VNTRs 21-3, AC9, AT15, TA10 and 12-5 were not defined (Table 2).

Comparison DNA extraction procedures and genotyping on Ziehl Neelsen slides

Among the 76 samples processed using the procedure described by van der Zanden *et al.* (1998), 25 were positive for any of the genetic markers; including 23 (30.3%) where we could define copy number for 16 (n=20) or 15 (n=03) VNTRs, an two more (2.6%) that could be genotyped for eight or nine VNTRs (Table 3A). The rest did not generate any VNTR copy number (data not shown). Although a limited number of samples generated partial results, we did not observe VNTR-associated genotyping failure.

When analyzing the possible relation between genotyping yield and date of Z-N slide preparation, we observed that none of the 14 Z-N slides from Rondônia patients submitted to the first evaluation of four STRs copy number (one case diagnosed in 2001, six in 2005 and seven in 2006), yielded PCR products. However, slides that had been prepared from patients diagnosed in 2007, 2008 or 2009 yielded positive PCRs and could be further genotyped for 16

or 15 VNTRs, yearwise being positive respectively in 10 (33.3%), 11 (44%) and two (50%) of the cases, therefore showing a slight increase in efficiency of genotyping yield .

Samples that could be characterized for copy number of at least eight VNTRs (n=25), had also their genotypes defined by the composition of the three SNPs examined; 24 of these (96%) had their SNP-based genotypes defined (Table 3A).

The bacterial index of samples genotyped by VNTRs and SNPs ranged from 1.75 to 5.25 but we could not observe a relation between genotyping yield and BI (data not shown).

Among the 39 samples processed according to Kamble *et al.* (2010), 11 (28.2%) yielded genotypes defined by either 16 or 15 VNTRs, while four samples (10.3%) rendered genotypes with 10, 12 or 13 VNTRs (Table 3B). When considering positivity among samples collected from patients diagnosed more recently, namely in 2007 and 2008, the genotyping yield was again much higher, presenting genotypes defined by 16 or 15 VNTRs in the case of respectively four (80%) and seven (70%) of the samples. Samples with genotypes defined by at least 10 VNTRs (n=15) were examined by SNP and 13 (86.6%) yielded SNP-related genotypes. The bacterial index of samples genotyped ranged from 0.75 to 4.5 but no apparent relation between BI and genotyping yield was observed (data not shown).

Comparison of genotyping using sequencing and MLVA

As a first approach, we performed copy number analysis of four STRs (TTC21, TA18, AT17 and GTA9) by direct PCR sequencing of 35 samples composed of 18 biopsy samples and 17 Z-N slides, from patients that were residents in Rondônia. After adopting the MLVA procedure for genotyping these four markers, the same material was analyzed using this approach and we observed a discrepancy between genotype yields obtained by both methods (Table 4). All samples yielded genotypes defined by the four STRs in the case of MLVA

analysis while the sequencing approach could not generate complete genotypes for three samples: one Z-N sample lacking both AT17 and TA18, another Z-N slide missing AT17 and from a skin biopsy, we could not determine TA18.

When comparing the genotypes obtained by both typing procedures, we observed that only six samples (17.1%) presented identical results (Table 4), the other 29 presented divergence in STR copy number for one locus (n=19), six samples for two STRs and a single sample in three STRs; three samples were not considered because they lacked one or two STRs. When comparing divergence between procedure outcome among the individual STRs, TA18 presented differences most frequently, observed in 21 samples (10 BP and 11ZN), showing variations of either a single copy (n = 5, 22.7%) or of two (n = 4, 18.2%), three (n=3, 13.6%), four (n=5, 22.7%), five (n=1, 4.5%), seven (n=2, 1.9%) and ten (n=1, 4.5%) copies. The VNTR GTA9 showed divergent results in six samples (3BP and 3ZN) but in all cases, only a single copy difference was observed. The STR AT17 showed discordant results in five samples (2BP and 3ZN) and the divergence observed was either a single copy (n=3, 60%), or two (n=1, 20%) or three (n=1, 20%) copies. Finally, the STR TTC21 had copy number variations of either a single copy (n=1, 25%) or three (n=1, 25%), four (n=1, 25%) or five (n=1, 25%) copies for four samples (all Z-N).

Frequency of genotypes defined by SNP

We are able to get conclusive results regarding SNP genotype in 89 (97.8%) of 91 samples, derived from 89 patients. Two Z-N slides-derived samples (2.2%), one from Rio de Janeiro and another from Pernambuco could not be characterized due to failure to generate sufficient PCR product. To determine the frequency of *M. leprae* genotypes according to SNP, samples from the same patient were considered just once (n=2), since the pairs of samples had the same genotype in both clinical specimens analyzed (n=87). In our study

population, SNP type 4 was predominant (n=46, 52.9%) and was observed in 14 patients (42.4%) from Rondônia, 18 patients (78.3%) from Ceará, 10 patients (58.8%) from Pernambuco and four patients (25%) from Rio de Janeiro. The SNP type 3 was found in 37 patients (42.5%), including 17 patients (51.5%) from Rondônia, four (17.4%) from Ceará, five (29.41%) from Pernambuco and 11 patients (68.8%) from Rio de Janeiro. Finally, the less frequent SNP type 1 was detected in four cases (4.6%), being two (6.1%) from Rondônia and one case each from Ceará (4.3%) and from Pernambuco (5.9%).

Genotypes as defined by analysis of 16 VNTRs and SNPs

All VNTRs used in this analysis were polymorphic (Tables 2, 3A and 3B). Upon analysis of the discriminatory power of the different VNTRs, the lowest allelic diversity was observed for locus 21-3 (0.067), presenting two different alleles that ranged in copy number between one and two copies, the latter allele being the most frequent type (n=85, 96.5%). The highest allelic diversity was observed in locus AT15 (0.94), presenting 22 different alleles ranging from seven to 32 copies; the allele with 15 copies being the most frequent type (n=12, 14%).

Upon analysis of the relation between alleles defined by VNTRs and SNPs, we observed a correlation of the allele nature defined by loci 27-5 and 12-5 and SNP type: 41 (87.2%) of the samples with the SNP type 4 presented the 5:4 copy number allele combination of VNTRs 27-5 and 12-5, while these VNTRs presented a combined 4:5 copy number in 24 cases (64.9%) of SNP type 3.

Among the two patients from that had both biopsy and Z-N slides available for genotyping, we observed variation difference in copy number of three loci in both cases. In the first case (POC3792/L16), only 15 VNTRs were used for comparison because the allele

definition of AC8b failed for the ZN sample and a five copy difference was observed in TTC21, four in TA18 and one copy in AC9; the other 12 loci were identical between the samples. The second case (POC3821/L30) presented a three copy difference at AT15, two copies at TTC21 and one copy at TA17; the other 13 loci were identical. Identical SNP types were observed in both samples of each patient.

Genotype clustering and phylogeny

Initially, we constructed an UPGMA-based dendrogram using 78 of the 91 samples, excluding 13 that lacked allele definition of one or more VNTR locus and attached SNP types (Figure 1). We observed a single cluster composed of genotypes from isolates from two patients, residents of Rondônia. Interestingly, one sample was a skin biopsy while the second was from Z-N slide, confirming the possibility to use Z-N slides for cluster definition.

When excluding the four highly polymorphic AT repeats for definition of genotypes, seven more clusters were defined, one composed of four samples and the rest of two samples. In addition, three clusters were formed by isolates derived from the same state (one from Rio de Janeiro and two from Rondônia), one from the Northeast region (Pernambuco and Ceará) and three containing isolates from Rondônia and Ceará (data not shown). Upon relating sample type and clusters, we observed that five groups were composed of Z-N slides and skin biopsy, while two were composed only of skin biopsy samples. In addition, all but one of the groups was composed of isolates with the same SNP genotype; the exception included two samples from Rio de Janeiro presenting SNP type 3 and 4.

To visualize the genetic relation between the 78 isolates that had complete genotypes, we constructed a Minimum Spanning Tree (MST) based on the 16 VNTRs (figures 2A and 2B). The MST segregated isolates in two major branches (figure 2A), showing that isolates from Ceará had genotypes that were more related to those of isolates from Pernambuco, while

genotypes from samples from Rio de Janeiro were more similar to those of Rondônia. The latter state presented genotypes that were similarly distributed in both branches of the tree, probably partly due to larger sample number but suggesting also higher genetic diversity than that of isolates from other regions. Interestingly, the only cluster was composed by genotypes from isolates from residents of Rondônia and was the central interactive node between both branches of the phylogenetic tree.

We also analysed the relation between VNTR- and SNP-based genotypes, and as demonstrated in Figure 2B, there is a strong correlation between the positioning of both kind of genotypes within the MST.

DISCUSSION

Only about ten years ago, the first reliable data were published on genomic variation between isolates of *M. leprae* (Shin *et al.* 2000); since then however, several polymorphic sequences such as VNTRs and SNPs have been reported and evaluated in material from leprosy patients residing different regions around the world (Weng *et al.*, 2007, Young *et al.*, 2008, Cardona-Castro *et al.*, 2009, Matsuoka *et al.*, 2009, Sakamuri *et al.*, 2009, Srisungnam *et al.*, 2009). Our earlier data demonstrated the high genetic variability among isolates of *M. leprae* present in skin biopsies from patients, residents mainly in Rio de Janeiro and São Paulo, by characterization of genotypes as defined by analysis of three SNPs and 16 VNTRs (Fontes *et al.*, 2009). In these 89 randomly selected cases, we observed 80 different genotypes, showing that these particular genetic elements behave in a way that fulfills the first rule for being adequate as genotyping markers: presenting almost complete differentiating power in a population of unrelated patients. However, because the states of São Paulo and Rio de Janeiro are both located in Southeast Brazil, a region that covers only a limited area of the country (10.85% of Brazilian territory) and with different epidemiologic disease characteristics from the rest of the country, we investigated genotypes from patients that are residents of two additional geographic regions, namely the north and northeast part of the country.

Confection of Z-N slides is part of the diagnostic procedure of leprosy in many health centers of Brazil and because collection of skin biopsies, being generally the source of material for genotyping of *M. leprae* is an invasive procedure, we also evaluated the usefulness of Z-N slides as a source for genotyping of the parasite. Two procedures of DNA extraction were used, the first described for genotyping of *M. tuberculosis* present on Z-N slides prepared from sputum samples of TB patients (van der Zanden *et al.*, 1998), the second, having been reported recently for extraction of *M. leprae* DNA from Z-N slides considered

negative as an alternative for leprosy diagnosis, in this approach the rate of detection was 32.6% (n=15) of all samples analyzed. When comparing genotyping efficiency obtained with either of the extraction procedures, both scored equally (28-30%). In addition, an inverse relation between time of storage of slides and genotype quality was observed while direct relation of the latter was observed with the bacterial index (Tables 3A and 3B); nonetheless, complete *M. leprae* genotypes were sometimes obtained in material with low BI (Tables 3A and 3B), our data strongly suggest that Z-N slides can be an additional source for DNA fingerprinting of *M. leprae*. More studies are needed however to better determine the effect of long-term storage of slides on genotyping and of the possibility to use archived slides for this purpose.

The presently used genotyping procedure based on evaluation of the copy number of 16 VNTRs, presented 90 unique genotypes from 89 patients, due to observation of different genotypes in the two samples available from two cases and identical patterns in isolates from two residents of Rondônia. The latter observation suggests that region associated genotype similarity is occurring and in agreement with the observation of cluster formation when decreasing stringency for genotype similarity, in this case, by excluding AT repeats from the analysis. Unfortunately, we did not have access to epidemiologic data of the patient population to solidify this association.

From two patients from Rondônia, *M. leprae* genotypes could be determined from material derived both from skin biopsy and from lymph sample fixed on a Z-N slide. Interestingly, we observed genotype differences as defined by difference in copy number of three VNTRs, in both cases the variation was observed in dinucleotides as AC9 and/or AT and in the trinucleotide TTC21. Similar results were also observed when a study was conducted in order to investigate the intra-patient VNTR profiles, using slit skin smears from different anatomical sites and biopsy specimen from one of the lesions; in that study, the patterns were mostly similar in the minisatellites, while variations were observed in the more

variable and stutter prone microsatellite like AT17 and TTC21 (Sakamuri *et al.*, 2009). Hypervariability of AT repeats was also observed in a study that is underway to define risk factors for leprosy in the city of Fortaleza (data not shown here). Taking together these results strongly suggest that mismatches in the more variable microsatellite between different clinical specimens from the same individual demand a particular interpretation and does not necessarily mean a change in genotype of the bacteria.

Our earlier study demonstrated that SNP type 3 was the most frequent among *M. leprae* isolates in the Southeast region of Brazil (Fontes *et al.*, 2009) and it was postulated by Monot *et al.* (2005), that this SNP type occurs predominantly in Europe, North Africa and Americas. Besides confirming the predominance of SNP type 3 in the State of Rio de Janeiro, our present study also demonstrated high prevalence of this genotype in the State of Rondônia, while the SNP 4 type was predominant in Ceará and Pernambuco, two bordering states in Northeast Brazil. Isolates with the latter SNP type were detected so far only in Africa, the French West Indies, Brazil (Monot *et al.*, 2005), México (Matsuoka *et al.*, 2009), as well as in Japanese Brazilians, probably after having been infected in Brazil (Weng *et al.* 2007) and the origin of SNP-type 4 isolates in Latin American countries was assumed to be in Africa, suggesting that leprosy was carried by slave trade as proposed previously (Monot *et al.*, 2005). The frequencies of SNP type 1, 3 and 4 are according to those expected from ethnic involvement during Brazilian colonization as presented by Monot (2005), lack of the SNP2 in Brazil was confirmed also in the present study covering more regions of the country and we present region associated genotype distribution on a MST (Figure 2B).

In an earlier study, we reported a strong association between the combination of allele types of STR loci 27-5 and 12-5 and the SNP defined genotype, observing a 4/5 copy number combination in 87.5% of isolates with SNP genotype 3 and the 5/4 copy number combination in 85.7% of isolates with SNP type 4 (Fontes *et al.*, 2009). A similar finding was reported in *M. leprae* samples from Colombia (Cardona-Castro *et al.*, 2009). Associations between

different markers such as SNPs and VNTRs have also been detected in *M. tuberculosis* (Filliol *et al.*, 2006). Our present data demonstrated that this association was less pronounced for SNP type 3 when analyzing patients from more regions, now occurring in 64.9% (n=24) of these genotypes, while the strong association of SNP type 4 with the 5/4 combined STR allele type (87.2%, n=41) of the samples. The relation of these different combinations of STR allele types and SNP is demonstrated by means of the MST (Figure 2B).

During the elaboration of our study, two different technical procedures were used in samples from 33 patients, including here two samples from two different patients, for definition of the copy number of a set of four STRs (AT18, TA17, TTC21 and GTA9), one by direct sequence analysis of PCR products that contained these markers and the other by defining the size of PCR products as part of the MLVA procedure for characterization of 16 markers. This allowed us to compare accuracy of both procedures and observed that sequencing, besides being laborious, expensive and generating data that are not easy to interpret (due to unidentified exact end points of repeats of concern); MLVA is faster, easier to perform and generates more reliable results for strain typing of *M. leprae*. Similar results were also observed when both techniques were compared in studies conducted in Philippines (Sakmuri *et al.*, 2009) and Thailand (Srisungnam *et al.* 2009), demonstrating interferences with dye blobs and complications from mixed signals, stutter or unidentifiable exact end points of repeats with dinucleotide and TTC repeats; MLVA was reported to be more facile for multilocus VNTR analysis (MLVA).

In conclusion, our study strongly suggests the existence of geographic-related *M. leprae* genotypes in Brazil and demonstrates that Z-N slides are an alternative sample for genotyping of *M. leprae*.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are greatly indebted to the Genomic Platform for DNA Sequencing (PDTIS-Fiocruz). These studies were funded by CAPES, NIH, NIAID grants AI-047197, AI-063457, and Contract NO1-AI-25469, by the Heiser Program for Research on Leprosy and Tuberculosis of the New York Community Trust through IDEAL – Initiative for Diagnostic and Epidemiological Assays for Leprosy, by the CNPq (401283/2005-4) and the Damien Foundation (ILEP).

REFERENCES

- 1) Beard, C.B., Carter, J.L., Keely, S.P., Huang, L., Pieniazek, N.J., Moura, I.N., Roberts, J.M., Hightower, A.W., Bens, M.S., Freeman, A.R., Lee, S., Stringer, J.R., Duchin, J.S., del Rio, C., Rimland, D., Baughman, R.P., Levy, D.A., Dietz, V.J., Simon, P., Navin, T.R. 2000. Genetic variation in *Pneumocystis carinii* isolates from different geographic regions: implications for transmission. *Emerg Infect Dis.* 6(3):265-72.
- 2) Bisht, R., Hoti, S.L., Thangadurai, R., Das, P.K. 2006. Isolation of *Wuchereria bancrofti* microfilariae from archived stained blood slides for use in genetic studies and amplification of parasite and endosymbiont genes. *Acta Trop.* 99(1):1-5.
- 3) Cardona-Castro, N., Beltrán-Alzate, J.C., Romero-Montoya, I.M., Meléndez, E., Torres, F., Sakamuri, R.M., Li, W., Vissa, V. 2009. Identification and comparison of *Mycobacterium leprae* genotypes in two geographical regions of Colombia. *Lepr. Rev.* 80(3):316-21.
- 4) Filliol I., Motiwala, A.S., Cavatore, M., Qi, W., Hazbón, M.H., Bobadilla del Valle, M., Fyfe, J., García-García, L., Rastogi, N., Sola, C., Zozio, T., Guerrero, M.I., León, C.I., Crabtree, J., Angiuoli, S., Eisenach, K.D., Durmaz, R., Joloba, M.L., Rendón, A., Sifuentes-Osornio, J., Ponce de León, A., Cave, M.D., Fleischmann, R., Whittam, T.S., Alland, D. 2006. Global phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* based on single nucleotide polymorphism (SNP) analysis: insights into tuberculosis evolution, phylogenetic accuracy of other DNA fingerprinting systems, and recommendations for a minimal standard SNP set. *J. Bacteriol.* 188: 759-772.
- 5) Fontes, A.N., Sakamuri, R.M., Baptista, I.M., Ura, S., Moraes, M.O., Martínez, A.N., Sarno, E.N., Brennan, P.J., Vissa, V.D., Suffys, P.N. 2009. Genetic diversity of *Mycobacterium leprae* isolates from Brazilian leprosy patients. *Lepr. Rev.* 80(3):302-15.

- 6) Groathouse, N.A., Rivoire, B., Kim, H., Lee, H., Cho, S.N., Brennan, P.J., Vissa, V.D. 2004. Multiple polymorphic loci for molecular typing of strains of *Mycobacterium leprae*. *J. Clin. Microbiol.* 42(4):1666-72.
- 7) <http://portal.saude.gov.br>. Access date: January/2011.
- 8) <http://www.who.int/lep/en>. Access date: January/2011.
- 9) Kamble, R.R., Shinde, V.S., Madhale, S.P., Kamble, A.A., Ravikumar, B.P., Jadhav, R.S. 2010. Extraction and detection of *Mycobacterium leprae* DNA from ZNCF-stained skin smear slides for better identification of negative skin smears. *Indian J. Med. Microbiol.* 28(1):57-9.
- 10) Keim, P., Price, L.B., Klevytska, A.M., Smith, K.L., Schupp, J.M., Olinaka, R., Jackson, P.J., Hugh-Jones, M.E. 2000. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* 182 (10): 2928-36.
- 11) Kimura, M., Sakamuri, R.M., Groathouse, N.A., Rivoire, B.L., Gingrich, D., Krueger-Koplin, S., Cho, S.N., Brennan, P.J., Vissa, V. 2009. Rapid variable-number tandem-repeat genotyping for *Mycobacterium leprae* clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 47(6):1757-66.
- 12) Klevytska, A.M., Price, L.B., Schupp, J.M., Worsham, P.L., Wong, J., Keim, P. 2001. Identification and characterization of variable-number tandem repeats in the *Yersinia pestis* genome. *J. Clin. Microbiol.* 39(9):3179-85.

- 13) Latouche, S., Ortona, E., Mazars, E., Margutti, P., Siracusano, A., Tamburrini, E., Guyot, K., Nigou, M., Roux, P. 1996. Biodiversity of French and Italian human *Pneumocystis carinii*. *J Eukaryot Microbiol.* 43(5):54S-55S.
- 14) Matsuoka, M., Roa, R.I., Budiawan, T., Kyaw, K., Chae, G.T. 2006. Genotypic analysis of *Mycobacterium leprae* isolates from Japan and other Asian countries reveals a global transmission pattern of leprosy. *FEMS Microbiol. Lett.* 261(1):150-4.
- 15) Matsuoka, M., Gonzalez, A.V., Estrada, I., Carreño-Martinez, C., Fafutis-Morris, M. 2009. Various genotypes of *Mycobacterium leprae* from Mexico reveal distinct geographic distribution. *Lepr Rev.* 80(3):322-6.
- 16) Monot, M., Honoré, N., Garnier, T., Araoz, R., Coppée, J.Y., Lacroix, C., Sow, S., Spencer, J.S., Truman, R.W., Williams, D.L., Gelber, R., Virmond, M., Flageul, B., Cho, S.N., Ji, B., Paniz-Mondolfi, A., Convit, J., Young, S., Fine, P.E., Rasolofo, V., Brennan, P.J., Cole, S.T. 2005. On the origin of leprosy. *Science* 308(5724):1040-2.
- 17) Monot, M., Honoré, N., Garnier, T., Zidane, N., Sherafi, D., Paniz-Mondolfi, A., Matsuoka, M., Taylor, G.M., Donoghue, H.D., Bouwman, A., Mays, S., Watson, C., Lockwood, D., Khamesipour, A., Dowlati, Y., Jianping, S., Rea, T.H., Vera-Cabrera, L., Stefani, M.M., Banu, S., Macdonald, M., Sapkota, B.R., Spencer, J.S., Thomas, J., Harshman, K., Singh, P., Busso, P., Gattiker, A., Rougemont, J., Brennan, P.J., Cole, S.T. 2009. Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. *Nat. Genet.* 41(12):1282-9.

- 18) Otto, T.D.; Vasconcellos, E.A.; Gomes, L.H.F.; Moreira, A.S.; Degraeve, W.M.; Mendonça-Lima, L. and Alves-Ferreira, M. (2008) ChromaPipe: a pipeline for analysis, quality control and management for a DNA sequencing facility. *Genet. Mol. Res.* 7(3):861-871.
- 19) Sakamuri, R.M., Kimura, M., Li, W., Kim, H.C., Lee, H., Kiran, M.D., Black, W.C. 4th, Balagon, M., Gelber, R., Cho, S.N., Brennan, P.J., Vissa, V. 2009. Population-based molecular epidemiology of leprosy in Cebu, Philippines. *J. Clin. Microbiol.* 47(9):2844-54.
- 20) Sakamuri, R.M., Harrison, J., Gelber, R., Saunderson, P., Brennan, P.J., Balagon, M., Vissa, V. 2009. A continuation: study and characterisation of *Mycobacterium leprae* short tandem repeat genotypes and transmission of leprosy in Cebu, Philippines. *Lepr. Rev.* 80(3):272-9.
- 21) Shin, Y.C., Lee, H., Lee, H., Walsh, G.P., Kim, J.D., Cho, S.N. 2000. Variable numbers of TTC repeats in *Mycobacterium leprae* DNA from leprosy patients and use in strain differentiation. *J. Clin. Microbiol.* 38(12):4535-8.
- 22) Shinde, V., Newton, H., Sakamuri, R.M., Reddy, V., Jain, S., Joseph, A., Gillis, T., Nath, I., Norman, G., Vissa, V. 2009. VNTR typing of *Mycobacterium leprae* in South Indian leprosy patients. *Lepr. Rev.* 80(3):290-301.
- 23) Srisungnam, S., Rudeeaneksin, J., Lukebua, A., Wattanapokayakit, S., Pasadorn, S., Mahotarn, K., Ajincholapan, Sakamuri, R.M., Kimura, M., Brennan, P.J., Phetsuksiri, B., Vissa, V. 2009. Molecular epidemiology of leprosy based on VNTR typing in Thailand. *Lepr. Rev.* 80(3):280-9.

- 24) Supply, P., Mazars, E., Lesjean, S., Vincent, V., Gicquel, B., Locht, C. 2000. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol. Microbiol.* 36(3):762-71.
- 25) Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24(8):1596-9.
- 26) Truman, R., Fontes, A.B., De Miranda, A.B., Suffys, P., Gillis, T. 2004. Genotypic variation and stability of four variable-number tandem repeats and their suitability for discriminating strains of *Mycobacterium leprae*. *J. Clin. Microbiol.* 42(6):2558-65.
- 27) van der Zanden, A.G., Hoentjen, A.H., Heilmann, F.G., Weltevreden, E.F., Schouls, L.M., van Embden, J.D. 1998. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex in paraffin wax embedded tissues and in stained microscopic preparations. *Mol. Pathol.* 51(4):209-14.
- 28) van der Zanden, A.G., Te Koppele-Vije, E.M., Vijaya Bhanu, N., Van Soolingen, D., Schouls, L.M. 2003. Use of DNA extracts from Ziehl-Neelsen-stained slides for molecular detection of rifampin resistance and spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 41(3):1101-8.
- 29) Walsh, P.S., Metzger, D.A., Higuchi, R., 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechnique.* 10(4):506-13.
- 30) Weng, X., Wang, Z., Liu, J., Kimura, M., Black, W.C. 4th, Brennan, P.J., Li, H., Vissa, V.D. 2007. Identification and distribution of *Mycobacterium leprae* genotypes in a region of

high leprosy prevalence in China: a 3-year molecular epidemiological study *J. Clin. Microbiol.* 45(6):1728-34.

31) Young SK, Taylor GM, Jain S, Suneetha LM, Suneetha S, Lockwood DN, Young DB. 2004. Microsatellite mapping of *Mycobacterium leprae* populations in infected humans. *J. Clin. Microbiol.* 42(11):4931-6.

32) Young, S.K., Ponnighaus, J.M., Jain, S., Lucas, S., Suneetha, S., Lockwood, D.N., Young, D.B., Fine, P.E. 2008. Use of short tandem repeat sequences to study *Mycobacterium leprae* in leprosy patients in Malawi and India. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* 2(4):e214.

33) Zhang, L., Budiawan, T., Matsuoka, M., 2005. Diversity of potential short tandem repeats in *Mycobacterium leprae* and application for molecular typing – *J. Clin. Microbiol.* 43(10):5221-9.

Table 1: Leprosy subtypes of skin biopsy and ZN slides samples analyzed

State	Material	LL	B	BL	BT	TT	NA	Total
RO	SB	07	09	01	NI	NI	01	18
	ZN	27	31	NI	NI	01	03	62
PE	SB	02	NI	NI	NI	NI	NI	02
	ZN	21	18	NI	NI	NI	NI	39
RJ	SB	07	NI	01	NI	NI	NI	08
	ZN	10	NI	03	NI	NI	01	14
CE	SB	09	NI	11	01	NI	02	23
Total		83	58	16	01	01	07	166

RO: Rondônia; PE: Pernambuco; RJ: Rio de Janeiro; CE: Ceará; SB: skin biopsy; ZN: Ziehl Neelsen slide; LL: lepromatous leprosy; B: borderline leprosy without specification of the subtypes; BL: borderline lepromatous leprosy; BT: borderline tuberculoid leprosy and TT: tuberculoid leprosy; NI: no information on disease classification.

Table 2: Genotyped defined using skin biopsy samples

Sample	Year	Diagnosis	Origin	AC8b	GTA9	GGT5	AT17	21-3	AC9	AT15	AC8a	27-5	6-7	TA18	TTC21	TA10	23-3	12-5	18-8	SNP
0301001	2008	BL	CE	7	9	4	14	2	8	14	9	5	6	16	12	9	2	4	3	4
0301004	2008	LL	CE	7	10	4	12	2	8	15	8	5	6	21	12	8	2	4	3	4
0301005	2008	BL	CE	7	9	4	12	2	8	21	9	5	6	20	12	8	2	4	3	4
0301006	2008	LL	CE	7	15	4	15	2	6	11	8	5	6	14	12	8	2	4	3	4
0301007	2008	LL	CE	7	10	4	17	2	7	19	8	5	6	30	15	8	2	4	3	4
0301008	2008	BL	CE	7	9	4	11	2	7	21	9	5	7	25	10	8	2	4	3	4
0301009	2008	NA	CE	7	9	4	12	2	8	14	8	5	6	21	13	8	2	4	3	4
0301010	2008	BL	CE	7	10	4	18	2	7	26	8	5	7	25	14	8	2	4	ND	3
0301011	2008	BL	CE	7	12	4	14	2	7	13	9	5	6	16	12	8	2	4	3	4
0301013	2008	NA	CE	7	10	4	17	2	7	28	8	5	6	26	17	8	2	4	3	4
0301014	2008	LL	CE	7	10	4	18	2	7	25	8	5	7	16	14	8	2	4	3	1
0301015	2008	LL	CE	7	11	4	16	2	8	11	9	5	6	13	11	10	1	4	8	3
0301016	2008	LL	CE	8	9	4	13	2	7	23	8	5	6	26	19	8	2	4	3	4
0301018	2008	BL	CE	7	10	4	13	2	8	12	8	5	6	22	11	8	2	4	3	4
0301019	2008	BL	CE	7	10	4	14	2	9	15	9	5	6	21	10	13	2	4	3	4
0301020	2008	BL	CE	8	10	4	15	2	7	11	8	5	6	20	17	8	2	4	3	4
0301021	2008	BL	CE	7	11	4	13	2	8	24	9	4	6	17	10	10	2	5	8	3
0301022	2008	LL	CE	7	9	4	10	2	7	15	9	5	6	17	15	8	2	4	3	4
0301024	2008	LL	CE	8	10	4	15	2	7	15	8	5	6	14	14	8	2	4	3	4
0301027	2008	BL	CE	7	9	4	13	2	10	18	9	5	6	25	12	8	2	4	3	4
0301028	2008	BL	CE	7	9	4	13	2	8	19	9	5	6	16	12	8	2	4	8	4
0302024	2008	BT	CE	7	9	3	13	ND	ND	ND	9	5	6	26	10	ND	2	ND	8	3
0301030	2009	LL	CE	7	8	4	11	2	8	12	9	5	6	16	13	8	2	4	3	4
Idemar	2002	LL	PE	7	15	4	12	2	8	14	8	4	7	15	10	10	2	5	8	3
Eraldo	2002	LL	PE	8	7	4	18	2	7	20	8	5	6	18	15	8	2	4	3	4
0101005	2007	BL	RJ	7	10	4	12	2	8	20	9	4	6	19	10	11	2	6	8	3
0101006	2007	LL	RJ	7	11	4	16	2	8	18	9	4	7	20	14	9	2	5	8	3
0101007	2007	LL	RJ	7	10	4	12	2	8	17	9	4	6	18	12	9	2	6	8	3
0101009	2007	LL	RJ	8	11	4	19	2	7	19	8	5	7	19	10	8	2	4	3	4
F 18/03	2009	LL	RJ	7	8	4	13	2	8	14	9	4	7	15	11	11	2	5	8	3
F 19/03	2009	LL	RJ	7	10	4	14	2	8	23	10	4	7	18	12	9	2	5	8	3
F 05/05	2009	LL	RJ	7	12	4	12	2	8	21	9	4	7	25	10	10	2	5	9	3
F 11/05	2009	LL	RJ	7	10	4	11	2	8	19	9	5	6	21	14	8	2	4	3	4

Table 2: *continued*

Sample	Year	Diagnosis	Origin	AC8b	GTA9	GGT5	AT17	21-3	AC9	AT15	AC8a	27-5	6-7	TA18	TTC21	TA10	23-3	12-5	18-8	SNP
POC987	2007	B	RO	7	8	4	12	2	8	16	9	5	6	26	12	5	2	4	3	4
POC3711	2007	LL	RO	7	8	4	16	2	8	15	9	5	6	16	15	10	1	5	8	1
POC3788	2007	B	RO	7	9	4	11	2	8	18	9	5	7	26	14	8	2	4	3	4
POC3791	2007	LL	RO	7	9	4	11	1	8	27	9	4	6	15	9	9	2	5	3	3
POC3792	2007	B	RO	8	10	4	20	2	7	21	8	5	6	26	15	8	2	4	3	4
POC3794	2007	LL	RO	7	9	4	11	2	8	23	9	4	6	16	9	9	2	5	3	3
MC2818	2007	LL	RO	7	10	4	12	2	8	17	9	5	6	14	13	8	2	4	3	4
MC8464	2007	B	RO	7	8	4	14	2	8	13	8	5	6	23	12	8	2	4	3	4
POC902	2008	B	RO	7	10	4	11	2	8	22	8	5	6	25	12	8	2	4	3	4
POC3821	2008	BL	RO	7	9	4	12	1	8	19	9	5	6	10	12	9	1	4	8	1
POC3829	2008	LL	RO	7	9	4	10	2	8	16	9	4	7	17	13	11	2	5	3	3
POC3846	2008	LL	RO	7	10	4	14	2	8	15	9	4	7	13	16	13	2	5	8	3
POC3848	2008	B	RO	7	9	4	11	2	8	14	10	4	6	17	11	10	2	5	8	3
POC202991	2008	B	RO	7	12	4	11	2	8	15	10	4	7	16	11	15	2	5	3	3
MC715	2008	LL	RO	7	9	4	14	2	8	14	9	5	7	26	14	8	2	4	3	4
MC6986	2008	B	RO	7	11	4	12	2	8	14	9	4	6	15	11	7	2	5	3	3
MC7829	2008	B	RO	7	11	3	10	2	9	14	9	4	7	15	13	12	2	5	3	3
MC9783	2008	NA	RO	7	9	4	14	2	8	ND	9	5	7	26	14	8	2	4	8	4

LL: lepromatous leprosy; B: borderline leprosy without specification of the subtypes; BL: boderline lepromatous leprosy; BT: boderline tuberculoid leprosy; NA: not available; ND: unable to characterize due to shortage of the PCR DNA template or due to negative PCR;

CE: Ceará; PE: Pernambuco; RJ: Rio de Janeiro; RO: Rondônia

Table 3A: Genotyped defined using ZN slides (van der Zanden *et al.*, 1998)

Sample	Year of collection	BI	Diagnosis	Origin	AC8b	GTA9	GGT5	AT17	21-3	AC9	AT15	AC8a	27-5	6-7	TA18	TTC21	TA10	23-3	12-5	18-8	SNP
L01	2007	4.75	B	RO	7	9	5	10	2	8	14	9	4	6	12	12	11	2	5	9	3
L02	2007	4.75	B	RO	7	8	4	12	2	7	13	9	5	7	14	12	8	2	5	8	3
L04	2007	2	LL	RO	7	9	4	9	2	8	15	10	4	6	14	10	13	2	5	9	3
L06	2007	4.5	LL	RO	7	9	4	12	2	8	15	9	5	6	17	12	8	2	4	3	4
L10	2007	2.5	B	RO	7	10	4	14	2	7	24	8	5	6	23	11	8	2	4	3	3
L13	2007	2.75	LL	RO	7	10	4	12	2	8	21	9	4	6	16	10	10	2	5	8	3
L15	2007	5	LL	RO	7	9	4	11	2	8	23	9	4	6	16	9	9	2	5	3	3
L16	2007	3	B	RO	ND	10	4	20	2	8	21	8	5	6	22	10	8	2	4	3	4
L19	2007	3.5	B	RO	7	10	4	10	2	8	16	9	4	7	15	13	11	2	5	3	4
L21	2007	1.75	B	RO	7	9	4	12	2	8	15	9	5	6	29	12	8	2	4	3	4
L22	2008	3.75	LL	RO	ND	8	ND	15	ND	ND	ND	ND	ND	6	18	11	10	2	5	ND	3
L23	2008	2	B	RO	7	10	4	13	2	8	21	9	4	6	16	9	9	2	5	8	3
L24	2008	4.25	B	RO	7	10	4	11	2	8	18	9	5	6	16	13	8	2	4	3	4
L30	2008	4.5	LL	RO	7	9	4	11	1	8	22	9	5	6	10	10	9	1	4	8	1
L36	2008	5.25	LL	RO	7	11	4	11	2	8	17	9	4	6	17	12	11	2	5	9	4
L42	2008	2	LL	RO	7	10	4	14	2	8	20	10	4	6	21	11	10	2	5	4	3
L51	2008	4.75	LL	RO	7	8	4	10	2	8	21	9	5	6	25	13	9	2	4	3	4
IPG (6A)	2008	NA	LL	RJ	7	9	4	11	2	8	14	9	4	7	15	11	10	2	5	8	ND
AN (8A)	2008	4.75	LL	RJ	8	9	4	14	2	7	24	8	5	6	17	16	8	2	4	3	3
GRM (9A)	2008	2	NA	RJ	ND	10	4	13	2	8	ND	10	ND	6	17	12	ND	ND	ND	ND	3
DS (10A)	2008	4	BL	RJ	8	9	4	20	2	8	29	8	5	6	10	13	8	2	4	3	3
LBD (11A)	2008	NA	BL	RJ	7	7	4	10	2	7	22	10	4	6	15	13	10	2	5	9	3
GTM (13A)	2008	4.25	LL	RJ	7	9	4	11	2	8	7	9	4	6	29	11	10	2	5	ND	3
VGR (1A)	2009	4.25	LL	RJ	6	9	6	9	2	8	16	9	4	6	17	11	11	2	5	5	4
MFMS (5A)	2009	4.75	LL	RJ	7	10	4	14	2	8	22	10	4	7	18	12	9	2	5	8	4

Table 3B: Genotyped defined using ZN slides (Kamble *et al.*, 2010)

Sample	Year of collection	BI	Diagnosis	Origin	AC8b	GTA9	GGT5	AT17	21-3	AC9	AT15	AC8a	27-5	6-7	TA18	TTC21	TA10	23-3	12-5	18-8	SNP
105-04	2007	4.5	B	PE	8	11	4	15	2	7	18	8	5	7	19	14	9	2	4	3	4
119-05	2007	1	LL	PE	ND	15	4	12	2	8	12	9	4	7	17	12	10	2	ND	ND	3
134-05	2007	3.25	LL	PE	7	14	4	10	2	8	12	10	4	6	22	12	10	2	5	8	4
52-06	2007	3	B	PE	7	9	4	10	2	8	19	9	4	6	31	11	10	2	5	ND	3
015-07	2007	NA	B	PE	7	7	5	14	2	8	18	8	5	6	25	13	9	2	3	8	3
159-04	2008	0.75	B	PE	ND	10	4	ND	2	7	16	10	5	7	26	10	ND	1	4	ND	ND
177-04	2008	3.25	LL	PE	8	13	4	14	2	8	15	8	6	6	16	17	11	1	4	7	1
79-05	2008	4.5	B	PE	8	10	4	16	2	7	32	8	5	6	20	14	8	2	4	3	4
133-05	2008	4.5	LL	PE	8	10	4	16	2	7	27	8	5	6	17	14	8	2	4	8	4
13-06	2008	NA	B	PE	ND	10	4	16	2	8	21	10	ND	6	22	15	10	2	4	ND	4
21-06	2008	2.5	LL	PE	ND	ND	4	10	ND	ND	ND	ND	4	7	20	13	11	2	5	8	3
23-06	2008	0.5	B	PE	7	10	4	14	2	7	15	8	5	6	21	12	8	2	4	3	4
85-06	2008	4	LL	PE	8	10	4	15	2	7	31	8	5	6	17	15	8	2	4	8	4
113-06	2008	1.25	B	PE	8	9	4	17	2	7	23	8	5	6	20	17	8	2	4	3	4
196-07	2008	2.75	B	PE	7	10	4	10	2	8	20	7	5	6	25	13	8	2	4	3	4

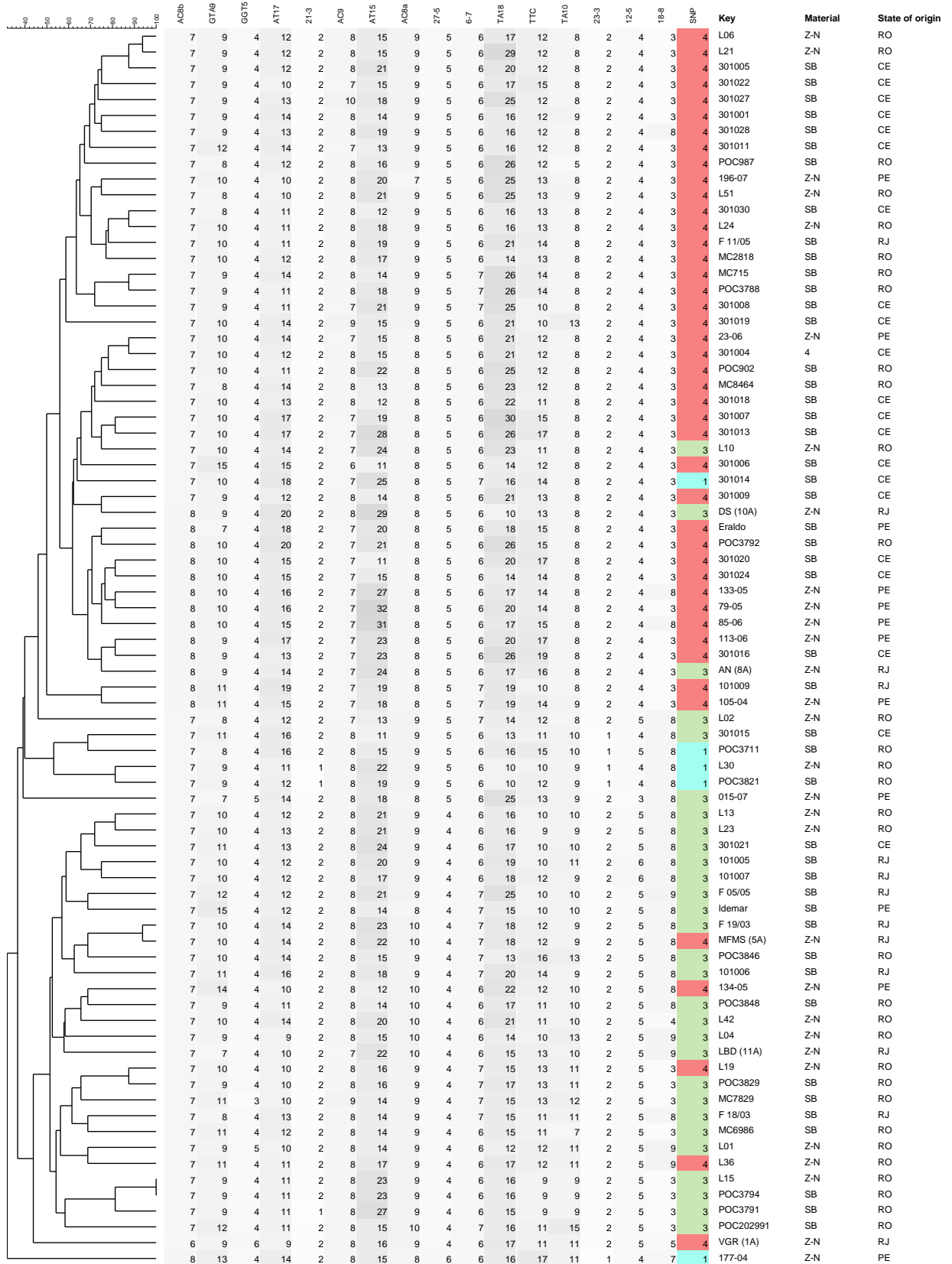
LL: lepromatous leprosy; B: boderline leprosy; BL: boderline lepromatous leprosy; BI: Bacteriological index; NA: not available; ND: unable to perform PCR due to the shortage of the DNA template or no PCR products was generated; RO: Rondônia; RJ: Rio de Janeiro

Table 4: Comparison of genotyping using sequencing and MLVA-FLA

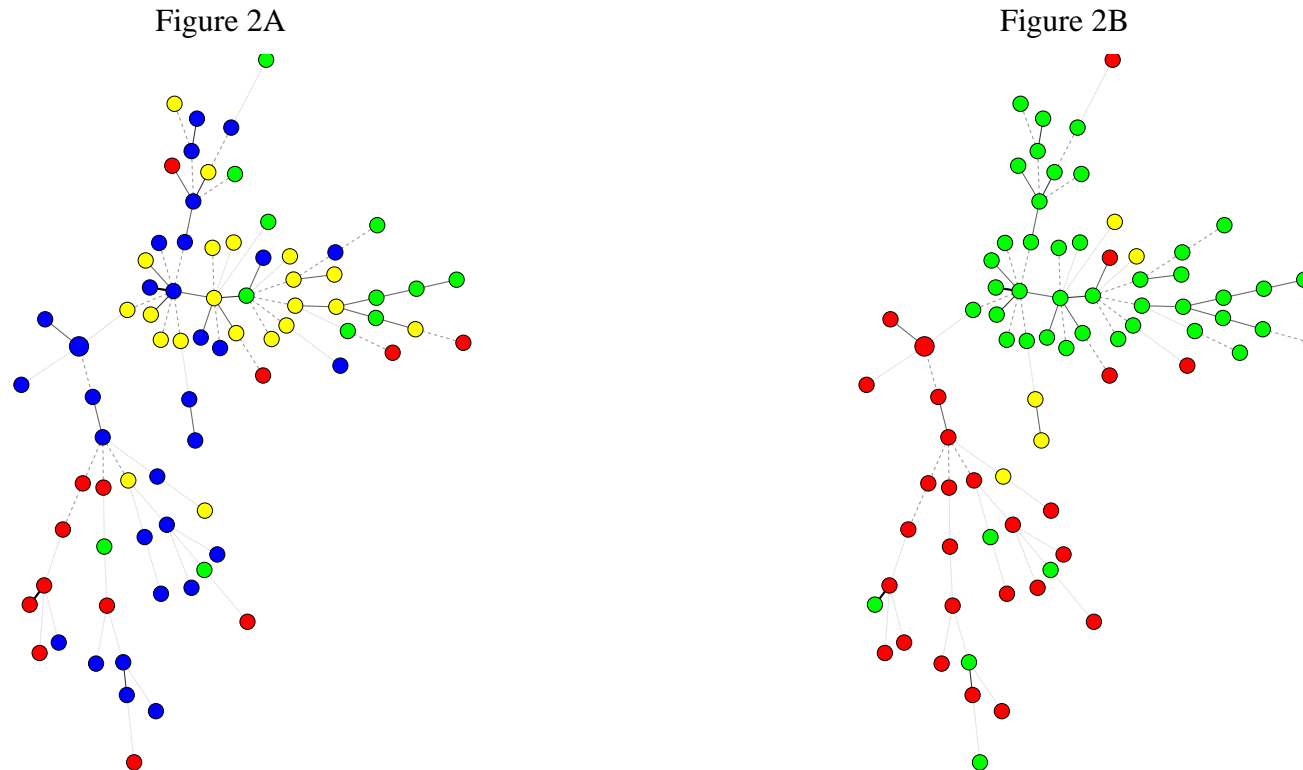
Sample	Material	Diagnosis	Origin	GTA9 MLVA	GTA9 SEQ	AT17 MLVA	AT17 SEQ	TA18 MLVA	TA18 SEQ	TTC21 MLVA	TTC21 SEQ
POC902	SB	BL	RO	10	10	11	11	25	25	12	12
POC987	SB	BL	RO	8	8	12	12	26	23	12	12
POC3711	SB	LL	RO	8	8	16	16	16	16	15	15
POC3788	SB	BL	RO	9	8	11	14	26	19	14	14
POC3791	SB	LL	RO	9	9	11	11	15	15	9	9
POC3792	SB	BL	RO	10	10	20	20	26	23	15	15
POC3794	SB	LL	RO	9	9	11	11	16	18	9	9
POC3821	SB	BL	RO	9	9	12	13	10	10	12	12
POC3829	SB	LL	RO	9	9	10	10	17	18	13	13
POC3846	SB	LL	RO	10	10	14	14	13	13	16	16
POC3848	SB	BL	RO	9	10	11	11	17	18	11	11
POC202991	SB	BL	RO	12	12	11	11	16	14	11	11
MC715	SB	LL	RO	9	9	14	14	26	22	14	14
MC2818	SB	LL	RO	10	10	12	12	14	16	13	13
MC6986	SB	BL	RO	11	12	12	12	15	15	11	11
MC7829	SB	BL	RO	11	11	10	10	15	15	13	13
MC8464	SB	BL	RO	8	8	14	14	23	ND	12	12
MC9783	SB	NA	RO	9	9	14	14	26	19	14	14
L01	Z-N	BL	RO	9	10	10	10	12	12	12	12
L02	Z-N	BL	RO	8	8	12	11	14	15	12	12
L04	Z-N	LL	RO	9	9	9	10	14	19	10	10
L06	Z-N	LL	RO	9	9	12	12	17	16	12	12
L10	Z-N	BL	RO	10	10	14	14	23	19	11	10
L13	Z-N	LL	RO	10	10	12	ND	16	ND	10	10
L15	Z-N	LL	RO	9	9	11	11	16	16	9	9
L16	Z-N	BL	RO	10	10	20	ND	22	18	10	15
L19	Z-N	BL	RO	10	10	10	10	15	15	13	10
L21	Z-N	BL	RO	9	9	12	14	29	19	12	12
L22	Z-N	LL	RO	8	9	15	15	18	16	11	11
L23	Z-N	BL	RO	10	10	13	13	16	15	9	9
L24	Z-N	BL	RO	10	9	11	11	16	16	13	13
L30	Z-N	LL	RO	9	9	11	11	10	10	10	14
L36	Z-N	LL	RO	11	11	11	11	17	21	12	12
L42	Z-N	LL	RO	10	10	14	14	21	24	11	11
L51	Z-N	LL	RO	8	8	10	10	25	21	13	13

Samples in grey were excluded from this analysis because at least one VNTR was not determined using the sequencing technique; ND: not defined; NA: not available; SB: skin biopsy; ZN: ZN slide; LL: lepromatous leprosy; BL: borderline leprosy; RO: Rondônia.

Figure 1: UPGMA-based dendrogram from VNTR data based on 78 Brazilian *M. leprae* isolates. The SNP types were attached to figure.



Figures 2A and 2B: MST based from VNTR data based on 78 Brazilian *M. leprae* isolates.



In figure A the colors represent the origin of samples: blue: Rondônia (n=32), green: Pernambuco (n=12), yellow: Ceará (n=21) and red: Rio de Janeiro (n=13). In B the colors represent SNP types: yellow: SNP type 1 (n=5), red: SNP type 3 (n=29) and green: SNP type 4 (n=44). Each circle represents a unique genotype. The diameter of each circle corresponds to the number of isolates with the same genotype.

Dados do estudo

Esta etapa da tese compreendeu a análise de 112 amostras de biópsias de pele oriundas da cidade de Fortaleza, Ceará. O material foi coletado no Centro Nacional de Referência Dona Libânia (CDERM) entre os anos de 2009 e 2010. O Centro de Referência Nacional em Dermatologia Dona Libânia, unidade credenciada pelo Ministério da Saúde como Centro de Referência Nacional para Programas de Controle em Dermatologia Sanitária, com ênfase em hanseníase, faz parte da rede de unidades de saúde do município de Fortaleza. Tem como missão realizar atividades de assistência, ensino e pesquisa na área de dermatologia sanitária, visando desenvolver e apoiar as políticas do Ministério da Saúde para o controle da hanseníase e outras dermatoses. No ano de 2009, o estado do Ceará registrou uma taxa de detecção de 26,16 casos de hanseníase em 10.000 habitantes (<http://portal.saude.gov.br/portal/saude>).

A amostragem analisada faz parte de um projeto intitulado “**Estudos clínico-epidemiológicos da Hanseníase em área endêmica do Nordeste brasileiro**”, que recebeu apoio financeiro do CNPq (**Edital MCT-CNPq/MS-SCTIE-DECIT – Nº 25/2006**), sendo coordenado pela Dra. Lígia Regina Franco Sansigolo Kerr Pontes. Este projeto tinha uma abordagem multidisciplinar, que compreendia a genotipagem de isolados de *M. leprae* oriundos de biópsias de pele de pacientes hansenianos cujo objetivo principal era elucidar alguns aspectos referentes à transmissão da doença na cidade, definindo áreas de maior risco para sua ocorrência e de seus determinantes.

Os critérios para inclusão dos pacientes neste estudo foram:

- 1) Todos os pacientes novos de hanseníase PB e MB, sem tratamento anterior;
- 2) Aceitar participar do estudo assinando o termo de consentimento livre e esclarecido (no caso de crianças abaixo de 18 anos de idade: consentimento escrito dos pais).

Os critérios de exclusão foram:

- 1) Pacientes que não deram consentimento após informação ou não são capazes de dar consentimento após informação por serem portadores de necessidades especiais;
- 2) Pacientes faltosos que retornaram com menos de 1 ano;
- 3) Pacientes com recidiva após terapia anterior concluída há menos de 5 anos;
- 4) Pacientes que no momento da coleta estavam recebendo tratamento para hanseníase ou recebendo esteróides para outras doenças que não fosse hanseníase;

5) Pacientes que não têm residência permanente na área ou não pudessem comparecer ao ambulatório durante os meses de tratamento e nos primeiros seis meses (período de acompanhamento intensivo) após o tratamento;

6) Pacientes com sinais clínicos claros de AIDS.

Os pacientes arrolados foram submetidos à coleta de dados clínicos-epidemiológicos e laboratoriais, através da revisão dos respectivos prontuários e do banco de dados do SINAN (Sistema de informação de agravos de notificação / Ficha de notificação – investigação hanseníase) do CDERM (anexo 1).

Resultados genotipagem

Do total de amostras analisadas foi possível observar que o índice de discriminação alélica dos VNTRs empregados neste estudo variou de zero (GGT5 e 21-3) até 0.934 (AT15). Nesta análise, apenas duas amostras não foram completamente genotipadas: uma amostra não foi genotipada para 6 VNTRs (GTA9, GGT5, AT17, 21-3, AT15, 12-5) e para os SNPs, enquanto que outra não foi analisada apenas para o microssatélite TTC21.

Com relação aos SNPs, foi possível observar que 89.2% (n=99) da população apresentava o genótipo 4, 8,1% (n=9) o genótipo 3 e 2,7% (n=3) o genótipo 1. Neste estudo não foi verificada a presença de genótipo 2. Apenas para uma amostra não foi possível definir o genótipo de acordo com os SNPs.

Através dos genótipos de *M. leprae* definidos neste estudo, 3 grupos foram formados empregando diferentes níveis de similaridade entre as amostras analisadas. Assim, as características dos pacientes foram avaliadas entre as amostras agrupadas e as que não pertenciam aos grupos, para que desta forma, nós pudéssemos identificar quais estariam associadas à formação dos grupos e suas possíveis relações como a transmissão da hanseníase na cidade de Fortaleza:

- i) Grupo 1: composto apenas pelos pares de amostras com mesmo genótipo para todos os VNTRs (amostras idênticas / pares A-D) (tabela 7.1);
- ii) Grupo 2: composto pelas amostras enquadradas no grupo 1 (pares A-D) e pelos pares de amostras que diferiam entre si nos microssatélites mais polimórficos: ATs (pares E-I) (tabela 7.2);

iii) Grupo 3: composto pelos pares de amostras com mesmo genótipo para todos os VNTRs (pares A-D), pelos pares de amostras que diferiam entre si nos microssatélites mais polimórficos ATs (pares E-I) e pelos pares de amostras que diferiam em outros VNTRs além dos mais polimórficos (pares J-S) (tabela 7.3).

Tabela 7.1. Pares de amostras com genótipos idênticos.

Pares	AC8b	GTA9	GGT5	AT17	6-3	21-3	AC9	AT15	AC8a	27-5	6-7	TA18	GAA21	TA10	23-3	12-5	18-8	SNP
A	8	10	4	18	3	2	7	25	8	5	6	23	19	8	2	4	3	4
	8	10	4	18	3	2	7	25	8	5	6	23	19	8	2	4	3	4
B	7	9	4	13	3	2	8	16	9	5	6	15	11	8	2	4	3	4
	7	9	4	13	3	2	8	16	9	5	6	15	11	8	2	4	3	4
C	7	9	4	12	3	2	8	21	9	5	6	16	12	8	2	4	3	4
	7	9	4	12	3	2	8	21	9	5	6	16	12	8	2	4	3	4
D	8	10	4	19	3	2	7	24	8	5	6	16	14	8	2	4	3	4
	8	10	4	19	3	2	7	24	8	5	6	16	14	8	2	4	3	4

Tabela 7.2. Pares de amostras que diferem nos microssatélites mais polimórficos (repetições de dinucleotídeos AT)

Pares	AC8b	GTA9	GGT5	AT17*	6-3	21-3	AC9	AT15*	AC8a	27-5	6-7	TA18*	GAA21	TA10	23-3	12-5	18-8	SNP
E	7	9	4	12	3	2	8	16	9	5	6	20	12	8	2	4	3	4
	7	9	4	12	3	2	8	15	9	5	6	20	12	8	2	4	3	4
F	8	10	4	18	3	2	7	33	8	5	6	23	13	8	2	4	3	4
	8	10	4	19	3	2	7	32	8	5	6	25	13	8	2	4	3	4
G	7	9	4	11	3	2	8	21	9	5	6	25	12	8	2	4	3	4
	7	9	4	11	3	2	8	21	9	5	6	22	12	8	2	4	3	4
H	8	10	4	21	3	2	7	29	8	5	7	17	14	8	2	4	3	4
	8	10	4	20	3	2	7	29	8	5	7	15	14	8	2	4	3	4
I	7	15	4	16	3	2	7	16	8	5	6	14	12	8	2	4	3	4
	7	15	4	15	3	2	7	16	8	5	6	14	12	8	2	4	3	4

* Repetições de dinucleotídeos com alto grau de polimorfismo / Em cinza: variações observadas entre os pares de amostras.

Tabela 7.3. Pares de amostras que além de diferirem nas repetições de dinucleotídeos (ATs) também apresentaram variação em mais um microsatélite.

Pares	AC8b	GTA9	GGT5	AT17*	6-3	21-3	AC9	AT15*	AC8a	27-5	6-7	TA18*	GAA21	TA10*	23-3	12-5	18-8	SNP
J	7	8	4	14	3	2	8	19	9	5	6	26	12	8	2	4	3	4
	7	8	4	14	3	2	7	18	9	5	6	25	12	8	2	4	3	4
K	7	8	4	12	3	2	8	14	9	5	6	23	13	8	2	4	3	4
	7	9	4	12	3	2	8	14	9	5	6	25	13	8	2	4	3	4
L	8	10	4	11	3	2	8	15	8	5	6	26	12	8	2	4	3	4
	7	10	4	12	3	2	8	16	8	5	6	28	12	8	2	4	3	4
M	7	12	4	15	3	2	7	17	9	2	6	17	15	8	2	4	3	4
	7	12	4	15	3	2	7	22	9	2	6	18	14	8	2	4	3	4
N	8	10	4	15	3	2	7	18	8	5	6	20	18	8	2	4	3	4
	8	10	4	14	3	2	7	23	8	5	6	20	20	9	2	4	3	4
O	7	10	4	11	3	2	8	15	8	5	6	21	12	8	2	4	3	4
	7	10	4	11	3	2	8	16	9	5	6	21	12	8	2	4	3	4
P	7	8	4	12	3	2	8	14	9	5	6	17	13	8	2	4	3	4
	7	9	4	10	3	2	8	14	9	5	6	15	13	8	2	4	3	4
Q	7	9	4	12	3	2	8	16	9	5	6	18	12	8	2	4	3	4
	7	10	4	11	3	2	8	17	9	5	6	17	12	9	2	4	3	4
R	8	9	4	13	3	2	8	22	9	5	6	17	12	8	2	4	3	4
	7	9	4	13	3	2	8	23	9	5	6	19	12	8	2	4	3	4
S	8	10	4	20	3	2	7	20	8	5	6	14	13	8	2	4	3	4
	8	10	4	20	3	2	7	21	8	5	6	16	18	8	2	4	3	4

* Repetições de dinucleotídeos com alto grau de polimorfismo / Em cinza: variações observadas entre os pares de amostras.

De posse das informações clínicas e epidemiológicas desses pacientes, selecionamos as que consideramos neste momento como sendo as mais prováveis para influenciar a transmissão da doença: sexo, raça, idade, escolaridade, ocupação, número de lesões, forma clínica da doença, baciloscopia e endereço. Para a análise de uma possível associação entre a formação dos grupos com as características dos pacientes foi utilizado o teste de qui-quadrado e para a comparação de médias (idade e número de lesões) o teste ANOVA.

Os resultados sugerem que o sexo masculino (tabela 7.4) e a área denominada de 179, que compreende os bairros situados na regional 5 de Fortaleza (tabela 7.5), estariam associados à formação do grupo 3. Nenhuma outra associação entre as variáveis analisadas e os grupos formados foi estabelecida.

Tabela 7.4. Variável sexo analisada para os 3 grupos identificados no estudo.

Sexo	Grupo 1 (pares de amostras idênticas)			Grupo 2 (pares de amostras do grupo 1 + pares de amostras que diferem nos dinucleotídeos de AT)			Grupo 3 (pares formados nos grupos 1, 2 + pares que diferem em outros VNTRs com polimorfismo intermediário)		
	Não	Sim	Total (100%)	Não	Sim	Total (100%)	Não	Sim	Total (100%)
F	39 (95, 1%)	2(4, 9%)	41	37 (90, 2%)	4 (9, 8%)	41	32 (78%)	9 (22%)	41
M	65 (91, 5%)	6 (8, 5%)	71	57 (80, 3%)	14 (19, 7%)	71	42 (59%)	29 (41%)	71
Total	104 (92, 9%)	8 (7, 1%)	112	94 (84%)	18 (16%)	112	74 (66%)	38 (34%)	112

Não: amostras que não pertencem aos grupos / Sim: amostras agrupadas./ F: feminino / M: masculino/ Em cinza: número aumentado de casos do sexo masculino.

Tabela 7.5. Variável área analisada para os 3 grupos identificados no estudo.

Área	Grupo 1 (pares de amostras idênticas)			Grupo 2 (pares de amostras do grupo 1 + pares de amostras que diferem nos dinucleotídeos de AT)			Grupo 3 (pares formados nos grupos 1, 2 + pares que diferem em outros VNTRs com polimorfismo intermediário)		
	Não	Sim	Total (100%)	Não	Sim	Total (100%)	Não	Sim	Total (100%)
s/inf	6 (85, 7%)	1 (14, 3%)	7	6 (85, 7%)	1 (14, 3%)	7	6 (85, 7%)	1 (14, 3%)	7
175	13 (100%)	0 (0%)	13	12 (92, 3%)	1 (7, 7%)	13	10 (76, 9%)	3 (23, 1%)	13
176	1 (50%)	1 (50%)	2	0 (0%)	2 (100%)	2	0 (0%)	2 (100%)	2
177	16 (88, 9%)	2 (11, 1%)	18	14 (77, 8%)	4 (22, 2%)	18	14 (77, 8%)	4 (22, 2%)	18
178	9 (90%)	1 (10%)	10	7 (70%)	3 (30%)	10	6 (60%)	4 (40%)	10
179	45 (93, 75%)	3 (6, 25%)	48	42 (87, 5%)	6 (12, 5%)	48	28 (58, 3%)	20 (41, 7%)	48
180	14 (100%)	0 (0%)	14	13 (92, 9%)	1 (7, 1%)	14	10 (71, 4%)	4 (28, 6%)	14
Total	104 (92, 9%)	8 (7, 1%)	112	94 (83, 9%)	18 (16, 1%)	112	74 (66%)	38 (34%)	112

A área corresponde aos bairros na cidade de Fortaleza: **Área 175:** Álvaro Weyne, Barra do Ceará, Carlito Pamplona, Cristo Redentor, Jd Guanabara, Jd Iracema, São Gerardo, Vila Velha / **Área 176:** Cais do Porto e Centro / **Área 177:** Antônio Bezerra, Bela Vista, Bom Sucesso, Henrique Jorge, Jardim João XXIII, Joquei Clube, PE. Andrade, Quintino Cunha / **Área 178:** Aeroporto, Montese, Pan Americano, Parangaba, Vila Peri, Vila União / **Área 179:** Bom Jardim, Canindezinho, Cj. Esperança, Granja Lisboa, Granja Portugal, José Walter, Manoel Satriro, Maraponga, Mondubim, Parque Genibau, Parque Presidente Vargas, Parque Santa Rosa, Parque São José, Planalto Airton Senna, Siqueira / **Área 180:** Aerolandia, Cajazeiras, Castelão, Cidade dos Funcionários, Jangurussu, Messejana, Passaré /s/inf:amostras sem informação quanto à origem / Não: amostras que não pertencem aos grupos / Sim: amostras agrupadas / Em cinza: número aumentado de casos de hanseníase na área denominada 179.

A genotipagem de *Mycobacterium leprae* não é uma tarefa simples porque além das complicações referentes à metodologia muitas vezes as informações acerca dos pacientes analisados não estão disponíveis, o que dificulta a compreensão dos resultados obtidos. Um outro fator que interfere neste tipo de análise está relacionado à obtenção de DNA deste bacilo que, devido à impossibilidade de cultivo *in vitro*, se restringe aos espécimes clínicos oriundos de pacientes. No entanto, nem sempre é possível obter DNA de qualidade e em quantidades suficientes para a execução dos experimentos. Além da baixa viabilidade deste tipo de material é comum observar a presença de outros microrganismos em amostras de biópsias de pele de pacientes hansenianos. Embora a multiplicação deste patógeno seja possível *in vivo*, é necessário muito tempo para que uma quantidade considerável de bactérias seja obtida para posterior obtenção de DNA. Além disso, pouco sabemos sobre as características adaptativas ou sobre as alterações genéticas potenciais deste organismo quando cultivados durante longo período. Pelas razões descritas, a genotipagem de *M. leprae* tem sido, ao longo dos anos, um grande desafio para pesquisadores do mundo todo.

Métodos de genotipagem baseiam-se na detecção de diferenças na sequência de DNA provenientes de mudanças de um único ou de alguns nucleotídeos, de deleções ou inserções (geradas através de recombinação homóloga ou de elementos genéticos móveis) e de sequências repetitivas de tamanho variado (repetições em *tandem*) em diferentes posições do genoma. As repetições em *tandem* são classificadas como microsatélites ou minissatélites e são excelentes fontes de polimorfismos porque o número de unidades destas repetições pode aumentar ou diminuir durante o processo de replicação. Sistemas de genotipagem molecular têm sido amplamente utilizados no monitoramento de surtos, distinção entre casos de reativação e re-infecção e no estudo da biologia de populações de microrganismos, de uma perspectiva local e global. Sequências repetitivas têm sido utilizadas como ferramenta na diferenciação molecular de organismos patogênicos como *Bacillus anthracis* (Fasanella e col., 2005), *Yersinia pestis* (Kingston e col., 2009; Li e col., 2009) e *M. tuberculosis* (Supply e col. 2006). A observação de sequências repetitivas em diferentes microrganismos patogênicos com potencial de discriminação variado impulsionou os estudos na busca destes elementos no genoma de *Mycobacterium leprae*.

Desde 2000, inúmeros esforços têm sido feitos na busca por sequências repetitivas com potencial para diferenciar isolados de *M. leprae*. Estudos têm avaliado o polimorfismo de diferentes micro- e minissatélites em vários países (Shin e col., 2000; Matsuoka e col., 2004; Young e col., 2004; Young e col., 2008) e os resultados observados sugerem que os

VNTRs avaliados possuem alto grau de polimorfismo. Além disso, estudos foram conduzidos nos quais a estabilidade destes microssatélites foi avaliada através da análise de suspensões oriundas de diferentes passagens em animais (Truman e col., 2004; Matsuoka e col. 2004). Os resultados observados nos diferentes trabalhos sugerem que os microssatélites são estáveis ao longo dos anos e devido ao polimorfismo observado seriam capazes de distinguir efetivamente isolados de *M. leprae*. A genotipagem molecular poderá oferecer informações importantes para estudos epidemiológicos já que apresenta potencial para rastrear a transmissão da hanseníase através da associação de genótipos de *M. leprae*. Atualmente, a análise de 15 VNTRs, seis minissatélites e 9 microssatélites, tem sido proposta como uma ferramenta robusta para genotipagem desta bactéria (Kimura e col., 2009). Além disso, o desenvolvimento de um método baseado na amplificação dos diferentes VNTRs através de quatro PCRs *multiplex*, utilizando oligonucleotídeos marcados com fluorescência para que o número de cópias de cada repetição seja determinado através da análise do comprimento dos fragmentos gerados (do inglês FLA, “Fragment length analysis”), tem sido sugerido como uma forma de análise mais rápida e eficiente para genotipagem de *M. leprae* (Kimura e col., 2009). Este tipo de abordagem é similar ao MIRU-VNTR que é amplamente utilizado para genotipagem de isolados de *M. tuberculosis* (Supply e col., 2001).

No ano de 2009, trabalhos envolvendo a genotipagem de isolados de *M. leprae* utilizando PCR *multiplex* e FLA foram desenvolvidos em populações de países como: Filipinas (Sakamuri e col., 2009), China (Xing e col., 2009; Weng e col., 2010), Colômbia (Cardona-Castro e col., 2009) e Brasil (Fontes e col., 2009). Desta forma, a variabilidade genética deste patógeno dentro das diferentes populações tem sido amplamente estudada.

No presente estudo, empregamos o método descrito por Kimura e colaboradores (2009) com o objetivo de avaliar a variabilidade genética de isolados de *M. leprae* na população brasileira. Para isso, amostras de pacientes hansenianos de três regiões geográficas do Brasil foram analisadas utilizando microssatélites e minissatélites. O poder discriminatório de 0.999 observado com os 16 VNTRs empregados neste estudo foi similar ao valor de 0.998 dos 15 MIRU-VNTR que atualmente são propostos para discriminação epidemiológica de isolados de *M. tuberculosis* (Zhou e col., 2011).

No tocante ao índice de discriminação alélica (HGDI) de cada micro- e minissatélite foi possível observar que algumas repetições apresentaram-se altamente polimórficas enquanto outras demonstraram baixo ou nenhum polimorfismo. Estratificando nossa análise de acordo com a origem geográfica dos isolados, foi possível verificar que o minissatélite 21-3 não demonstrou polimorfismo quando amostras dos estados do Ceará, Pernambuco, Rio de Janeiro e São Paulo foram avaliadas. Este mesmo comportamento foi observado em

estudos realizados na Colômbia (Castro-Cardona e col., 2009) e na China (Xing e col., 2009). Todavia, a presença de diferentes alelos para este minissatélite foi observada apenas na população de Rondônia e em estudos conduzidos na Tailândia (Srisungnam e col., 2009), Filipinas (Sakamuri e col., 2009b) e Índia (Shinde e col., 2009). O polimorfismo do minissatélite 23-3 também parece estar associado à origem geográfica dos isolados analisados, tendo sido nulo nos estados do sudeste do país e na população da Tailândia (Srisungnam e col., 2009). No entanto, as regiões norte e nordeste do Brasil demonstraram diferentes alelos para este minissatélite, assim como as populações da Índia (Shinde e col., 2009), China (Xing e col., 2009), Filipinas (Sakamuri e col., 2009b) e Colômbia (Castro-Cardona e col., 2009). Desta forma, podemos observar que a variabilidade genética de determinados VNTRs, sobretudo os minissatélites, varia de acordo com a população estudada, sugerindo que o polimorfismo de cada uma destas repetições só poderá ser inteiramente compreendido a medida que amostras de diferentes origens forem analisadas. Assim, será possível compreender se o comportamento observado está exclusivamente associado à região de estudo ou ao número amostral que foi avaliado.

Em nosso estudo, os VNTRs que apresentaram os maiores índices de discriminação alélica foram as repetições de dinucleotídeos compostas por AT (AT17, AT15, TA18 e TA10) e o trinucleotídeo GAA21. Este último microssatélite também foi descrito como sendo altamente polimórfico num estudo conduzido na Tailândia no qual o poder discriminatório de 14 VNTRs foi avaliado através da análise de biópsias de pele e esfregaços dérmicos de pacientes hansenianos. Neste mesmo trabalho repetições de dinucleotídeos como AT17, AT15 e TA18 também apresentaram as maiores taxas de diversidade alélica (Srisungnam e col., 2009).

Além da genotipagem de isolados de *M. leprae* oriundos de biópsia de pele de pacientes hansenianos, neste estudo também foi avaliada a possibilidade de amplificar, através de PCR, material de linfa proveniente de lâminas de baciloscopia (esfregaços dérmicos). A amplificação de DNA de *M. leprae* em diferentes tipos de amostras clínicas foi descrita por diversos pesquisadores. Basicamente, estudos comprovaram a presença de DNA do bacilo em amostras de linfa, sangue, biópsias de pele (Santos e col., 1993), biópsias de pele embebidas em parafina (Arnoldi e col., 1992; Fiallo e col., 1992), secreção nasal, bulbos capilares (Santos e col., 1995), lesões de nervo (Chemouilli e col., 1996) e lesões oculares (Carus e col., 1995). Todavia, a quantidade de bactérias e a presença de inibidores de PCR nestes materiais podem interferir diretamente no processo de amplificação.

A extração de DNA oriundo de material fixado em lâmina e corado pelo método de Ziehl-Neelsen foi descrita por van der Zanden e colaboradores (1998). Nesse estudo um método de extração rápido e simples que utiliza uma resina quelante (Chelex) e choque térmico foi empregado para extração de DNA de *M. tuberculosis* oriundo de amostras de escarro fixadas em lâmina. O material processado foi amplificado e genotipado para detecção de resistência medicamentosa através da técnica de *spoligotyping* (van der Zanden e col., 2003). Os resultados obtidos sugerem que este tipo de material poderia ser utilizado como uma fonte alternativa para obtenção de DNA de *M. tuberculosis*. Muito recentemente, um grupo de pesquisadores demonstrou a possibilidade de detectar DNA de *M. leprae* em lâminas de baciloscopia consideradas negativas através de um método de extração de DNA baseado em proteinase K e SDS, com posterior amplificação por PCR (Kamble e colaboradores 2010). Neste estudo, a taxa de detecção de DNA de *M. leprae* foi de 32,6% (n=15), o que demonstra que o método de extração de DNA associado à PCR poderia ser uma alternativa ao diagnóstico dos casos de hanseníase que aparentemente apresentam baciloscopia negativa.

A utilização de amostras de linfa em estudos de genotipagem de *M. leprae* foi demonstrada em alguns trabalhos. No entanto, nestes estudos as amostras eram coletadas e submetidas diretamente aos procedimentos para extração de DNA deste bacilo (Srisungham e col., 2009; Sakamuri e col., 2009b; Shinde e col., 2009; Cardona-Castro e col., 2009; Xing e col., 2009). Como as lâminas de baciloscopia são confeccionadas com linfa oriundas de esfregaços dérmicos e fazem parte da rotina dos serviços de saúde de atendimento a pacientes hansenianos, nós resolvemos investir na análise desse tipo de material. Para isto, dois protocolos de extração de DNA que nesta discussão serão chamados de A (van der Zanden e col., 1998) e B (Kamble e col., 2010) foram avaliados e os resultados obtidos comparados. A viabilidade deste tipo de material, em nosso estudo, está diretamente associada à possibilidade de genotipar essas amostras para diferentes sistemas de PCR, ou seja, definir o genótipo de *M. leprae* para 16 VNTRs.

Desta forma, foi possível observar que 30,2% das amostras cujo DNA foi extraído segundo o protocolo A foram genotipadas para todos os VNTRs empregados neste estudo, enquanto que o protocolo B demonstrou taxa de 28,2%. Como os resultados obtidos através dos dois protocolos foram muito similares, a viabilidade deste tipo de material não parece estar associada ao método de extração de DNA e sim, devido ao fato de que as amostras analisadas estavam fixadas e coradas, desta forma inibidores poderiam estar presentes interferindo na amplificação do DNA por PCR. No entanto, os resultados sugerem que este tipo de material é viável para obtenção de DNA de *M. leprae*.

Com relação ao ano de coleta das amostras oriundas de lâminas de baciloscopia foi possível verificar que o material processado segundo o protocolo A apresentou um aumento no percentual de genotipagem quando amostras mais recentes foram analisadas, demonstrando assim, que o tempo de armazenamento poderia interferir nas taxas de viabilidade. Todavia, o material processado segundo o protocolo B demonstrou resultados contrários e, possivelmente, isto se deve a um viés relacionado ao número amostral. Nenhuma relação entre o índice baciloscópico das amostras processadas e o percentual de genotipagem pôde ser estabelecida, no entanto, foi possível observar que as amostras processadas segundo o protocolo A e que foram genotipadas apresentavam índice baciloscópico entre 1.75 e 5.25. Com relação ao protocolo B, foram genotipadas amostras com índice baciloscópico variando de 0.5 a 4.5. Estes resultados sugerem que material com baixo índice baciloscópico pode ser utilizado também para obtenção de DNA de *M. leprae*.

Após a obtenção de DNA de amostras oriundas de esfregaços dérmicos (lâminas de baciloscopia) nos foi possível comparar o genótipo da bactéria obtida neste espécime clínico com os resultados oriundos de biópsia de pele do mesmo paciente; variações genotípicas foram observadas nos microssatélites considerados altamente polimórficos como os dinucleotídeos compostos por AT e o trinucleotídeo GAA21. A variabilidade genética entre espécimes clínicos de um mesmo indivíduo tem sido investigada e alguns trabalhos demonstram a existência de um padrão idêntico nos minissatélites e pequenas variações em microssatélites como AT17, GAA21 (Sakamuri e col., 2009b) e TA10 (Xing e col., 2009). No entanto, Young e colaboradores (2008) ao comparar o genótipo de *M. leprae* encontrado em biópsias de pele e de nervo de mesmo paciente observaram variações tanto nos microssatélites quanto nos minissatélites empregados no estudo. Neste caso, os resultados obtidos sugerem que duas populações de bactérias poderiam existir, o que justificaria a presença de genótipos dominantes diferentes, que supostamente teriam se expandido independentemente. Desta forma, o genótipo de *M. leprae* observado na biópsia de pele corresponderia ao genótipo dominante dentro de uma população heterogênea. A entrada no nervo proporcionaria a oportunidade para um número limitado de bactérias sofrer uma expansão clonal em um novo nicho isolado. Esta situação poderia permitir o surgimento de uma população subdominante, como resultado de alguma vantagem seletiva. Desta forma, frações da população formada por bactérias que preferem o ambiente celular oferecido no nervo seriam selecionadas naquele local. Os resultados obtidos com os diferentes trabalhos sugerem que: i) variações em microssatélites considerados altamente polimórficos não necessariamente significam uma mudança de genótipo da bactéria encontrada em diferentes espécimes clínicos de um mesmo indivíduo, desde que outras variações não sejam observadas

nos demais marcadores avaliados (minissatélites e/ou SNPs); ii) variações observadas em micro- e minissatélites podem indicar que um mesmo indivíduo tenha sido infectado por uma população mista de bactérias e que estas poderiam se expandir diferentemente nos espécimes clínicos avaliados. No entanto, os resultados obtidos em nosso estudo precisam ser ampliados através da análise de um número maior de pacientes com diferentes espécimes clínicos, só assim poderemos compreender melhor o comportamento dos diferentes marcadores.

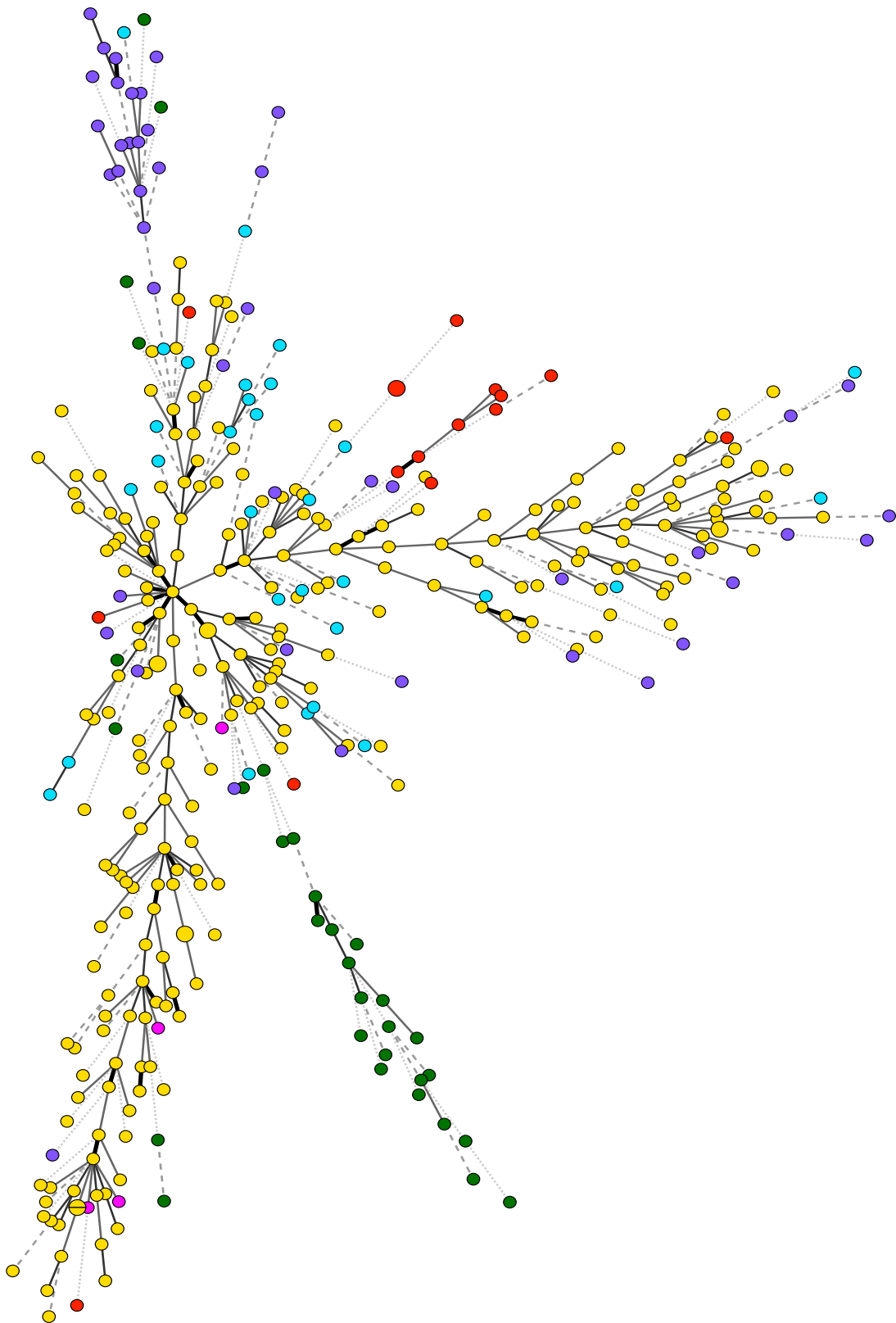
Embora em nosso estudo os resultados obtidos através da genotipagem via análise de fragmentos e sequenciamento tenham sido comparados, confirmando uma maior eficiência da primeira técnica, durante a execução desta tese de doutorado nos foi possível avaliar amostras de pacientes com hanseníase recidiva para uma possível distinção entre os casos de reativação e re-infecção da doença. Todavia, no momento em que esta proposta nos foi feita a genotipagem de *M. leprae* via análise de fragmentos estava em fase de desenvolvimento na Fundação Oswaldo Cruz. Desta forma, foi realizada uma análise utilizando apenas quatro microssatélites (Truman e col., 2004) através de amplificação por PCR e sequenciamento dos fragmentos gerados. A escolha destes microssatélites foi baseada no fato de que na época em que esta análise foi feita estes já haviam sido empregados em outros estudos nos quais seu potencial polimórfico bem como sua estabilidade já tinham sido avaliados (Groathouse e col., 2004, Truman e col., 2004, Young e col., 2004).

Os casos de recidiva associados à resistência às drogas da poliquimioterapia representam um grave problema e desde a década de 60 vários relatos têm sido descritos. A detecção molecular de resistência tem se baseado na observação de mutações em genes que codificam regiões envolvidas no alvo de ação das drogas ou de sua ativação. No entanto, neste estudo foi possível observar, através da análise de quatro microssatélites e do sequenciamento de genes comumente associados à resistência às drogas (*rpoB*, *folP*, *gyrB* e *gyrA*), que a maioria dos casos de recidiva avaliados estariam relacionados à uma re-infecção, uma vez o genótipo de *M. leprae* observado nos dois espécimes de mesmo paciente foi diferente. Devido ao número amostral e ao fato de que apenas amostras oriundas do Rio de Janeiro foram avaliadas os resultados obtidos devem ser analisados com cautela. Investigações futuras acerca do comportamento dos casos de recidiva no país, incluindo a avaliação de outros micro- e minissatélites, devem ser conduzidas.

No ano de 2009, uma edição especial do periódico *Leprosy Review* publicou trabalhos nos quais diferentes micro- e minissatélites foram empregados para avaliar a variabilidade genética de *M. leprae* em países como Colômbia (Castro-Cardona e col., 2009), Filipinas (Sakamuri col., 2009b), Índia (Shinde e col., 2009), Tailândia (Srisungnam e col., 2009) e China (Xing e col., 2009). De posse destes dados, 126 genótipos de *M. leprae* oriundos dos

países anteriormente citados foram comparados com 250 genótipos definidos em nosso estudo no Brasil através da construção de uma árvore geradora mínima (do inglês, "Minimum spanning tree") (figura 8.1). Todos os trabalhos avaliados empregaram os mesmos 14 VNTRs que foram utilizados nesta comparação. Através desta análise, nos foi possível notar que os genótipos brasileiros encontram-se mais dispersos do que os demais, esta observação pode estar relacionada ao número amostral avaliado que foi muito maior do que a soma de todos os outros países juntos, o que poderia contribuir para a grande diversidade genética observada. No tocante aos genótipos de *M. leprae* oriundos de outros países foi possível observar uma tendência à formação de grupos de acordo com a origem geográfica dos isolados, este fato pode ser observado entre amostras provenientes das Filipinas e da China, pois nos dois casos grande parte das amostras encontra-se nas extremidades da árvore. No entanto, os isolados da Tailândia encontram-se distribuídos em dois grupos distintos, cada um localizado numa extremidade. Estes resultados estão de acordo com o trabalho que foi utilizado como referência para esta comparação (Srinsungnam e col., 2009). De acordo com os autores, os isolados tailandeses são divididos em dois grupos distintos com base nos alelos encontrados em dois VNTRs específicos (GGT5 e 21-3), justamente o que foi observado com a construção da árvore. Outra particularidade observada se refere aos isolados oriundos da Índia que se apresentam dispersos entre as amostras do Brasil. A grande diversidade genética dos isolados do Brasil e da Índia pode estar relacionada ao fato de que estes dois países sozinhos são responsáveis por 69% dos novos casos de hanseníase detectados no mundo (OMS, 2008). Desta forma, a grande variabilidade genética de *M. leprae* observada seria proporcional ao número de casos de hanseníase registrados nos dois países.

Figura 8.1. Árvore geradora mínima construída com base nos genótipos de *M. leprae* identificados em diferentes países através da análise de 14 VNTRs.



As cores equivalem ao local de origem dos isolados comparados: ● Brasil (n=250) ● China (n=16) ● Colômbia (n=04) ● Filipinas (n=31) ● Tailândia (n=45) ● Índia (n=30). Cada círculo corresponde a um genótipo particular. Já o tamanho dos círculos corresponde ao número de isolados com mesmo genótipo.

Outra forma importante de polimorfismo genético observado no genoma de *M. leprae*, os polimorfismos de base única ou SNPs têm fornecido importantes evidências para a formulação de hipóteses sobre a rota de disseminação da hanseníase pelo mundo. De acordo com os estudos, a doença teria se originado no leste da África, tendo sido disseminada para Ásia, Meio Oeste, Europa e posteriormente para países da África Central através do comércio de escravos (Monot e col., 2005; Monot e col., 2009). A análise filogeográfica de bactérias é uma ferramenta poderosa porque possibilita a compreensão da disseminação do patógeno e as movimentações do hospedeiro. Estudos com *H. pylori* revelaram que genótipos deste patógeno estão diretamente relacionados com seus locais de origem, com os processos de migração e etnia de seus hospedeiros (Falush e col., 2003; Wirth e col., 2004; Linz e col., 2007). Além disso, estudos com *M. tuberculosis* sugerem que determinadas linhagens desta bactéria se adaptaram às populações específicas (Gagneux e col., 2006).

A análise de isolados brasileiros de diferentes regiões geográficas para distinção dos quatro possíveis genótipos de *M. leprae* (Monot e col., 2005) com base em mutações de base única foi impulsionada pela descrição de um método rápido de PCR-RFLP (Sakamuri e col., 2009a). Estratificando nossa análise de acordo com o estado de origem das amostras, foi observada a predominância de genótipo 3 nos estados de Rondônia (51,5%), Rio de Janeiro (70%) e São Paulo (97,3%). Todavia, a predominância quase exclusiva deste genótipo neste último estado pode estar relacionada ao fato de que apenas amostras da cidade de Bauru foram analisadas. Desta forma, o resultado observado parece ser representativo dentro de uma população específica e não do estado inteiro. Já as amostras provenientes dos estados do Rio de Janeiro e Rondônia são oriundas de centros de referência que atendem pacientes hansenianos encaminhados pelos serviços de saúde do estado, por isso uma maior heterogeneidade de genótipos pode ser observada nestas duas populações. Segundo o modelo proposto por Monot e colaboradores (2005), o genótipo 3 estaria associado às populações da Europa, norte da África e Américas, o que corroboraria com a diversidade étnica observada nos estados de Rondônia e Rio de Janeiro. No estado do norte ocorreram diversos ciclos econômicos como a exploração da borracha, cassiterita e ouro que atraíram migrantes de diversas partes do país. Já os estados do sudeste que se caracterizam por seus centros urbanos mais desenvolvidos receberam tanto imigrantes de outros países como brasileiros oriundos de outras regiões em busca de melhores condições de vida. A predominância de genótipo 3 também foi observada num estudo conduzido na população do México (Matsuoka e col., 2009), que assim como o Brasil também foi colonizado por europeus.

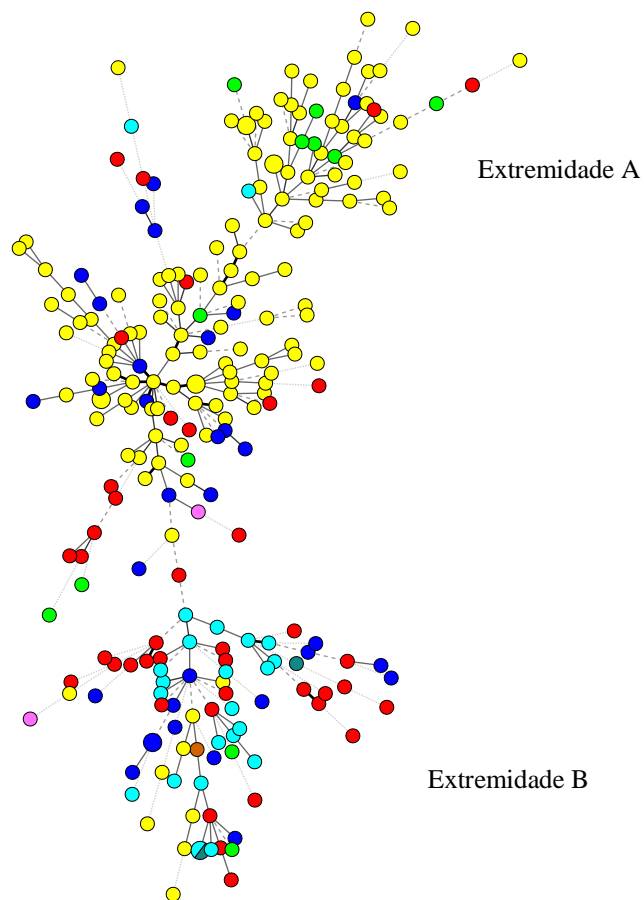
O genótipo 4, oriundo da África Ocidental (Monot e col., 2005), apresentou predominância nos dois estados do nordeste avaliados neste estudo. A proximidade entre

Pernambuco e Ceará poderia explicar a disseminação deste genótipo na região. Além disso, a composição étnica das duas populações é majoritariamente de afro-descendentes (dados do IBGE – Censo 2010), o que corroboraria com a hipótese de que a disseminação deste genótipo pelo mundo estaria associada ao comércio de escravos (Monot e col., 2005). Já o genótipo 1, que teria a sua origem em países asiáticos (Nepal, Índia, Coréia, Tailândia e Filipinas), Nova Caledônia e África Oriental, foi encontrado em menor número neste estudo em pacientes dos estados do Ceará, Pernambuco, Rondônia, Rio de Janeiro e Amazonas. A presença dos genótipos 1, 3 e 4 bem como suas taxas de predominância no Brasil corroboram com o processo de colonização do país que se reflete atualmente numa composição étnica de brancos (49,7%), afro-descendentes (49,5%) e amarelos ou índios (0,8%) (dados do IBGE – Censo 2010).

Com o objetivo de (i) visualizar a similaridade entre os genótipos definidos no Brasil, (ii) compreender a relação entre os genótipos e a origem geográfica dos isolados analisados, e (iii) avaliar a relação entre os genótipos definidos pelos VNTRs e por SNPs, árvores geradoras mínimas foram construídas. As duas árvores (figuras 8.2 e 8.3) do Brasil foram construídas com base nos genótipos de 244 isolados de *M. leprae* definidos através de 16 VNTRs. As cores empregadas na figura 8.2 equivalem ao local de origem dos isolados enquanto que na figura 8.3 demonstram os genótipos definidos através dos SNPs. Na figura 8.2 é possível verificar a grande diversidade genética de *M. leprae* observada neste estudo. No entanto, podemos observar a formação de 2 braços principais: na extremidade A estão as amostras oriundas do Ceará que apresentam certa similaridade genética com amostras de Pernambuco, com alguns isolados do Rio de Janeiro e de Rondônia. Já na extremidade B, podemos observar um braço composto por amostras de São Paulo que apresentam similaridade genética com amostras dos estados do Rio de Janeiro e alguns isolados de Rondônia. Pela figura nós podemos dizer que os isolados de Rondônia e Rio de Janeiro apresentam genótipos similares aos da região nordeste e sudeste do país. Esta observação poderia ser explicada pelo fato de que ambos os estados possuem um grande fluxo migratório recebendo indivíduos de diversas partes do Brasil. Comportamento similar também poderia ter sido observado entre os isolados de São Paulo, uma vez que o estado, sabidamente, é composto por indivíduos de diferentes regiões do país. Todavia, em nossa análise apenas amostras da cidade de Bauru foram avaliadas, assim, o comportamento observado não é referente ao estado e sim, à uma cidade específica. Na segunda árvore construída (figura 8.3) nós podemos visualizar a distribuição dos genótipos segundo os SNPs pelo país. É possível notar também a existência de 2 grandes grupos representados aqui pelos braços da árvore: na extremidade A estão os isolados com genótipo 4 que são em sua maioria originários da região

nordeste do país; na extremidade B estão os isolados com genótipo 3, originários sobretudo da região sudeste do Brasil. As duas figuras demonstram que mesmo tendo sido observada uma grande diversidade genética entre os isolados avaliados neste estudo, foi possível verificar a existência de genótipos de *M. leprae*, definidos tanto por VNTRs quanto por SNPs, associados com a área de origem da amostra, o que reforça a idéia da existência de genótipos específicos para cada região.

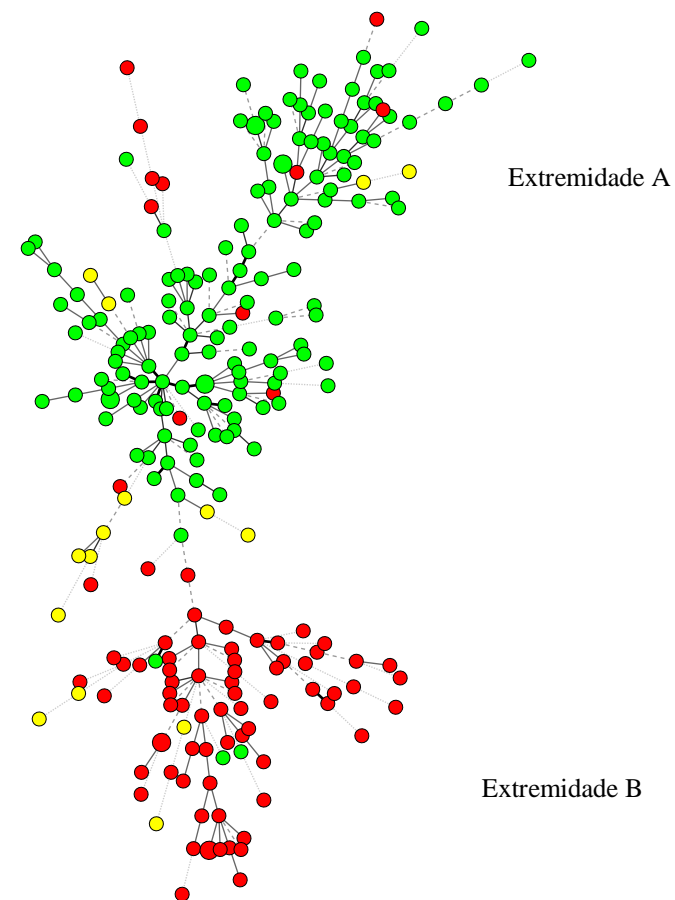
Figura 8.2. Árvore geradora mínima construída com base nos genótipos de *M. leprae* definidos no Brasil utilizando 16 VNTRs.



As cores equivalem aos estados de origem do isolados. ● PE (n=12) ● RJ (n=41)
● CE (n=131) ● SP (n=23) ● MG (n=2) ● RS (n=1) ● AM (n=2) ● RO (n=32).

Cada círculo corresponde a um genótipo particular. Já o tamanho dos círculos corresponde ao número de isolados com mesmo genótipo.

Figura 8.3. Árvore geradora mínima com os genótipos definidos pelos SNPs coloridos.



● Genótipo 1 (n=15) ● Genótipo 3 (n=82) ● Genótipo 4 (n=147)

O conhecimento da dinâmica da transmissão de outras doenças infecciosas, sobretudo da tuberculose, tem sido ampliado pelo uso de técnicas de genotipagem que permitem a diferenciação de isolados de *M. tuberculosis*. Em um estudo populacional, foi postulado que pacientes com isolados que compartilham padrões genéticos indistinguíveis são considerados pertencentes a grupos (do inglês, clusters) e representam a doença decorrente de uma infecção adquirida recentemente (Small e col., 1994, Tenover e col., 1997). Num estudo conduzido na população da cidade do Rio de Janeiro no qual foram utilizados dois métodos de genotipagem foi possível observar um maior número de grupos formados entre amostras oriundas da região do centro da cidade, considerada de maior movimentação populacional. No entanto, nenhuma associação de característica clínica e epidemiológica pôde ser estabelecida entre os indivíduos pertencentes aos grupos definidos (Oelemann e col., 2007). A associação de uma região específica da cidade com a formação de grupos sugere uma transmissão recente da tuberculose nesta área. Esta associação foi mantida mesmo quando pequenas diferenças genéticas observadas entre os métodos de genotipagem foram toleradas na formação dos grupos. Estes achados sugerem que o rigor na definição dos grupos genéticos pode subestimar os níveis de agrupamento dentro de uma população específica dificultando nossa compreensão sobre as cadeias de transmissão da doença (Warren e col., 2002).

No que se refere à hanseníase, com base nos perfis genéticos observados em nosso estudo, foi possível verificar a existência de grupos idênticos para todos os VNTRs analisados. Um grupo foi formado entre amostras do estado de Rondônia (L15/POC3794) e outro entre amostras dos estados de Minas Gerais e São Paulo (JBF-SP/JRB-MG). Estas amostras foram coletadas de forma randômica e as informações clínicas e epidemiológicas acerca destes indivíduos não estavam disponíveis. Desta forma, nenhuma associação entre os pacientes enquadrados nos grupos pôde ser estabelecida. No entanto, foi possível observar que um grupo foi formado entre indivíduos oriundos de mesmo estado, enquanto que o segundo foi composto por amostras de mesma região geográfica, o que poderia sugerir a existência de alguma conexão entre estes pacientes. Os demais grupos com identidade de 100% de similaridade genética foram observados na população de Fortaleza, no estado do Ceará. A análise destes isolados é um subprojeto dentro do projeto intitulado “Estudos clínico-epidemiológicos da Hanseníase em área endêmica do Nordeste brasileiro (Edital MCT- CNPq / MS-SCTIE-DECIT – Nº 25/2006) cujo objetivo principal é compreender a dinâmica da transmissão da hanseníase na cidade de Fortaleza através de técnicas de genotipagem.

Diferentemente do observado em nossas primeiras análises, seja pelo maior número amostral avaliado ou pelo fato de que as amostras analisadas eram oriundas de áreas

endêmicas da cidade de Fortaleza, nossos resultados demonstraram a existência de quatro grupos formados por pares de amostras geneticamente idênticas, considerando o perfil obtido através da análise de 16 VNTRs. Além dos pares de amostras idênticas, também nos foi possível observar que outras amostras demonstravam certa similaridade entre si, ou seja, apresentavam mesmo genótipo para grande parte dos VNTRs analisados e pequenas variações em apenas um VNTR de polimorfismo considerado intermediário e/ou nos microssatélites mais polimórficos como as repetições de dinucleotídeos AT que têm sido descritas por outros autores como as que apresentam os maiores índices de discriminação alélica (Srisungnam e col., 2009). Considerando os pares de amostras idênticos e similares algumas informações contidas no banco de dados do SINAN como: sexo, raça, escolaridade, endereço, ocupação, número de lesões, forma clínica da doença, baciloscopia e endereço, foram avaliadas com o objetivo de identificar possíveis relações entre esses indivíduos e fatores de risco associados à transmissão da doença na cidade de Fortaleza. Em nosso estudo, foi possível observar associações entre o gênero masculino e a área de origem dos isolados avaliados com base nos grupos identificados através da genotipagem de *M. leprae*. Estes achados sugerem que a interpretação dos dados obtidos através da análise dos 16 VNTRs devem ser observados com cautela e que uma certa tolerância entre pequenas variações, sobretudo nos VNTRs mais polimórficos, deve ser considerada.

No tocante ao gênero é comum a observação de que os homens são mais frequentemente afetados pela hanseníase do que as mulheres (Roquete e col., 1997, Aquino e col., 2003). A relação do gênero masculino com a transmissão da doença pode ser explicada pelo fato que os homens apresentam maior número de formas bacilares e são diagnosticados tardiamente, devido à demora na procura por serviços de atendimento. O diagnóstico tardio pode contribuir para que estes indivíduos se transformem em importantes fontes de disseminação da doença nos diferentes meios sociais que frequentam e ainda levá-los a um alto grau de incapacidades.

No que se refere a região, que em nosso estudo está associada à transmissão da doença na cidade de Fortaleza, trata-se de uma área conhecida como regional 5 que é composta por bairros que possuem altas taxas de detecção de novos casos (1,0 -1,9 casos detectados em 10.000 habitantes) sendo muitos deles considerados hiperendêmicos (≥ 4 casos em 10.000 habitantes) (www.sms.fortaleza.ce.gov.br). Desta forma, o fato de muitos isolados oriundos desta área possuírem genótipos idênticos e/ou similares de *M. leprae* indica fortemente que a genotipagem através de VNTRs é uma ferramenta que pode ser utilizada efetivamente em estudos sobre a transmissão da hanseníase.

- A grande diversidade genética observada entre as amostras analisadas confere aos VNTRs avaliados nesse estudo potencial para diferenciar isolados de *M. leprae*;
- Diferentes espécimes clínicos de pacientes hansenianos como biópsia de pele e material de linfa fixado em lâminas de baciloscopia podem ser utilizados em estudos de genotipagem;
- Embora grande parte dos isolados avaliados neste estudo tenham sido coletados de forma randômica, do quais não foi possível obter informações clínicas e epidemiológicas, a presença de genótipos idênticos e/ou similares entre pacientes de um mesmo estado ou região geográfica sugere uma associação entre estes indivíduos.
- Quando uma associação entre a epidemiologia convencional da doença e os dados obtidos através da genotipagem do patógeno foram combinados, no caso das amostras de Fortaleza, nos foi possível definir fatores de risco que possivelmente estariam associados à transmissão da hanseníase nesta população específica.
- No tocante aos casos de recidiva em hanseníase, este estudo sugere que os VNTRs podem ser utilizados na distinção entre os casos de reativação e re-infecção da doença.
- As variações de polimorfismos observadas entre os VNTRs estudados, bem como suas relações com os SNPs avaliados neste estudo, demonstram que esta ferramenta pode ser aplicada em estudos de filogenia de *M. leprae* e transmissão da hanseníase;
- Uma maior compreensão acerca dos mecanismos de transmissão da hanseníase, através de estudos epidemiológicos bem elaborados, poderia nos levar ao desenvolvimento de métodos que interrompam sua disseminação, reduzindo desta forma o número de novos casos.

Adair DM, Worsham PL, Hill KK, Klevytska AM, Jackson PJ, Friedlander AM, Keim P. Diversity in a variable-number tandem repeat from *Yersinia pestis*. **J Clin Microbiol.** 2000; 38(4):1516-9.

Akama T, Suzuki K, Tanigawa K, Nakamura K, Kawashima A, Wu H, Sue M, Yoshihara A, Ishido Y, Ishii N. Whole-genome expression analysis of *Mycobacterium leprae* and its clinical application. **Jpn J Infect Dis.** 2010; 63(6):387-92.

Alcaïs A, Alter A, Antoni G, Orlova M, Nguyen VT, Singh M, Vanderborght PR, Katoch K, Mira MT, Vu HT, Ngyuen TH, Nguyen NB, Moraes M, Mehra N, Schurr E, Abel L. Stepwise replication identifies a low producing lymphotoxin-alpha allele as a major risk factor for early-onset leprosy. **Nat Genet.** 2007; 39:517-522.

Almeida EC, Martinez AN, Maniero VC, Sales AM, Duppre NC, Sarno EN, Santos AR, Moraes MO. 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(5): 509-511.

Andersson JO, Andersson SG. Insights into the evolutionary process of genome degradation. **Curr Opin Genet Dev.** 1999; 9(6): 664-671.

Aquino DM, Caldas AJ, Silva AA, Costa JM. Perfil dos pacientes com hanseníase em área hiperendêmica da Amazônia do Maranhão, Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop** 2003; 36(1):57-64.

Arnoldi J, Schlüter C, Duchrow M, Hübner L, Ernst M, Teske A, Flad HD, Gerdes J, Böttger EC. Species-specific assessment of *Mycobacterium leprae* in skin biopsies by in situ hybridization and polymerase chain reaction. **Lab Invest.** 1992; 66(5):618-23.

Beyene D, Aseffa A, Harboe M, Kidane D, Macdonald M, Klatser PR, Bjune GA, Smith WC. Nasal carriage of *Mycobacterium leprae* DNA in healthy individuals in Lega Robi village, Ethiopia. **Epidemiol Infect.** 2003; 131 (2): 841-848.

Bochud PY, Sinsimer D, Aderem A, Siddiqui MR, Saunderson P, Britton S, Abraham I, Tadesse Argaw A, Janer M, Hawn TR, Kaplan G. Polymorphisms in Toll-like receptor 4 (TLR4) are associated with protection against leprosy. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis** 2009; 28(9):1055-65.

Botterel F, Desterke C, Costa C, Bretagne S. Analysis of microsatellite markers of *Candida albicans* used for rapid typing. **J Clin Microbiol.** 2001;39(11):4076-81.

Brito, M. F. M., Gallo, M. E. N., Ximenes, R. A. A. O retratamento por recidiva em hanseníase Retreatment of leprosy relapse. **An Bras Dermatol.** 2005; 80(3):255-60.

Britton WJ, Lockwood DNJ. Leprosy. **Lancet** 2004; 363:1209-1219.

Bührer-Sékula S, Cunha MG, Foss NT, Oskam L, Faber WR, Klatser PR. Dipstick assay to identify leprosy patients who have an increased risk of relapse. **Trop Med Int Health.** 2001; 6(4):317-23

Bührer-Sékula S, Smits HL, Gussenhoven GC, van Leeuwen J, Amador S, Fujiwara T, Klatser PR, Oskam L. Simple and fast lateral flow test for classification of leprosy patients and identification of contacts with high risk of developing leprosy. **J Clin Microbiol.** 2003; 41(5):1991-5.

Bull TJ, Sidi-Boumedine K, McMinn EJ, Stevenson K, Pickup R, Hermon-Taylor J. Mycobacterial interspersed repetitive units (MIRU) differentiate *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from other species of the *Mycobacterium avium* complex. **Mol Cell Probes.** 2003; 17(4):157-64.

Cambau E, Sougakoff W, Jarlier V. Amplification and nucleotide sequence of the quinolone resistance-determining region in the *gyrA* gene of mycobacteria. **FEMS Microbiol Lett.** 1994; 116(1):49-54.

Cambau E, Bonnafous P, Perani E, Sougakoff W, Ji B, Jarlier V. Molecular detection of rifampin and ofloxacin resistance for patients who experience relapse of multibacillary leprosy. **Clin Infect Dis.** 2002; 34(1):39-45.

Cambau E, Carthagena L, Chauffour A, Ji B, Jarlier V Dihydropteroate synthase mutations in the folP1 gene predict dapsone resistance in relapsed cases of leprosy. **Clin Infect Dis.** 2006; 42(2):238-41.

Cardona-Castro N, Beltrán-Alzate JC, Romero-Montoya IM, Meléndez E, Torres F, Sakamuri RM, Li W, Vissa V. Identification and comparison of *Mycobacterium leprae* genotypes in two geographical regions of Colombia. **Lepr Rev.** 2009; 80(3):316-21.

Cardona-Castro N, Beltrán JC, Ortiz-Bernal A, Vissa V. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA in nine-banded armadillos (*Dasypus novemcinctus*) from the Andean region of Colombia. **Lepr Rev** 2009; 80(4):424-431.

Carus NH, Raizman MB, Williams DL, Baker AS. Relapse of *Mycobacterium leprae* infection with ocular manifestations. **Clin Infect Dis** 1995; 20(4): 776-780.

Casanova JL, Abel L. Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model. **Annu Rev Immunol** 2002; 20:581-620.

Cellona, R. V., M. F. Balagon, E. C. dela Cruz, J. A. Burgos, R. M. Abalos, G. P. Walsh, R. Topolski, R. H. Gelber, and D. S. Walsh. 2003. Long-term efficacy of 2 year WHO multiple drug therapy (MDT) in multibacillary (MB) leprosy patients 2003; **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.** 71:308–319.

Chemouilli P, Woods S, Said G, Cole ST. Detection of *Mycobacterium leprae* in nerve lesions by the polymerase chain reaction. **Int J Lepr Other Mycobact Dis** 1996; 64 (1): 1-5.

Cher DJ, Mosmann TR. Two types of murine helper T cell clone. II. Delayed-type hypersensitivity is mediated by TH1 clones. **J Immunol** 1987; 138 (11): 3688-3694.

Clark-Curtiss JE, Jacobs WR, Docherty MA, Ritchie LR, Curtiss R 3rd. Molecular analysis of DNA and construction of genomic libraries of *Mycobacterium leprae*. **J Bacteriol.** 1985; 161(3):1093-102.

Clark-Curtiss JE, Walsh GP. Conservation of genomic sequences among isolates of *Mycobacterium leprae*. **J Bacteriol.** 1989; 171(9):4844-51.

Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, Honore N, Garnier T, Churcher C, Harris D, Mungall K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies RM, Devlin K, Duthoy S, Feltwell T, Fraser A, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Lacroix C, Maclean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Quail MA, Rajandream MA, Rutherford KM, Rutter S, Seeger K, Simon S, Simmonds M, Skelton J, Squares R, Squares S, Stevens K, Taylor K, Whitehead S, Woodward JR, Barrell BG. Massive gene decay in the leprosy bacillus. **Nature** 2001; 409 (6823): 1007-1011.

Cummings CJ, Zoghbi HY. Fourteen and counting: unraveling trinucleotide repeat diseases. **Hum Mol Genet.** 2000; 9(6):909-16.

Daley CL, Small PM, Schechter GF, Schoolnik GK, McAdam RA, Jacobs WR Jr, Hopewell PC. An outbreak of tuberculosis with accelerated progression among persons infected with the human immunodeficiency virus. An analysis using restriction-fragment-length polymorphisms. **N Engl J Med.** 1992; 326(4):231-5.

Donoghue HD, Holton J, Spigelman M. PCR primers that can detect low levels of *Mycobacterium leprae* DNA. **J Med Microbiol.** 2001; 50(2):177-82.

Drlica K, Xu C, Wang JY, Burger RM, Malik M. Fluoroquinolone action in mycobacteria: similarity with effects in *Escherichia coli* and detection by cell lysate viscosity. **Antimicrob Agents Chemother.** 1996; 40(7):1594-9.

Ebenezer GJ, Norman G, Joseph GA, Daniel S, Job CK Drug resistant-*Mycobacterium leprae*--results of mouse footpad studies from a laboratory in south India. **Indian J Lepr.** 2002; 74(4):301-12.

Falush D, Wirth T, Linz B, Pritchard JK, Stephens M, Kidd M, Blaser MJ, Graham DY, Vacher S, Perez-Perez GI, Yamaoka Y, Mégraud F, Otto K, Reichard U, Katzowitsch E, Wang X, Achtman M, Suerbaum S. Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. **Science.** 2003; 299(5612):1582-5.

Farnia P, Masjedi MR, Nasiri B, Mirsaedi M, Sorooch S, Kazeampour M, Velayati AA Instability of IS6110 patterns in multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. **Epidemiol Infect.** 2007; 135(2):346-52.

Fasanella A, Van Ert M, Altamura SA, Garofolo G, Buonavoglia C, Leori G, Huynh L, Zanecki S, Keim P. Molecular diversity of *Bacillus anthracis* in Italy. **J Clin Microbiol.** 2005 ;43(7):3398-401.

Fiallo P, Williams DL, Chan GP, Gillis TP. Effects of fixation on polymerase chain reaction detection of *Mycobacterium leprae*. **J Clin Microbiol.** 1992; 30(12):3095-8.

Filice GA, Greenberg, RN, Fraser, DW. Lack of observed association between armadillo contact and leprosy human. **Am J Trop Med Hyg** 1977; 26:137-139.

Fitness J, Floyd S, Warndorff DK, Sichali L, Mwaungulu L, Crampin AC, Fine PE, Hill AV. Large-scale candidate gene study of leprosy susceptibility in the Karonga district of northern Malawi. **Am J Trop Med Hyg** 2004; 71: 330-340.

Fontes AN, Sakamuri RM, Baptista IM, Ura S, Moraes MO, Martínez AN, Sarno EN, Brennan PJ, Vissa VD, Suffys PN. Genetic diversity of *Mycobacterium leprae* isolates from Brazilian leprosy patients. **Lepr Rev.** 2009; 80(3):302-15.

Fsihi H, Cole ST. The *Mycobacterium leprae* genome: systematic sequence analysis identifies key catabolic enzymes, ATP-dependent transport systems and a novel *poIA* locus associated with genomic variability. **Mol Microbiol.** 1995; 16(5):909-19.

Gagneux S, DeRiemer K, Van T, Kato-Maeda M, de Jong BC, Narayanan S, Nicol M, Niemann S, Kremer K, Gutierrez MC, Hilty M, Hopewell PC, Small PM. Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2006; 103(8):2869-73.

Gallo MEN, Ramos Jr AN, Albuquerque ECA, Nery JAC, Salles AM. Alocação do paciente haseniano na poliquimioterapia: correlação da classificação baseada no número de lesões cutâneas com os exames baciloscópicos. **An Bras Dermatol,** Rio de Janeiro 2003; 78:415-424.

Gierczyński R, Kałużewski S, Rakin A, Jagielski M, Zasada A, Jakubczak A, Borkowska-Opacka B, Rastawicki W. Intriguing diversity of *Bacillus anthracis* in eastern Poland--the molecular echoes of the past outbreaks. **FEMS Microbiol Lett.** 2004; 239(2):235-40.

Girdhar Bk, Girdhar A, Kumar A. Relapses in multibacillary leprosy patients: effect of length of therapy. **Leprosy Review** 2000; 71: 144-153.

Godal T, Lofgren M, Negassi K. Immune response to *M. leprae* of healthy leprosy contacts. **Int J Lepr Other Mycobact Dis.** 1972; 40(3):243-50.

Goulart IM, Bernardes Souza DO, Marques CR, Pimenta VL, Gonçalves MA, Goulart LR. Risk and protective factors for leprosy development determined by epidemiological surveillance of household contacts. **Clin Vaccine Immunol** 2008; 15(1):101-105.

Groathouse NA, Rivoire B, Kim H, Lee H, Cho SN, Brennan PJ, and Vissa VD. Multiple polymorphic loci for molecular typing of *Mycobacterium leprae*. **J Clin Microbiol** 2004; 42: 1666- 1672.

Gutierrez MC, Brisse S, Brosch R, Fabre M, Omaïs B, Marmiesse M, Supply P, Vincent Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. **PLoS Pathog.** 2005 Sep; 1(1):e5. Epub 2005 Aug 19.

Hagge DA, Oby Robinson S, Scollard D, McCormick G, Williams DL. A new model for studying the effects of *Mycobacterium leprae* on Schwann cell and neuron interactions. **J Infect Dis** 2002; 186 (9):1283-1296.

Hagge DA, Saunders BM, Ebenezer GJ, Ray NA, Marks VT, Britton WJ, Krahenbuhl JL, Adams LB. Lymphotoxin-alpha and TNF have essential but independent roles in the evolution of the granulomatous response in experimental leprosy. **Am J Pathol** 2009; 174(4): 1379-1389.

Honoré N, Perrani E, Telenti A, Grosset J, Cole ST. A simple and rapid technique for the detection of rifampin resistance in *Mycobacterium leprae*. **Int J Lepr Other Mycobact Dis.** 1993; 61(4):600-4.

Honoré N, Roche PW, Grosset JH, Cole ST. A method for rapid detection of rifampicin-resistant isolates of *Mycobacterium leprae*. **Lepr Rev.** 2001; 72(4):441-8.

Jackson PJ, Walthers EA, Kalif AS, Richmond KL, Adair DM, Hill KK, Kuske CR, Andersen GL, Wilson KH, Hugh-Jones M, Keim P. Characterization of the variable-number tandem repeats in *vrA* from different *Bacillus anthracis* isolates. **Appl Environ Microbiol.** 1997; 63(4):1400-5.

Jardim MR, Antunes SL, Santos AR, Nascimento OJ, Nery JA, Sales AM, Illarramendi X, Duppre N, Chimelli L, Sampaio EP, Sarno EP. Criteria for diagnosis of pure neural leprosy. **J Neurol** 2003; 250 (7): 806-809.

Jardim MR, Antunes SL, Simons B, Wildenbeest JG, Nery JA, Illarramendi X, Moraes MO, Martinez AN, Oskam L, Faber WR, Sarno EN, Sampaio EP, Bühner-Sékula S. Role of PGL-I antibody detection in the diagnosis of pure neural leprosy. **Lepr Rev** 2005; 76(3): 232-240.

Ji B, Perani EG, Petinom C, N'Deli L, Grosset JH Clinical trial of ofloxacin alone and in combination with dapsone plus clofazimine for treatment of lepromatous leprosy. **Antimicrob Agents Chemother.** 1994 Apr; 38(4):662-7.

Ji B, Sow S, Perani E, Lienhardt C, Diderot V, Grosset J. Bactericidal activity of a single-dose combination of ofloxacin plus minocycline, with or without rifampin, against *Mycobacterium leprae* in mice and in lepromatous patients. **Antimicrob Agents Chemother.** 1998; 42(5):1115-20.

Job CK, Jayakumar J, Kearney M, Gillis TP. Transmission of leprosy: a study of skin and nasal secretions of household contacts of leprosy patients using PCR. **Am J Trop Med Hyg** 2008; 78: 518-521.

Jopling, W.H. & McDougall, A.C. Handbook of leprosy. 4th Edition. Heinmann Professional Publishing, Oxford, 1988.

Kai M, Matsuoka M, Nakata N, Maeda S, Gidoh M, Maeda Y, Hashimoto K, Kobayashi K, Kashiwabara Y. Diaminodiphenylsulfone resistance of *Mycobacterium leprae* due to mutations in the dihydropteroate synthase gene. **FEMS Microbiol Lett.** 1999; 177(2):231-5.

Kamble RR, Shinde VS, Madhale SP, Kamble AA, Ravikumar BP, Jadhav RS. Extraction and detection of *Mycobacterium leprae* DNA from ZNCF-stained skin smear slides for better identification of negative skin smears. **Indian J Med Microbiol.** 2010; 28(1):57-9.

Kampirapap K, Singtham N, Klatser PR, Wiriyawipart S. DNA amplification for detection of leprosy and assessment of efficacy of leprosy chemotherapy. **Int J Lepr Other Mycobact Dis** 1998; 66 (1): 16-21.

Kaplan G, Cohn ZA. Regulation of cell-mediated immunity in lepromatous leprosy. **Lepr Rev** 1986; 57 Suppl 2: 199-202.

Keim P, Price LB, Klevytska AM, Smith KL, Schupp JM, Okinaka R, Jackson PJ, Hugh-Jones ME. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. **J Bacteriol.** 2000; 182(10):2928-36.

Kennedy L, Evans E, Chen CM, Craven L, Detloff PJ, Ennis M, Shelbourne PF. Dramatic tissue-specific mutation length increases are an early molecular event in Huntington disease pathogenesis. **Hum Mol Genet.** 2003; 12(24):3359-67

Kim SK, Lee SB, Kang TJ, Chae GT. Detection of gene mutations related with drug resistance in *Mycobacterium leprae* from leprosy patients using Touch-Down (TD) PCR. **FEMS Immunol Med Microbiol.** 2003; 36(1-2):27-32.

Kimura M, Sakamuri RM, Groathouse NA, Rivoire BL, Gingrich D, Krueger-Koplin S, Cho SN, Brennan PJ, Vissa V. Rapid variable-number tandem-repeat genotyping for *Mycobacterium leprae* clinical specimens. **J Clin Microbiol.** 2009; 47(6):1757-66.

Kingston JJ, Tuteja U, Kapil M, Murali HS, Batra HV. Genotyping of Indian *Yersinia pestis* strains by MLVA and repetitive DNA sequence based PCRs. **Antonie Van Leeuwenhoek.** 2009; 96(3):303-12.

Kirchheimer WF, Storrs EE. Attempts to establish the armadillo (*Dasypus novemcinctus* Linn.) as a model for the study of leprosy. I. Report of lepromatoid leprosy in an experimentally infected armadillo. **Int J Lepr Other Mycobact Dis** 1971; 39 (3): 693-702.

Klatser PR, van Beers S, Madjid B, Day R, de Wit MY. Detection of *Mycobacterium leprae* nasal carriers in populations for which leprosy is endemic. **J Clin Microbiol** 1993; 31 (11): 2947-2951.

Klevytska AM, Price LB, Schupp JM, Worsham PL, Wong J, Keim P. Identification and characterization of variable-number tandem repeats in the *Yersinia pestis* genome. **J. Clin Microbiol.** 2001; 39(9):3179-85.

Klioze AM, Ramos-Caro FA. Visceral leprosy. **International Journal of Dermatology** 2000; 39: 641-658.

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 (4): 189-193.

Kremer K, Arnold C, Cataldi A, Gutiérrez MC, Haas WH, Panaiotov S, Skuce RA, Supply P, van der Zanden AG, van Soolingen D. Discriminatory power and reproducibility of novel DNA typing methods for *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. **J Clin Microbiol.** 2005; 43(11):5628-38.

Kulkarni VM, Seydel JK. Inhibitory activity and mode of action of diaminodiphenylsulfone in cell-free folate-synthesizing systems prepared from *Mycobacterium lufu* and *Mycobacterium leprae*. A comparison. **Chemotherapy** 1983;29(1):58-67.

Kunimoto D, Sutherland K, Wooldrage K, Fanning A, Chui L, Manfreda J, Long R. Transmission characteristics of tuberculosis in the foreign-born and the Canadian-born populations of Alberta, Canada. **Int J Tuberc Lung Dis.** 2004 Oct; 8(10):1213.

Lahiri R, Randhawa B, Krahenbuhl JL. Application of a viability-staining method for *Mycobacterium leprae* derived from the athymic (nu/nu) mouse foot pad. **J Med Microbiol** 2005; 54: 235-242.

Lavania M, Katoch K, Katoch VM, Gupta AK, Chauhan DS, Sharma R, Gandhi R, Chauhan V, Bansal G, Sachan P, Sachan S, Yadav VS, Jadhav R. Detection of viable *Mycobacterium*

leprae in soil samples: Insights into possible sources of transmission of leprosy. **Infect Genet Evol** 2008; 8: 627-631.

Le Flèche P, Hauck Y, Onteniente L, Prieur A, Denoeud F, Ramisse V, Sylvestre P, Benson G, Ramisse F, Vergnaud G. A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. **BMC Microbiol.** 2001; 1:2.

Levy L. Bactericidal action of dapsone against *Mycobacterium leprae* in mice. **Antimicrob Agents Chemother.** 1976; 9(4):614-7.

Li Y, Cui Y, Hauck Y, Platonov ME, Dai E, Song Y, Guo Z, Pourcel C, Dentovskaya SV, Anisimov AP, Yang R, Vergnaud G. Genotyping and phylogenetic analysis of *Yersinia pestis* by MLVA: insights into the worldwide expansion of Central Asia plague foci. **PLoS One.** 2009; 4(6):e6000.

Linz B, Balloux F, Moodley Y, Manica A, Liu H, Roumagnac P, Falush D, Stamer C, Prugnolle F, van der Merwe SW, Yamaoka Y, Graham DY, Perez-Trallero E, Wadstrom T, Suerbaum S, Achtman M. An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. **Nature.** 2007; 445(7130):915-8.

Lista F, Faggioni G, Valjevac S, Ciammaruconi A, Vaissaire J, le Doujet C, Gorgé O, De Santis R, Carattoli A, Ciervo A, Fasanella A, Orsini F, D'Amelio R, Pourcel C, Cassone A, Vergnaud G. Genotyping of *Bacillus anthracis* strains based on automated capillary 25-loci multiple locus variable-number tandem repeats analysis. **BMC Microbiol.** 2006; 6:33.

Lowell JL, Wagner DM, Atshabar B, Antolin MF, Vogler AJ, Keim P, Chu MC, Gage KL. Identifying sources of human exposure to plague. **J Clin Microbiol.** 2005; 43(2):650-6.

Lupski JR, Roth JR, Weinstock GM. Chromosomal duplications in bacteria, fruit flies, and humans. **Am J Hum Genet.** 1996; 58(1):21-7.

Madan Babu M. Did the loss of sigma factors initiate pseudogene accumulation in *M. leprae*? **Trends Microbiol** 2003; 11: 59–61.

Maeda S, Matsuoka M, Nakata N, Kai M, Maeda Y, Hashimoto K, Kimura H, Kobayashi K, Kashiwabara Y. Multidrug resistant *Mycobacterium leprae* from patients with leprosy. **Antimicrob Agents Chemother.** 2001; 45(12):3635-9.

Maeda SM, Rotta O, Michalany NS, Camargo ZP, Sunderkötter C, Tomimori-Yamashita J. Comparison between anti-PGL-I serology and Mitsuda reaction: clinical reading, microscopic findings and immunohistochemical analysis. **Lepr Rev.** 2003; 74(3):263-74.

Mathema B, Bifani PJ, Driscoll J, Steinlein L, Kurepina N, Moghazeh SL, Shashkina E, Marras SA, Campbell S, Mangura B, Shilkret K, Crawford JT, Frothingham R, Kreiswirth BN Identification and evolution of an IS6110 low-copy-number *Mycobacterium tuberculosis* cluster. **J Infect Dis.** 2002; 185(5):641-9.

Matsuoka M, Izumi S, Budiawan T, Nakata N, Saeki K. *Mycobacterium leprae* DNA in daily using water as a possible source of leprosy infection. **Indian J Lepr** 1999; 71: 61-67.

Matsuoka M, Maeda S, Kai M, Nakata N, Chae GT, Gillis TP, Kobayashi K, Izumi S, Kashiwabara Y. *Mycobacterium leprae* typing by genomic diversity and global distribution of genotypes. **Int J Lepr Other Mycobact Dis.** 2000; 68(2):121-8.

Matsuoka M, Zhang L, Budiawan T, Saeki K, Izumi S. Genotyping of *Mycobacterium leprae* on the basis of the polymorphism of TTC repeats for analysis of leprosy transmission. **J Clin Microbiol** 2004; 42: 741-745.

Matsuoka M, Gonzalez AV, Estrada I, Carreño-Martinez C, Fafutis-Morris M. Various genotypes of *Mycobacterium leprae* from Mexico reveal distinct geographic distribution. **Lepr Rev.** 2009; 80(3):322-6.

Mazars E, Lesjean S, Banuls AL, Gilbert M, Vincent V, Gicquel B, Tibayrenc M, Locht C, Supply P. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2001;98(4):1901-6.

de Messias-Reason I, Kremsner PG, Kun JF. Functional Haplotypes that Produce Normal Ficolin-2 Levels Protect against Clinical Leprosy. **J Infect Dis** 2009; Jan 23

Ministério da Saúde. Legislação sobre o controle da hanseníase no Brasil: Área Técnica de Dermatologia Sanitária, Brasília, p.48, 2000.

Mira MT, Alcais A, di Pietrantonio T, Thuc NV, Phuong MC, Abel L, Schurr E. Segregation of HLA/TNF region is linked to leprosy clinical spectrum in families displaying mixed leprosy subtypes. **Genes Immun** 2003; 4 (1): 67-73.

Mira MT, Alcais A, Nguyen VT, Moraes MO, Di Flumeri C, Vu HT, Mai CP, Nguyen TH, Nguyen NB, Pham XK, Sarno EN, Alter A, Montpetit A, Moraes ME, Moraes JR, Dore C, Gallant CJ, Lepage P, Verner A, Van De Vosse E, Hudson TJ, Abel L, Schurr E. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. **Nature** 2004; 427 (6975): 636-640.

Monot M, Honoré N, Garnier T, Araoz R, Coppée JY, Lacroix C, Sow S, Spencer JS, Truman RW, Williams DL, Gelber R, Virmond M, Flageul B, Cho SN, Ji B, Paniz-Mondolfi A, Convit J, Young S, Fine PE, Rasolofo V, Brennan PJ, Cole ST. On the origin of leprosy. **Science** 2005; 308: 1040-1042.

Monot M, Honoré N, Balière C, Ji B, Sow S, Brennan PJ, Cole ST. Are variable-number tandem repeats appropriate for genotyping *Mycobacterium leprae*? **J Clin Microbiol** 2008; 46: 2291-2297.

Monot M, Honoré N, Garnier T, Zidane N, Sherafi D, Paniz-Mondolfi A, Matsuoka M, Taylor GM, Donoghue HD, Bouwman A, Mays S, Watson C, Lockwood D, Khamesipour A, Dowlati Y, Jianping S, Rea TH, Vera-Cabrera L, Stefani MM, Banu S, Macdonald M, Sapkota BR, Spencer JS, Thomas J, Harshman K, Singh P, Busso P, Gattiker A, Rougemont J, Brennan PJ, Cole ST. Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. **Nat Genet.** 2009; 41(12):1282-9.

Moraes MO, Pacheco AG, Schonkeren JJ, Vanderborght PR, Nery JA, Santos AR, Moraes ME, Moraes JR, Ottenhoff TH, Sampaio EP, Huizinga TW, Sarno EN. Interleukin-10 promoter singlenucleotide polymorphisms as markers for disease susceptibility and disease severity in leprosy. **Genes Immun** 2004; 5 (7): 592-595.

Moraes MO, Cardoso CC, Vanderborght PR, Pacheco AG. Genetics of host response in leprosy. **Lepr Rev** 2006; 77 (3): 189-202.

Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J Immunol** 1986; 136 (7): 2348-2357.

Nakata N, Matsuoka M, Kashiwabara Y, Okada N, Sasakawa C. Nucleotide sequence of the *Mycobacterium leprae* katG region. **J Bacteriol.** 1997; 179(9):3053-7.

Nery JA, Vieira LM, de Matos HJ, Gallo ME, Sarno EN. Reactional states in multibacillary Hansen disease patients during multidrug therapy. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo** 1998; 40 (6): 363-370.

Ng V, Zanazzi G, Timpl R, Talts J, Salzer JL, Brennan PJ, Rambukkana A. Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. **Cell** 2000; 103:511–529.

Norman G, Joseph G, Richard J. Relapses in multibacillary patients treated with multidrug therapy until smear negativity: findings after twenty years. **International Journal of Leprosy** 2004; 72: 1-7.

Oelemann MC, Fontes AN, Pereira MA, Bravin Y, Silva G, Degrave W, Carvalho AC, Brito RC, Kritski AL, Suffys PN. Typing of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Community Health Centers of Rio de Janeiro City, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2007;102(4):455-62.

Oliveira MLW. A cura da hanseníase X magnitude das recidivas. **Anais Brasileiros de Dermatologia** 1997; 72: 63-69.

OMS 1998. Guia para la Eliminación de la Lepra como Problema de Salud Publica, Ginebra.

Ortner, D.J. in The Identification of Pathological Conditions in Human Skeletal Remains (ed. Ortner, D.J.) 227-272 (Academic Press, London, UK, 2003).

Ottenhoff TH. *Mycobacterium leprae* and demyelination. **Science** 2002; 297:1475–1476.

Patrocínio LG, Goulart IM, Goulart LR, Patrocínio JA, Ferreira FR, Fleury RN. Detection of *Mycobacterium leprae* in nasal mucosa biopsies by the polymerase chain reaction. **FEMS Immunol Med Microbiol** 2005; 44: 311-316.

Pattyn SR, Husser JA, Baquillon G, Maiga M, Jamet P. Evaluation of five treatment regimens, using either dapsone monotherapy or several doses of rifampicin in the treatment of paucibacillary leprosy. **Lepr Rev.** 1990; 61(2):151-6.

Pattyn SR, Ursi D, Ieven M, Grillone S, Raes V. Detection of *Mycobacterium leprae* by the polymerase chain reaction in nasal swabs of leprosy patients and their contacts. **Int J Lepr Other Mycobact Dis** 1993; 61 (3): 389-393.

Pessolani MCV, Marques MAM, Reddy VM, Loch C, Menozzi FD. Systemic dissemination in tuberculosis and leprosy: do mycobacterial adhesins play a role? **Microbes Infect** 2003; 5(7):677-84.

Phetsuksiri B, Rudeeaneksin J, Supakul P, Wachapong S, Mahotarn K, Brennan PJ. A simplified reverse transcriptase PCR for rapid detection of *Mycobacterium leprae* in skin specimens. **FEMS Immunol Med Microbiol** 2006; 48(3): 319-328.

Plikaytis BB, Gelber RH, Shinnick TM. Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium leprae* using a nested-primer gene amplification assay. **J Clin Microbiol** 1990; 28(9): 1913-1917.

Pourcel C, André-Mazeaud F, Neubauer H, Ramisse F, Vergnaud G. Tandem repeats analysis for the high resolution phylogenetic analysis of *Yersinia pestis*. **BMC Microbiol.** 2004; 8: 4:22.

Prado-Montes de Oca E, Velarde-Félix JS, Ríos-Tostado JJ, Picos-Cárdenas VJ, Figuera LE. SNP 668C (-44) alters a NF-kappaB1 putative binding site in non-coding strand of human beta-defensin 1 (DEFB1) and is associated with lepromatous leprosy. **Infect Genet Evol** 2009; 9(4): 617-625.141

Prevedello FC, Mira MT. Hanseníase: uma doença genética? **An Bras Dermatol** 2007; 82(5): 451-459. Rabello, E, Rabello Jr, F. Une classification clinico-epidemiologique des formes de la lèpre. **Ver Bras Leprae** 1938; 6(3):229-243.

Rambukkana A. Molecular basis for the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. **Curr Opin Microbiol** 2001; 4 (1): 21-27.

Rambukkana A, Zanazzi G, Tapinos N, Salzer JL. Contact-dependent demyelination by *Mycobacterium leprae* in the absence of immune cells. **Science** 2002; 296 (5569): 927-931.

Rambukkana A. *Mycobacterium leprae*-induced demyelination: a model for early nerve degeneration. **Curr Opin Immunol** 2004; 16(4):511-518. Review.

Read TD, Salzberg SL, Pop M, Shumway M, Umayam L, Jiang L, Holtzapple E, Busch JD, Smith KL, Schupp JM, Solomon D, Keim P, Fraser CM. Comparative genome sequencing for discovery of novel polymorphisms in *Bacillus anthracis*. **Science**. 2002; 296(5575):2028-33.

Ress RFW (1985). The microbiology of leprosy. In: Hastings RC (ed) *Leprosy*, 1st edition, Churchill Livingstone Inc, New York, p, 31-52.

Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. **Int J Lepr Other Mycobact Dis** 1966; 34 (3): 255-273.

Roquete AFO, Feitosa DB, Diniz LVG, Madalena M, Lins, MD. Avaliação das incapacidades em pacientes hansênicos atendidos nos serviços públicos de saúde do Distrito Federal, com alta em 1995. **Rev Saúde Dist Fed** 1997; 8(1):27-40.

Roy S, Frodsham A, Saha B, Hazra SK, Mascie-Taylor CG, Hill AV. Association of vitamin D receptor gene type with leprosy type. **J Infect Dis** 1999; 179: 187-191.

Rudeeaneksin J, Srisungngam S, Sawanpanyalert P, Sittiwakin T, Likanonsakul S, Pasadorn S, Palittapongarnpim P, Brennan PJ, Phetsuksiri B. LightCycler (trade mark) real-time PCR for rapid detection and quantitation of *Mycobacterium leprae* in skin specimens. **FEMS Immunol Med Microbiol** 2008; 54: 263–270.

Sakamuri RM, Kimura M, Li W, Kim HC, Lee H, Kiran MD, Black WC 4th, Balagon M, Gelber R, Cho SN, Brennan PJ, Vissa V. Population-based molecular epidemiology of leprosy in Cebu, Philippines. **J Clin Microbiol.** 2009a; 47(9):2844-54.

Sakamuri RM, Harrison J, Gelber R, Saunderson P, Brennan PJ, Balagon M, Vissa V. A continuation: study and characterisation of *Mycobacterium leprae* short tandem repeat genotypes and transmission of leprosy in Cebu, Philippines. **Lepr Rev.** 2009b; 80(3): 272-9.

Santos AR, De Miranda AB, Sarno EN, Suffys PN, Degrave 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 (4): 298-304.

Santos AR, Goes Filho JT, Nery JA, Duppre NC, Gallo ME, Suffys PN, Degrave WM. Evaluation of PCR mediated DNA amplification in non-invasive biological specimens for subclinical detection of *Mycobacterium leprae*. **FEMS Immunol Med Microbiol** 1995; 11 (2): 113-120.

Santos AR, Nery JC, Duppre NC, Gallo ME, Filho JT, Suffys PN, Degrave WM. Use of the polymerase chain reaction in the diagnosis of leprosy. **J Med Microbiol** 1997; 46 (2): 170-172.

Santos AR, Suffys PN, Vanderborcht PR, Moraes MO, Vieira LM, Cabello PH, Bakker AM, Matos HJ, Huizinga TW, Ottenhoff TH, Sampaio EP, Sarno EN. Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. **J Infect Dis** 2002; 186: 1687-1691.

Sarno EN, Grau GE, Vieira LMM, Nery JAC. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 β during leprosy reactional states. **Clin Exp Immunol** 1991; 84:103-8.

Savine E, Warren RM, van der Spuy GD, Beyers N, van Helden PD, Loch C, Supply P. Stability of variable-number tandem repeats of mycobacterial interspersed repetitive units from 12 loci in serial isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **J Clin Microbiol.** 2002; 40(12):4561-6.

Schuring RP, Moet FJ, Pahan D, Richardus JH, Oskam Association between anti-pGL-I IgM and clinical and demographic parameters in leprosy. **Lepr Rev.** 2006; 77(4):343-55.

Schuring RP, Hamann L, Faber WR, Pahan D, Richardus JH, Schumann RR, Oskam L. Polymorphism N248S in the human Toll-like receptor 1 gene is related to leprosy and leprosy reactions. **J Infect Dis** 2009; 199(12): 1816-1819.

Scollard DM, Gillis TP, Williams DL. Polymerase chain reaction assay for the detection and identification of *Mycobacterium leprae* in patients in the United States. **Am J Clin Pathol** 1998; 109 (5): 642-646.

Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. **Clin Microbiol Rev** 2006; 19(2): 338-381. Review.

Sela S, Clark-Curtiss JE, Bercovier H. Characterization and taxonomic implications of the rRNA genes of *Mycobacterium leprae*. **J Bacteriol.** 1989; 171(1):70-3.

Sepkowitz KA, Raffalli J, Riley L, Kiehn TE, Armstrong D. Tuberculosis in the AIDS era. **J. Clin Microbiol.** 1995; 8:180-99.

Shepard CC. Acid-fast bacilli in nasal excretions in leprosy, and results of inoculation of mice. **Am J Hyg** 1960 Mar; 71: 147-157.

Shepard CC. Multiplication of *Mycobacterium leprae* in the foot-pad of the mouse. **Int J Lepr** 1962; 30: 291-306.

Shimoji Y, Ng V, Matsumura K, Fischetti V, Rambukkana A. A 21-kDa surface protein of *Mycobacterium leprae* binds peripheral nerve laminin-2 and mediates Schwann cell invasion. **Proc Natl Acad Sci USA** 1999; 96: 9857–9862.

Shin YC, Lee H, Lee H, Walsh GP, Kim JD, Cho SN. Variable numbers of TTC repeats in *Mycobacterium leprae* DNA from leprosy patients and use in strain differentiation. **J Clin Microbiol.** 2000; 38(12):4535-8.

Shinde V, Newton H, Sakamuri RM, Reddy V, Jain S, Joseph A, Gillis T, Nath I, Norman G, Vissa V. VNTR typing of *Mycobacterium leprae* in South Indian leprosy patients. **Lepr Rev.** 2009; 80(3):290-301.

Sieling PA, Modlin RL. Cytokine patterns at the site of mycobacterial infection. **Immunobiology** 1994; 191 (4-5): 378-387.

da Silva R, Santos AAC, Pignataro P, Nery JA, Miranda AB, Soares DF, Fontes ANB, Miranda A, Ferreira H, Boéchat NL, Gallo MEN, Sarno EM, Oliveira MLW, Suffys, PN. Genotyping of *Mycobacterium leprae* from Brazilian leprosy patients suggest the occurrence of re-infection or of bacterial population shift during disease relapse. Submitted to **Journal of Medical Microbiology** 2010.

da Silva RC, Lyon S, Lyon AC, Grossi MA, Lyon SH, Bühner-Sékula S, Antunes CM. Correlation between ELISA and ML Flow assays applied to 60 Brazilian patients affected by leprosy. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 2010;104(8):546-50.

Small PM, Hopewell PC, Singh SP, Paz A, Parsonnet J, Ruston DC, Schechter GF, Daley CL, Schoolnik GK. The epidemiology of tuberculosis in San Francisco. A population-based study using conventional and molecular methods. **N Engl J Med.** 1994; 330(24):1703-9.

Srisungnam S, Rudeeaneksin J, Lukebua A, Wattanapokayakit S, Pasadorn S, Mahotarn K, Ajincholapan, Sakamuri RM, Kimura M, Brennan PJ, Phetsuksiri B, Vissa V. Molecular epidemiology of leprosy based on VNTR typing in Thailand. **Lepr Rev.** 2009; 80(3):280-9.

Stragier P, Ablordey A, Meyers WM, Portaels F. Genotyping *Mycobacterium ulcerans* and *Mycobacterium marinum* by using mycobacterial interspersed repetitive units. **J Bacteriol.** 2005; 187(5):1639-47.

Sun YJ, Lee AS, Ng ST, Ravindran S, Kremer K, Bellamy R, Wong SY, van Soolingen D, Supply P, Paton NI. Characterization of ancestral *Mycobacterium tuberculosis* by multiple genetic markers and proposal of genotyping strategy. **J Clin Microbiol.** 2004; 42(11):5058-64.

Supply P, Lesjean S, Savine E, Kremer K, van Soolingen D, Locht C. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. **J Clin Microbiol.** 2001; 39(10):3563-71.

Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rüsç-Gerdes S, Willery E, Savine E, de Haas P, van Deutekom H, Roring S, Bifani P, Kurepina N, Kreiswirth B, Sola C, Rastogi N, Vatin V, Gutierrez MC, Fauville M, Niemann S, Skuce R, Kremer K, Locht C, van Soolingen D. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. **J Clin Microbiol.** 2006; 44(12):4498-510. Epub 2006 Sep 27.

Takiff HE, Salazar L, Guerrero C, Philipp W, Huang WM, Kreiswirth B, Cole ST, Jacobs WR Jr, Telenti A. Cloning and nucleotide sequence of *Mycobacterium tuberculosis* gyrA and gyrB genes and detection of quinolone resistance mutations. **Antimicrob Agents Chemother.** 1994; 38(4):773-80.

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. **Infect Control Hosp Epidemiol** 1997; 18:426-39.

Tomimori-Yamashita J, Cruaud P, Rotta O, Lagrange PH. Antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for determination of anti-PGL-I specific circulating immune complex in leprosy patients. **Lepr Rev.** 1999; 70(3):261-71.

Torres P, Camarena JJ, Gomez JR, Nogueira JM, Gimeno V, Navarro JC, Olmos A. Comparison of PCR mediated amplification of DNA and the classical methods for detection of *Mycobacterium leprae* in different types of clinical samples in leprosy patients and contacts. **Lepr Rev** 2003; 74(1): 18-30.

Truman RW, Job CK, Hastings RC. Antibodies to the phenolic glycolipid-1 antigen for epidemiologic investigations of enzootic leprosy in armadillos (*Dasypus novemcinctus*). **Lepr Rev** 1990; 61:19-24

Truman RW, Kumaresan JA, McDonough CM, Job CK, Hastings RC. Seasonal and spatial trends in the detectability of leprosy in wild armadillos. **Epidemiol Infect.** 1991; 106(3):549-60.

Truman, R. W., and J. L. Krahenbuhl. Viable *M. leprae* as a research reagent. **Int J Lepr Other Mycobact Dis** 2001; 69 (1):1–12.

Truman R, Fontes AB, De Miranda AB, Suffys P, Gillis T. Genotypic variation and stability of four variable-number tandem repeats and their suitability for discriminating strains of *Mycobacterium leprae*. **J Clin Microbiol** 2004; 42: 2558-2565.

Truman RW, Andrews PK, Robbins NY, Adams LB, Krahenbuhl JL, Gillis TP. Enumeration of *Mycobacterium leprae* Using Real-Time PCR. **PLoS Negl Trop Dis** 2008; 2(11): e328.

Vanderborgh PR, Pacheco AG, Moraes ME, Antoni G, Romero M, Verville A, Thai VH, Huong NT, Ba NN, Schurr E, Sarno EN, Moraes MO. HLA-DRB1*04 and DRB1*10 are associated with resistance and susceptibility, respectively, in Brazilian and Vietnamese leprosy patients. **Genes Immun** 2007; (4): 320-324.

van der Zanden AG, Hoentjen AH, Heilmann FG, Weltevreden EF, Schouls LM, van Embden JD. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex in paraffin wax embedded tissues and in stained microscopic preparations. *Mol Pathol.* 1998 Aug; 51(4):209-14.

van der Zanden AG, Te Koppele-Vije EM, Vijaya Bhanu N, Van Soolingen D, Schouls LM. Use of DNA extracts from Ziehl-Neelsen-stained slides for molecular detection of rifampin resistance and spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis*. **J Clin Microbiol.** 2003; 41(3):1101-8.

van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, Hermans P. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. **J Clin Microbiol.** 1993; 31(2):406-9.

Vissa VD & Brennan PJ. The genome of *Mycobacterium leprae*: a minimal mycobacterial gene set. **Genome Biol** 2001; 2 (8). Review.

Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. **Biotechniques**. 1991;10(4):506-13.

Warren RM, van der Spuy GD, Richardson M, Beyers N, Booyesen C, Behr MA, van Helden PD. Evolution of the IS6110-based restriction fragment length polymorphism pattern during the transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Clin Microbiol**. 2002; 40(4):1277-82.

Weng X, Heiden JV, Xing Y, Liu J, Vissa V. Transmission of leprosy in Qiubei County, Yunnan, China: Insights from an 8-year molecular epidemiology investigation. **Infect Genet Evol**. 2010 Dec 1.

WHO. Action programme for Elimination of Leprosy. Current global situation of leprosy. **Weekly epidemiol. Rec**. 1999; 74:313-320

Williams DL, Gillis TP. A study of the relatedness of *Mycobacterium leprae* isolates using restriction fragment length polymorphism analysis. **Acta Leprol**. 1989; 7 Suppl 1:226-30.

Williams DL, Gillis TP, Booth RJ, Looker D, Watson JD. The use of a specific DNA probe and polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae*. **J Infect Dis** 1990; 162 (1):193-200.

Williams DL, Waguespack C, Eisenach K, Crawford JT, Portaels F, Salfinger M, Nolan CM, Abe C, Sticht-Groh V, Gillis TP. Characterization of rifampin-resistance in pathogenic mycobacteria. **Antimicrob Agents Chemother**. 1994; 38(10):2380-6.

Williams DL, Spring L, Gillis TP, Salfinger M, Persing DH. Evaluation of a polymerase chain reaction-based universal heteroduplex generator assay for direct detection of rifampin susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* from sputum specimens. **Clin Infect Dis**. 1998; 26(2):446-50.

Williams DL, Spring L, Harris E, Roche P, Gillis TP Dihydropteroate synthase of *Mycobacterium leprae* and dapsone resistance. **Antimicrob Agents Chemother**. 2000 Jun; 44(6):1530-7.

Williams DL, Pittman TL, Gillis TP, Matsuoka M, Kashiwabara Y. Simultaneous detection of *Mycobacterium leprae* and its susceptibility to dapsone using DNA heteroduplex analysis. **J Clin Microbiol.** 2001; 39(6):2083-8.

Williams DL, Gillis TP. Molecular detection of drug resistance in *Mycobacterium leprae*. **Lepr Rev.** 2004; 75(2):118-30. Review

Williams DL, Slayden RA, Amin A, Martinez AN, Pittman TL, Mira A, Mitra A, Nagaraja V, Morrison NE, Moraes M, Gillis TP. Implications of high level pseudogene transcription in *Mycobacterium leprae*. **BMC Genomics.** 2009 Aug 25; 10:397.

Wirth T, Wang X, Linz B, Novick RP, Lum JK, Blaser M, Morelli G, Falush D, Achtman M. Distinguishing human ethnic groups by means of sequences from *Helicobacter pylori*: lessons from Ladakh. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2004 Apr 6; 101(14):4746-51.

de Wit MY, Faber WR, Krieg SR, Douglas JT, Lucas SB, Montreewasuwat N, Pattyn SR, Hussain R, Ponnighaus JM, Hartskeerl RA, et al. Application of a polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae* in skin tissues. **J Clin Microbiol** 1991; 29 (5): 906-910.

de Wit MY, Klatser PR. *Mycobacterium leprae* isolates from different sources have identical sequences of the spacer region between the 16S and 23S ribosomal RNA genes. **Microbiology.** 1994; 140 (Pt 8):1983-7.

de Wit TFR, Bekelie S, Osland A, Wieles B, Janson AA, Thole JE. The *Mycobacterium leprae* antigen 85 complex gene family: identification of the genes for the 85A, 85C, and related MPT51 proteins. **Infect Immun** 1993; 61 (9): 3642-3647.

Woods SA, Cole ST. A rapid method for the detection of potentially viable *Mycobacterium leprae* in human biopsies: a novel application of PCR. **FEMS Microbiol Lett** 1989; 53 (3): 305-309.

Woods SA, Cole ST. A family of dispersed repeats in *Mycobacterium leprae*. **Mol Microbiol.** 1990; 4(10):1745-51.

www.portal.saude.gov.br (data de acesso: janeiro de 2011).

www.sms.fortaleza.ce.gov.br - Informe epidemiológico: Hanseníase 2008 (data de acesso: abril de 2011).

www.who.int/lep/en/ (data de acesso: janeiro de 2011).

Xing Y, Liu J, Sakamuri RM, Wang Z, Wen Y, Vissa V, Weng X. VNTR typing studies of *Mycobacterium leprae* in China: assessment of methods and stability of markers during treatment. **Lepr Rev.** 2009;80(3):261-71

Yamamura M, Uyemura K, Deans RJ, Weinberg K, Rea TH, Bloom BR, Modlin RL. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. **Science** 1991; 254 (5029): 277-279.

You EY, Kang TJ, Kim SK, Lee SB, Chae GT. Mutations in genes related to drug resistance in *Mycobacterium leprae* isolates from leprosy patients in Korea. **J Infect.** 2005 Jan; 50(1):6-11.

Young SK, Taylor GM, Jain S, Suneetha LM, Suneetha S, Lockwood DN, Young DB. Microsatellite mapping of *Mycobacterium leprae* populations in infected humans. **J Clin Microbiol** 2004; 42: 4931-4936.

Young SK, Ponnighaus JM, Jain S, Lucas S, Suneetha S, Lockwood DN, Young DB, Fine PE. Use of short tandem repeat sequences to study *Mycobacterium leprae* in leprosy patients in Malawi and India. **PLoS Negl Trop Dis.** 2008;2(4):e214.

Zhang L, Namisato M, Matsuoka MA. Mutation at codon 516 in the rpoB gene of *Mycobacterium leprae* confers resistance to rifampin. **Int J Lepr Other Mycobact Dis.** 2004;72(4):468-72.

Zhou A, Nawaz M, Xue X, Karakousis PC, Yao Y, Xu J. Molecular genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* in Xi'an, China, using MIRU-VNTR typing. **Int J Tuberc Lung Dis.** 2011; 15(4):517-22.

Caso confirmado de Hanseníase: pessoa que apresenta uma ou mais das seguintes características e que requer poliquimioterapia: lesão (ões) de pele com alteração de sensibilidade; acometimento de nervo (s) com espessamento neural; baciloscopia positiva.

Dados Gerais	1 Tipo de Notificação	2 - Individual		
	2 Agravado/doença	HANSENÍASE		3 Data da Notificação
	4 UF	5 Município de Notificação	Código (CID10) A 3 0 . 9	Código (IBGE)
	6 Unidade de Saúde (ou outra fonte notificadora)	Código	7 Data do Diagnóstico	

Notificação Individual	8 Nome do Paciente	9 Data de Nascimento		
	10 (ou) Idade	11 Sexo	12 Gestante	13 Raça/Cor
	14 Escolaridade	15 Número do Cartão SUS		
	16 Nome da mãe	17 UF		

Dados de Residência	18 Município de Residência	Código (IBGE)	19 Distrito
	20 Bairro	21 Logradouro (rua, avenida,...)	Código
	22 Número	23 Complemento (apto., casa, ...)	24 Geo campo 1
	25 Geo campo 2	26 Ponto de Referência	27 CEP
	28 (DDD) Telefone	29 Zona	30 País (se residente fora do Brasil)

Dados Complementares do Caso

Dados Clínicos	31 Nº do Prontuário	32 Ocupação	
	33 Nº de Lesões Cutâneas	34 Forma Clínica	35 Classificação Operacional

Atendimento	37 Avaliação do Grau de Incapacidade Física no Diagnóstico	0 - Grau Zero 1 - Grau I 2 - Grau II 3 - Não Avaliado
	38 Modo de Entrada	1 - Caso Novo 2 - Transferência do mesmo município (outra unidade) 3 - Transferência de Outro Município (mesma UF) 4 - Transferência de Outro Estado 5 - Transferência de Outro País 6 - Recidiva 7 -Outros Reingressos 9 - Ignorado
	39 Modo de Detecção do Caso Novo	1 - Encaminhamento 2 - Demanda Espontânea 3 - Exame de Coletividade 4 - Exame de Contatos 5 - Outros Modos 9 - Ignorado

Dados Lab.	40 Baciloscopia	1. Positiva 2. Negativa 3. Não realizada 9. Ignorado
------------	-----------------	--

Tratamento	41 Data do Início do Tratamento	42 Esquema Terapêutico Inicial	1 - PQT/PB/ 6 doses 2 - PQT/MB/ 12 doses 3 - Outros Esquemas Substitutos
------------	---------------------------------	--------------------------------	--

Med. Contr.	43 Número de Contatos Registrados
-------------	-----------------------------------

Observações adicionais:

Investigador	Município/Unidade de Saúde	Código da Unid. de Saúde
	Nome	Função

RESIDÊNCIA

1. LOCAL DE RESIDÊNCIA NO INÍCIO PROVÁVEL DA DOENÇA		
MUNICÍPIO	ESTADO/PAÍS	TEMPO DE RESIDÊNCIA <input type="text"/> A - ANO <input type="text"/> M - MESES
2. LOCAL DE RESIDÊNCIA DE 3 A 5 ANOS ANTES DO INÍCIO PROVÁVEL DA DOENÇA		
MUNICÍPIO	ESTADO/PAÍS	TEMPO DE RESIDÊNCIA <input type="text"/> A - ANO <input type="text"/> M - MESES

HISTÓRICO / EXAME DERMATOLÓGICO

DADOS LABORATORIAIS COMPLEMENTARES

MITSUDA 1- POSITIVA mm 2- NEGATIVA mm 3- ULCERADA 4- NÃO-REALIZADA 9- IGNORADA

ÍNDICE BACILOSCÓPIO: _____ (escala logarítmica de Ridley)

HISTOPATOLOGIA 1- I 2- T 3- D 4- V 5- OUTROS RESULTADOS 6- NÃO -REALIZADA 9- IGNORADA

AValiação DE INCAPACIDADE

GRAU	GRAU MÁXIMO DE MÃO	GRAU MÁXIMO DE PÉ	GRAU MÁXIMO DE OLHO
	Sinais e ou Sintomas	Sinais e ou Sintomas	Sinais e ou Sintomas
ZERO	Nenhum problema nas mãos devido à hanseníase <input type="text"/>	Nenhum problema nos pés devido à hanseníase <input type="text"/>	Nenhum problema nos olhos devido à hanseníase <input type="text"/>
I	Presença de anestesia sem deformidade ou lesão visível <input type="text"/>	Presença de anestesia sem deformidade ou lesão visível <input type="text"/>	Sensibilidade corneana diminuída ou ausente <input type="text"/>
II	- lesões tróficas e/ou lesões traumáticas <input type="text"/>	- lesões tróficas e/ou lesões traumáticas <input type="text"/>	- lagofalmo e / ou ectrópio <input type="text"/>
	- garras <input type="text"/>	- garras <input type="text"/>	- triquíase <input type="text"/>
	- reabsorção <input type="text"/>	- reabsorção <input type="text"/>	- opacidade corneana central <input type="text"/>
	- mão caída <input type="text"/>	- pé caído <input type="text"/>	- Acuidade visual menor que 0,1 ou não conta dedos a 6 metros <input type="text"/>
NÃO AVALIADA	- não-avaliada <input type="text"/>	- não-avaliada <input type="text"/>	- não-avaliada <input type="text"/>

PROBLEMAS OCULARES OUTROS ACUIDADE VISUAL

Irite Ceratite _____ ESPECIFICAR OD ANOTAR GRAU OE ANOTAR GRAU

RELAÇÃO DOS CONTATOS INTRADOMICILIARES
NÚMERO DE CONTATOS REGISTRADOS:

Nº	NOME	IDADE	SEXO	TEMPO RESID. C/DOENTE	PARENTESCO	Nº DE CICATRIZES DE BCG
01						
02						
03						
04						
05						
06						
07						
08						
09						
10						

Genótipos de *Mycobacterium leprae* definidos no Brasil.

Amostra	Material	Origem	AC8b	GTA9	GGT5	AT17	21-3	AC9	AT15	AC8a	27-5	6-7	TA18	GAA21	TA10	23-3	12-5	18-8	SNP
10B	BP	CE	7	9	4	13	2	8	18	8	5	6	16	12	8	2	4	3	4
44B	BP	CE	8	9	4	13	2	8	22	9	5	6	17	12	8	2	4	3	4
77B	BP	CE	7	10	4	13	2	8	16	9	5	7	15	12	8	2	4	3	4
114B	BP	CE	7	9	4	12	2	8	21	9	5	6	16	12	8	2	4	3	4
1BX	BP	CE	7	9	4	13	2	8	17	8	5	7	31	12	8	2	4	3	4
10BX	BP	CE	7	9	4	12	2	8	13	9	5	6	23	14	8	2	4	3	4
18BX	BP	CE	7	9	4	13	2	8	16	9	5	6	15	11	8	2	4	3	4
26BX	BP	CE	8	10	4	20	2	7	21	8	5	6	16	18	8	2	4	3	4
34BX	BP	CE	8	11	4	17	2	7	14	8	5	6	28	14	8	2	4	3	4
42BX	BP	CE	7	12	4	13	2	8	19	9	4	6	19	11	10	2	4	3	3
50BX	BP	CE	7	9	4	14	2	8	16	9	5	5	14	17	8	2	4	3	4
11B	BP	CE	7	9	4	13	2	8	14	9	5	6	30	12	9	2	4	3	4
49B	BP	CE	8	10	4	14	2	7	25	9	5	7	20	14	8	2	4	3	4
84B	BP	CE	7	9	4	10	2	7	16	9	5	6	19	14	8	2	4	3	4
115B	BP	CE	7	9	4	12	2	8	15	9	5	6	15	12	9	2	4	3	4
2BX	BP	CE	7	12	4	14	2	9	16	8	3	9	15	12	11	2	4	2	3
11BX	BP	CE	7	10	4	10	2	7	21	8	5	6	16	12	9	2	4	3	4
19BX	BP	CE	7	8	4	10	2	7	26	10	5	6	18	16	8	2	4	3	4
27BX	BP	CE	7	9	4	12	2	8	21	9	5	6	16	12	8	2	4	3	4
35BX	BP	CE	7	8	4	14	2	8	19	9	5	6	26	12	8	2	4	3	4
43BX	BP	CE	7	9	4	10	2	8	14	9	5	6	15	13	8	2	4	3	4
51BX	BP	CE	7	10	4	11	2	8	17	9	5	6	17	12	9	2	4	3	4
16B	BP	CE	8	10	4	21	2	7	23	8	5	6	15	15	8	2	4	3	4

Amostra	Material	Origem	AC8b	GTA9	GGT5	AT17	21-3	AC9	AT15	AC8a	27-5	6-7	TA18	GAA21	TA10	23-3	12-5	18-8	SNP
50B	BP	CE	7	10	4	13	2	8	15	10	5	6	25	12	8	2	5	3	4
89B	BP	CE	8	10	4	20	2	7	28	8	5	6	17	14	8	2	4	3	3
3BX	BP	CE	7	ND	ND	ND	ND	7	ND	9	5	6	25	12	8	2	ND	3	ND
118B	BP	CE	8	9	4	17	2	7	23	8	5	6	16	16	8	2	4	3	4
12BX	BP	CE	8	11	4	19	2	9	16	9	5	6	22	11	9	2	4	3	4
20BX	BP	CE	7	10	4	16	2	7	16	8	5	6	14	12	8	2	4	3	4
28BX	BP	CE	8	10	4	16	2	6	30	8	5	6	27	13	8	2	4	3	4
36BX	BP	CE	7	12	4	15	2	7	22	9	2	6	18	14	8	2	4	3	4
44BX	BP	CE	8	10	4	11	2	8	15	8	5	6	26	12	8	2	4	3	4
52BX	BP	CE	8	12	4	13	2	7	20	8	5	8	23	13	8	2	4	3	4
22B	BP	CE	7	9	4	13	2	8	19	9	5	7	17	12	8	2	4	3	4
51B	BP	CE	7	9	4	12	2	8	16	9	5	6	18	12	8	2	4	3	4
95B	BP	CE	8	10	4	18	2	7	33	8	5	6	23	13	8	2	4	3	4
122B	BP	CE	7	8	4	11	2	8	28	9	5	6	21	11	8	2	4	3	4
4BX	BP	CE	7	9	4	14	2	8	18	10	5	7	16	12	9	2	4	3	3
13BX	BP	CE	8	10	4	18	2	7	25	8	5	6	23	19	8	2	4	3	4
21BX	BP	CE	8	10	4	19	2	7	24	8	5	6	16	14	8	2	4	3	4
29BX	BP	CE	8	10	4	20	2	7	20	8	5	6	14	13	8	2	4	3	4
37BX	BP	CE	7	9	4	12	2	8	20	9	5	6	17	10	8	2	5	3	4
45BX	BP	CE	7	10	4	12	2	8	16	9	5	6	21	10	10	2	5	8	3
53BX	BP	CE	7	9	4	12	2	8	15	9	5	6	20	12	8	2	4	3	4
28B	BP	CE	7	9	4	13	2	8	23	9	5	6	17	12	8	2	5	7	4
52B	BP	CE	7	10	4	11	2	8	16	9	5	6	21	12	8	2	4	3	4
126B	BP	CE	8	10	4	15	2	7	18	8	5	6	20	18	8	2	4	3	4

Amostra	Material	Origem	AC8b	GTA9	GGT5	AT17	21-3	AC9	AT15	AC8a	27-5	6-7	TA18	GAA21	TA10	23-3	12-5	18-8	SNP
5BX	BP	CE	7	10	4	13	2	9	17	11	5	6	30	9	8	2	4	3	4
14BX	BP	CE	7	12	4	15	2	7	17	9	2	6	17	15	8	2	4	3	4
22BX	BP	CE	7	15	4	16	2	7	16	8	5	6	14	12	8	2	4	3	4
30BX	BP	CE	7	7	4	16	2	7	20	10	5	7	18	14	8	2	4	3	1
38BX	BP	CE	8	10	4	17	2	7	16	8	5	7	21	14	8	2	4	3	4
46BX	BP	CE	7	10	4	11	2	8	15	8	5	6	21	12	8	2	4	3	4
54BX	BP	CE	7	10	4	12	2	8	16	8	5	6	28	12	8	2	4	3	4
31B	BP	CE	7	12	4	13	2	7	18	8	5	6	19	13	8	2	4	3	4
59B	BP	CE	8	10	4	18	2	7	28	8	5	7	16	14	8	1	4	3	4
101B	BP	CE	7	8	4	19	2	8	12	9	4	7	19	10	10	2	4	3	3
132B	BP	CE	8	10	4	25	2	7	34	8	5	6	14	16	8	2	4	3	4
7BX	BP	CE	7	11	4	12	2	7	30	8	5	6	18	15	8	2	4	3	3
15BX	BP	CE	7	11	4	13	2	9	17	11	5	6	26	10	8	2	5	8	4
23BX	BP	CE	8	11	4	14	2	7	19	8	5	8	31	12	8	2	5	8	4
31BX	BP	CE	8	11	4	12	2	7	13	10	5	6	15	14	8	2	4	3	4
39BX	BP	CE	7	15	4	15	2	7	16	8	5	6	14	12	8	2	4	3	4
47BX	BP	CE	7	9	4	12	2	8	14	10	5	6	17	12	9	2	4	3	4
55BX	BP	CE	7	10	4	13	2	9	17	11	5	6	25	10	10	2	5	3	4
40B	BP	CE	7	6	4	13	2	8	16	10	5	8	28	12	8	2	4	3	4
61B	BP	CE	7	8	4	10	2	7	25	9	5	6	18	13	8	2	4	3	4
107B	BP	CE	8	11	4	18	2	7	21	9	5	6	10	15	8	2	4	3	4
134B	BP	CE	7	10	4	11	2	7	16	9	5	6	14	13	8	2	4	3	4
8BX	BP	CE	8	10	4	17	2	7	28	8	5	6	19	18	8	2	4	3	4
16BX	BP	CE	7	8	4	12	2	8	14	9	5	6	23	13	8	2	4	3	4
24BX	BP	CE	8	10	4	16	2	7	15	8	5	6	18	15	10	2	4	3	4

Amostra	Material	Origem	AC8b	GTA9	GGT5	AT17	21-3	AC9	AT15	AC8a	27-5	6-7	TA18	GAA21	TA10	23-3	12-5	18-8	SNP
32BX	BP	CE	7	9	4	13	2	8	15	9	5	5	25	13	8	2	4	3	4
40BX	BP	CE	8	9	4	13	2	7	22	8	5	6	19	14	9	2	4	3	4
48BX	BP	CE	8	10	4	15	2	7	18	8	5	6	30	17	8	2	4	3	4
98B	BP	CE	8	10	4	17	2	7	26	8	5	7	16	15	8	2	4	3	4
33B	BP	CE	7	10	4	12	2	8	17	9	5	6	19	12	8	2	5	8	4
64B	BP	CE	7	12	4	10	2	7	24	9	4	6	15	ND	8	2	3	3	4
113B	BP	CE	7	9	4	19	2	8	12	9	4	7	19	10	10	2	5	8	3
141B	BP	CE	8	10	4	19	2	7	24	8	5	6	16	14	8	2	4	3	4
9BX	BP	CE	8	10	4	14	2	7	23	8	5	6	20	20	9	2	4	3	4
17BX	BP	CE	8	10	4	21	2	7	29	8	5	7	17	14	8	2	4	3	4
25BX	BP	CE	7	8	4	10	2	7	24	9	5	6	21	14	8	2	4	3	4
33BX	BP	CE	8	10	4	17	2	7	22	8	5	6	25	16	8	2	4	3	4
41BX	BP	CE	7	8	4	11	2	7	19	9	5	6	18	13	9	2	4	3	4
49BX	BP	CE	7	9	4	12	2	8	16	9	5	6	20	12	8	2	4	3	4
56BX	BP	CE	8	10	4	19	2	7	32	8	5	6	25	13	8	2	4	3	4
64BX	BP	CE	8	11	4	22	2	7	20	8	5	6	25	14	8	2	4	3	4
72BX	BP	CE	7	9	4	15	2	9	25	9	5	6	13	16	8	2	5	3	4
80BX	BP	CE	8	11	4	11	2	7	28	8	5	6	29	14	8	2	4	3	4
57BX	BP	CE	7	12	4	14	2	7	19	9	2	6	16	17	8	2	4	3	4
65BX	BP	CE	7	9	4	12	2	8	14	9	5	6	25	13	8	2	4	3	4
73BX	BP	CE	7	9	4	11	2	8	18	10	5	7	17	13	9	1	5	7	1
81BX	BP	CE	7	11	4	15	2	7	24	9	5	6	18	17	9	1	4	8	1
58BX	BP	CE	7	13	4	13	2	7	23	8	5	6	21	12	9	2	4	3	4
66BX	BP	CE	7	9	4	11	2	8	21	9	5	6	22	12	8	2	4	3	4

Amostra	Material	Origem	AC8b	GTA9	GGT5	AT17	21-3	AC9	AT15	AC8a	27-5	6-7	TA18	GAA21	TA10	23-3	12-5	18-8	SNP
74BX	BP	CE	8	10	4	15	2	7	28	8	5	6	22	14	8	2	4	3	4
59BX	BP	CE	7	9	4	11	2	8	21	9	5	6	25	12	8	2	4	3	4
67BX	BP	CE	7	9	4	13	2	8	23	9	5	6	19	12	8	2	4	3	4
75BX	BP	CE	8	10	4	18	2	7	25	8	5	6	23	19	8	2	4	3	4
60BX	BP	CE	7	11	4	11	2	7	16	8	5	6	15	13	8	2	4	3	4
68BX	BP	CE	8	11	4	13	2	8	13	9	5	6	14	10	8	2	4	3	4
76BX	BP	CE	8	10	4	11	2	7	16	8	5	6	16	15	8	2	4	3	4
61BX	BP	CE	7	12	4	13	2	7	23	8	5	6	20	15	8	1	4	7	4
69BX	BP	CE	8	10	4	20	2	7	27	8	5	10	23	14	8	2	4	3	4
77BX	BP	CE	8	10	4	20	2	7	29	8	5	7	15	14	8	2	4	3	4
62BX	BP	CE	7	9	4	13	2	8	16	9	5	6	15	11	8	2	4	3	4
70BX	BP	CE	7	8	4	14	2	7	18	9	5	6	25	12	8	2	4	3	4
78BX	BP	CE	7	9	4	11	2	7	19	9	5	6	16	12	8	2	4	3	4
63BX	BP	CE	7	11	4	11	2	8	24	11	4	6	16	10	10	2	5	8	3
71BX	BP	CE	7	8	4	12	2	8	14	9	5	6	17	13	8	2	4	3	4
79BX	BP	CE	7	9	4	12	2	8	26	9	5	6	25	12	8	2	4	3	4
0301001	BP	CE	7	9	4	14	2	8	14	9	5	6	16	12	9	2	4	3	4
0301004	BP	CE	7	10	4	12	2	8	15	8	5	6	21	12	8	2	4	3	4
0301005	BP	CE	7	9	4	12	2	8	21	9	5	6	20	12	8	2	4	3	4
0301006	BP	CE	7	15	4	15	2	6	11	8	5	6	14	12	8	2	4	3	4
0301007	BP	CE	7	10	4	17	2	7	19	8	5	6	30	15	8	2	4	3	4
0301008	BP	CE	7	9	4	11	2	7	21	9	5	7	25	10	8	2	4	3	4
0301009	BP	CE	7	9	4	12	2	8	14	8	5	6	21	13	8	2	4	3	4
0301010	BP	CE	7	10	4	18	2	7	26	8	5	7	25	14	8	2	4	ND	3

Amostra	Material	Origem	AC8b	GTA9	GGT5	AT17	21-3	AC9	AT15	AC8a	27-5	6-7	TA18	GAA21	TA10	23-3	12-5	18-8	SNP
0301011	BP	CE	7	12	4	14	2	7	13	9	5	6	16	12	8	2	4	3	4
0301013	BP	CE	7	10	4	17	2	7	28	8	5	6	26	17	8	2	4	3	4
0301014	BP	CE	7	10	4	18	2	7	25	8	5	7	16	14	8	2	4	3	1
0301015	BP	CE	7	11	4	16	2	8	11	9	5	6	13	11	10	1	4	8	3
0301016	BP	CE	8	9	4	13	2	7	23	8	5	6	26	19	8	2	4	3	4
0301018	BP	CE	7	10	4	13	2	8	12	8	5	6	22	11	8	2	4	3	4
0301019	BP	CE	7	10	4	14	2	9	15	9	5	6	21	10	13	2	4	3	4
0301020	BP	CE	8	10	4	15	2	7	11	8	5	6	20	17	8	2	4	3	4
0301021	BP	CE	7	11	4	13	2	8	24	9	4	6	17	10	10	2	5	8	3
0301022	BP	CE	7	9	4	10	2	7	15	9	5	6	17	15	8	2	4	3	4
0301024	BP	CE	8	10	4	15	2	7	15	8	5	6	14	14	8	2	4	3	4
0301027	BP	CE	7	9	4	13	2	10	18	9	5	6	25	12	8	2	4	3	4
0301028	BP	CE	7	9	4	13	2	8	19	9	5	6	16	12	8	2	4	8	4
0301030	BP	CE	7	8	4	11	2	8	12	9	5	6	16	13	8	2	4	3	4
0302024	BP	CE	7	9	3	13	ND	ND	ND	9	5	6	26	10	ND	2	ND	8	3
Idemar	BP	PE	7	15	4	12	2	8	14	8	4	7	15	10	10	2	5	8	3
Eraldo	BP	PE	8	7	4	18	2	7	20	8	5	6	18	15	8	2	4	3	4
105-04	Z-N	PE	8	11	4	15	2	7	18	8	5	7	19	14	9	2	4	3	4
159-04	Z-N	PE	ND	10	4	ND	2	7	16	10	5	7	26	10	ND	1	4	ND	ND
177-04	Z-N	PE	8	13	4	14	2	8	15	8	6	6	16	17	11	1	4	7	1
79-05	Z-N	PE	8	10	4	16	2	7	32	8	5	6	20	14	8	2	4	3	4
119-05	Z-N	PE	ND	15	4	12	2	8	12	9	4	7	17	12	10	2	ND	ND	3
133-05	Z-N	PE	8	10	4	16	2	7	27	8	5	6	17	14	8	2	4	8	4
134-05	Z-N	PE	7	14	4	10	2	8	12	10	4	6	22	12	10	2	5	8	4

Amostra	Material	Origem	AC8b	GTA9	GGT5	AT17	21-3	AC9	AT15	AC8a	27-5	6-7	TA18	GAA21	TA10	23-3	12-5	18-8	SNP
13-06	Z-N	PE	ND	10	4	16	2	8	21	10	ND	6	22	15	10	2	4	ND	4
21-06	Z-N	PE	ND	ND	4	10	ND	ND	ND	ND	4	7	20	13	11	2	5	8	3
23-06	Z-N	PE	7	10	4	14	2	7	15	8	5	6	21	12	8	2	4	3	4
52-06	Z-N	PE	7	9	4	10	2	8	19	9	4	6	31	11	10	2	5	ND	3
85-06	Z-N	PE	8	10	4	15	2	7	31	8	5	6	17	15	8	2	4	8	4
113-06	Z-N	PE	8	9	4	17	2	7	23	8	5	6	20	17	8	2	4	3	4
015-07	Z-N	PE	7	7	5	14	2	8	18	8	5	6	25	13	9	2	3	8	3
196-07	Z-N	PE	7	10	4	10	2	8	20	7	5	6	25	13	8	2	4	3	4
POC902	BP	RO	7	10	4	11	2	8	22	8	5	6	25	12	8	2	4	3	4
POC987	BP	RO	7	8	4	12	2	8	16	9	5	6	26	12	5	2	4	3	4
POC3711	BP	RO	7	8	4	16	2	8	15	9	5	6	16	15	10	1	5	8	1
POC3788	BP	RO	7	9	4	11	2	8	18	9	5	7	26	14	8	2	4	3	4
POC3791	BP	RO	7	9	4	11	1	8	27	9	4	6	15	9	9	2	5	3	3
POC3792	BP	RO	8	10	4	20	2	7	21	8	5	6	26	15	8	2	4	3	4
POC3794	BP	RO	7	9	4	11	2	8	23	9	4	6	16	9	9	2	5	3	3
POC3821	BP	RO	7	9	4	12	1	8	19	9	5	6	10	12	9	1	4	8	1
POC3829	BP	RO	7	9	4	10	2	8	16	9	4	7	17	13	11	2	5	3	3
POC3846	BP	RO	7	10	4	14	2	8	15	9	4	7	13	16	13	2	5	8	3
POC3848	BP	RO	7	9	4	11	2	8	14	10	4	6	17	11	10	2	5	8	3
POC202991	BP	RO	7	12	4	11	2	8	15	10	4	7	16	11	15	2	5	3	3
MC715	BP	RO	7	9	4	14	2	8	14	9	5	7	26	14	8	2	4	3	4
MC2818	BP	RO	7	10	4	12	2	8	17	9	5	6	14	13	8	2	4	3	4
MC6986	BP	RO	7	11	4	12	2	8	14	9	4	6	15	11	7	2	5	3	3
MC7829	BP	RO	7	11	3	10	2	9	14	9	4	7	15	13	12	2	5	3	3

Amostra	Material	Origem	AC8b	GTA9	GGT5	AT17	21-3	AC9	AT15	AC8a	27-5	6-7	TA18	GAA21	TA10	23-3	12-5	18-8	SNP
MC8464	BP	RO	7	8	4	14	2	8	13	8	5	6	23	12	8	2	4	3	4
MC9783	BP	RO	7	9	4	14	2	8	ND	9	5	7	26	14	8	2	4	8	4
L01	Z-N	RO	7	9	5	10	2	8	14	9	4	6	12	12	11	2	5	9	3
L02	Z-N	RO	7	8	4	12	2	7	13	9	5	7	14	12	8	2	5	8	3
L04	Z-N	RO	7	9	4	9	2	8	15	10	4	6	14	10	13	2	5	9	3
L06	Z-N	RO	7	9	4	12	2	8	15	9	5	6	17	12	8	2	4	3	4
L10	Z-N	RO	7	10	4	14	2	7	24	8	5	6	23	11	8	2	4	3	3
L13	Z-N	RO	7	10	4	12	2	8	21	9	4	6	16	10	10	2	5	8	3
L15	Z-N	RO	7	9	4	11	2	8	23	9	4	6	16	9	9	2	5	3	3
L16	Z-N	RO	ND	10	4	20	2	8	21	8	5	6	22	10	8	2	4	3	4
L19	Z-N	RO	7	10	4	10	2	8	16	9	4	7	15	13	11	2	5	3	4
L21	Z-N	RO	7	9	4	12	2	8	15	9	5	6	29	12	8	2	4	3	4
L22	Z-N	RO	ND	8	ND	15	ND	ND	ND	ND	ND	6	18	11	10	2	5	ND	3
L23	Z-N	RO	7	10	4	13	2	8	21	9	4	6	16	9	9	2	5	8	3
L24	Z-N	RO	7	10	4	11	2	8	18	9	5	6	16	13	8	2	4	3	4
L30	Z-N	RO	7	9	4	11	1	8	22	9	5	6	10	10	9	1	4	8	1
L36	Z-N	RO	7	11	4	11	2	8	17	9	4	6	17	12	11	2	5	9	4
L42	Z-N	RO	7	10	4	14	2	8	20	10	4	6	21	11	10	2	5	4	3
L51	Z-N	RO	7	8	4	10	2	8	21	9	5	6	25	13	9	2	4	3	4
0101005	BP	RJ	7	10	4	12	2	8	20	9	4	6	19	10	11	2	6	8	3
0101006	BP	RJ	7	11	4	16	2	8	18	9	4	7	20	14	9	2	5	8	3
0101007	BP	RJ	7	10	4	12	2	8	17	9	4	6	18	12	9	2	6	8	3
0101009	BP	RJ	8	11	4	19	2	7	19	8	5	7	19	10	8	2	4	3	4
F 18/03	BP	RJ	7	8	4	13	2	8	14	9	4	7	15	11	11	2	5	8	3

Amostra	Material	Origem	AC8b	GTA9	GGT5	AT17	21-3	AC9	AT15	AC8a	27-5	6-7	TA18	GAA21	TA10	23-3	12-5	18-8	SNP
F 19/03	BP	RJ	7	10	4	14	2	8	23	10	4	7	18	12	9	2	5	8	3
F 05/05	BP	RJ	7	12	4	12	2	8	21	9	4	7	25	10	10	2	5	9	3
F 11/05	BP	RJ	7	10	4	11	2	8	19	9	5	6	21	14	8	2	4	3	4
VGR (1A)	Z-N	RJ	6	9	6	9	2	8	16	9	4	6	17	11	11	2	5	5	4
MFMS (5A)	Z-N	RJ	7	10	4	14	2	8	22	10	4	7	18	12	9	2	5	8	4
IPG (6A)	Z-N	RJ	7	9	4	11	2	8	14	9	4	7	15	11	10	2	5	8	ND
AN (8A)	Z-N	RJ	8	9	4	14	2	7	24	8	5	6	17	16	8	2	4	3	3
GRM (9A)	Z-N	RJ	ND	10	4	13	2	8	ND	10	ND	6	17	12	ND	ND	ND	ND	3
DS (10A)	Z-N	RJ	8	9	4	20	2	8	29	8	5	6	10	13	8	2	4	3	3
LBD (11A)	Z-N	RJ	7	7	4	10	2	7	22	10	4	6	15	13	10	2	5	9	3
GTM (13A)	Z-N	RJ	7	9	4	11	2	8	7	9	4	6	29	11	10	2	5	ND	3
21633	BP	RJ	7	11	4	14	2	8	16	8	5	6	19	13	6	2	4	8	1
21850	BP	RJ	7	11	4	14	2	8	15	8	5	6	18	13	6	2	4	8	1
19936	BP	RJ	7	11	4	12	2	8	13	9	5	6	ND	17	4	2	4	8	1
20255	BP	RJ	7	10	4	9	2	8	21	9	5	6	10	19	5	2	4	8	1
21392	BP	RJ	7	12	4	15	2	8	14	8	5	6	20	13	6	2	4	8	1
22636	BP	RJ	7	12	4	14	2	8	16	7	5	6	18	13	6	2	4	8	1
21920	BP	RJ	7	11	4	14	2	8	15	8	5	6	19	13	6	2	4	8	ND
20825	BP	RJ	ND	10	4	11	2	8	16	9	5	6	ND	19	5	2	3	8	ND
20822	BP	RJ	7	9	4	12	2	8	17	7	5	5	32	10	7	2	4	5	4
20180	BP	RJ	7	15	4	14	2	8	14	9	5	6	17	12	10	2	4	6	4
23353	BP	RJ	7	11	4	13	2	7	17	8	5	5	12	9	8	2	4	6	4
MLT	BP	RJ	7	9	4	12	2	8	19	9	5	6	17	12	5	2	4	8	4
21706	BP	RJ	7	15	4	14	2	7	13	8	4	6	ND	12	7	2	4	8	4

Amostra	Material	Origem	AC8b	GTA9	GGT5	AT17	21-3	AC9	AT15	AC8a	27-5	6-7	TA18	GAA21	TA10	23-3	12-5	18-8	SNP
23825	BP	RJ	8	15	4	15	2	8	10	8	4	6	21	16	8	2	3	8	3
21548	BP	RJ	7	10	4	11	2	8	10	8	4	7	ND	11	8	2	4	8	3
21263	BP	RJ	7	10	4	11	2	8	10	8	4	7	18	11	9	2	4	9	3
21866	BP	RJ	7	10	4	11	2	8	10	8	4	7	ND	11	12	2	4	8	3
22368	BP	RJ	7	9	4	14	2	8	10	8	4	7	14	15	11	2	4	8	3
21898	BP	RJ	7	11	4	11	2	9	18	9	4	6	ND	11	6	2	5	8	3
21844	BP	RJ	7	12	4	15	2	8	14	9	4	6	ND	10	9	2	5	8	3
21372	BP	RJ	7	12	4	15	2	8	19	9	4	5	14	10	9	2	5	8	3
21230	BP	RJ	7	12	4	15	2	8	20	9	4	5	14	10	9	2	5	8	3
19930	BP	RJ	7	9	4	10	2	8	16	10	4	6	ND	11	7	2	5	9	3
19856	BP	RJ	7	8	4	16	2	8	19	9	4	5	16	12	7	2	5	8	3
19914	BP	RJ	7	10	4	14	2	8	23	10	4	6	18	13	6	2	5	8	3
20008	BP	RJ	7	9	4	12	2	8	20	9	4	6	20	12	8	2	5	6	3
20241	BP	RJ	7	10	3	10	2	8	18	10	4	8	14	11	8	2	5	9	3
20368	BP	RJ	7	10	4	13	2	8	19	9	4	6	15	10	7	2	5	8	3
21190	BP	RJ	7	10	4	11	2	8	25	9	4	6	20	12	10	2	5	8	3
21644	BP	RJ	7	10	4	11	2	9	15	9	4	5	15	13	9	2	5	6	3
21726	BP	RJ	7	11	4	14	2	8	28	9	4	6	23	10	7	2	5	8	3
22494	BP	RJ	7	8	4	13	2	8	20	9	4	7	14	11	6	2	5	8	3
22670	BP	RJ	7	11	3	11	2	8	17	10	4	7	14	14	8	2	5	9	3
22830	BP	RJ	7	9	4	13	2	8	24	9	4	6	18	11	7	2	5	8	3
23186	BP	RJ	7	9	4	12	2	8	14	9	4	7	15	11	7	2	5	8	3
23321	BP	RJ	7	9	4	12	2	8	18	10	4	7	23	10	9	2	5	8	3
23806	BP	RJ	7	9	4	11	2	8	15	10	4	6	17	11	6	2	5	9	3

Amostra	Material	Origem	AC8b	GTA9	GGT5	AT17	21-3	AC9	AT15	AC8a	27-5	6-7	TA18	GAA21	TA10	23-3	12-5	18-8	SNP
Genildo (001)	ND	RJ	ND	ND	ND	ND	2	7	14	8	4	6	ND	10	8	2	5	6	ND
Inaldi (002)	ND	RJ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	10	2	5	8	ND
20476	BP	RJ	7	9	4	9	2	8	15	11	4	6	21	11	9	2	5	8	ND
21847	BP	RJ	7	11	4	11	2	9	17	9	4	6	ND	11	6	2	5	8	ND
ZR	BP	SP	7	10	4	10	2	8	15	8	4	6	ND	11	6	2	5	8	3
501	BP	SP	7	10	4	10	2	8	15	8	4	6	ND	11	9	2	5	6	3
540	BP	SP	7	7	4	10	2	8	13	8	4	6	16	13	9	2	5	7	3
548	BP	SP	7	12	4	12	2	8	11	8	4	6	14	15	10	2	5	6	3
LS	BP	SP	7	10	4	10	2	8	15	9	4	6	ND	11	6	2	5	8	3
AH	BP	SP	7	9	4	10	2	8	14	9	4	6	ND	11	7	2	5	9	3
JBF	BP	SP	7	9	4	13	2	8	15	9	4	7	15	13	7	2	5	8	3
RM	BP	SP	7	12	4	12	2	8	17	9	4	6	15	11	7	2	5	8	3
379	BP	SP	7	10	4	14	2	8	16	9	4	6	18	10	9	2	5	8	3
476	BP	SP	7	10	4	14	2	8	24	9	4	6	ND	10	7	2	5	8	3
478	BP	SP	7	10	4	12	2	8	19	9	4	6	16	9	8	2	5	8	3
484	BP	SP	7	10	4	14	2	8	19	9	4	6	20	12	12	2	5	8	3
510	BP	SP	7	9	4	15	2	8	21	9	4	6	14	10	8	2	5	8	3
512	BP	SP	7	9	4	14	2	8	26	9	4	6	14	10	11	2	5	8	3
518	BP	SP	7	12	4	11	2	9	22	9	3	7	15	14	11	2	5	6	3
535	BP	SP	7	10	4	14	2	8	14	9	4	6	20	12	10	2	5	3	3
537	BP	SP	7	13	4	14	2	8	16	9	4	6	14	10	10	2	5	8	3
539	BP	SP	7	9	4	12	2	8	12	9	4	7	16	11	10	2	5	8	3
551	BP	SP	7	10	4	11	2	9	21	9	4	6	17	10	7	2	5	7	3
555	BP	SP	7	9	4	10	2	8	21	9	4	6	21	14	7	2	5	9	3

Amostra	Material	Origem	AC8b	GTA9	GGT5	AT17	21-3	AC9	AT15	AC8a	27-5	6-7	TA18	GAA21	TA10	23-3	12-5	18-8	SNP
556	BP	SP	7	9	4	13	2	8	15	9	4	7	ND	13	10	2	5	6	3
557	BP	SP	7	9	4	10	2	8	18	9	4	6	ND	11	10	2	5	9	3
558	BP	SP	7	8	4	13	2	8	13	9	4	7	ND	11	6	2	5	8	3
564	BP	SP	7	10	4	14	2	8	21	9	4	6	18	10	7	2	5	8	3
567	BP	SP	7	9	4	14	2	8	15	9	4	6	14	10	11	2	5	8	3
569	BP	SP	7	10	4	9	2	8	19	9	4	6	14	12	12	2	5	9	3
570	BP	SP	7	9	4	13	2	8	19	9	4	6	13	10	11	2	5	8	3
571	BP	SP	7	10	4	11	2	8	25	9	4	6	15	10	10	2	5	7	3
585	BP	SP	7	12	4	13	2	8	17	9	4	6	ND	11	12	2	5	ND	3
588	BP	SP	7	9	4	10	2	7	13	9	4	6	ND	10	10	2	5	9	3
PFM	BP	SP	7	10	4	12	2	8	15	9	4	6	16	10	7	2	5	8	3
545	BP	SP	7	9	4	13	2	7	15	10	4	6	ND	11	8	2	5	8	3
479	BP	SP	7	10	4	11	2	8	28	11	4	6	14	10	10	2	5	8	3
578	BP	SP	ND	10	3	11	2	8	21	11	4	7	15	12	11	2	5	8	3
582	BP	SP	7	10	4	13	2	8	13	9	5	6	ND	10	8	2	4	ND	3
580	BP	SP	ND	11	4	14	2	9	17	8	ND	6	14	15	12	2	ND	2	3
581	BP	SP	8	10	4	20	2	6	15	8	5	6	20	14	8	2	4	3	4
586	BP	SP	ND	11	4	12	2	8	ND	10	4	5	ND	10	8	2	5	3	ND
JPS	BP	SP	7	9	4	13	2	8	21	10	5	6	ND	12	8	2	4	3	ND
AAB	BP	SP	ND	10	ND	11	ND	8	17	8	4	6	ND	10	10	2	ND	ND	ND
565	BP	SP	7	10	4	10	ND	8	12	9	4	6	ND	12	11	2	5	8	ND
RAS	BP	AM	7	9	4	13	2	8	17	10	4	8	14	13	9	1	5	7	1
577	BP	AM	7	10	4	13	2	8	17	9	5	6	14	13	10	2	4	8	1

Amostra	Material	Origem	AC8b	GTA9	GGT5	AT17	21-3	AC9	AT15	AC8a	27-5	6-7	TA18	GAA21	TA10	23-3	12-5	18-8	SNP
544	BP	MG	7	11	3	10	2	8	16	10	4	6	14	10	11	2	5	7	3
JRB	BP	MG	7	9	4	13	2	8	15	9	4	7	15	13	7	2	5	8	3
594	BP	MT	7	11	4	13	2	8	14	8	4	6	ND	11	11	2	5	9	3
566	BP	RS	7	11	4	12	2	8	12	9	4	6	17	11	10	2	5	8	3
568	BP	PA	7	10	4	18	2	7	26	8	5	6	ND	13	8	2	4	6	4

BP: biópsia de pele; Z-N: esfregaços dérmicos fixados em lâmina de baciloscopia; CE: Ceará; PE: Pernambuco; RO: Rondônia; RJ: Rio de Janeiro; SP: São Paulo; AM: Amazonas; MG: Minas Gerais; MT: Mato Grosso; RS: Rio Grande do Sul; PA: Pará; ND: não definido.

Genótipos de *Mycobacterium leprae* originários de outros países.

Amostra	País de origem	AC8b	GTA9	GGT5	AT17	21-3	AC9	AT15	AC8a	27-5	6-7	TA18	GAA21	12-5	23-3
NIH1	Tai	8	9	4	21	2	9	20	10	5	7	11	12	4	2
NIH2	Tai	8	8	4	10	2	9	13	10	5	5	21	23	4	2
NIH3	Tai	6	10	4	11	2	7	13	10	5	6	14	16	4	2
NIH4	Tai	8	9	4	11	2	7	18	7	5	6	21	26	4	2
NIH5	Tai	7	10	4	14	3	9	13	9	5	5	13	17	4	2
NIH6	Tai	7	9	5	13	3	7	14	10	5	6	13	19	4	2
NIH7	Tai	8	8	6	9	2	8	15	10	5	6	16	42	4	2
NIH8	Tai	7	10	5	13	3	7	11	9	5	6	12	18	4	2
NIH9	Tai	7	8	5	13	3	7	13	9	5	6	11	18	4	2
NIH10	Tai	6	10	4	12	2	9	15	7	5	6	14	10	4	2
NIH11	Tai	6	9	4	12	2	8	20	9	5	6	20	17	4	2
NIH12	Tai	8	12	4	10	2	9	13	10	5	6	18	26	4	2
NIH13	Tai	8	9	4	11	2	8	21	11	5	6	18	28	4	2
NIH14	Tai	7	9	5	14	3	10	14	10	5	5	12	16	4	2
NIH15	Tai	7	9	5	14	3	7	14	10	5	6	11	17	4	2
NIH16	Tai	7	9	5	10	3	7	12	10	5	6	11	10	4	2
NIH17	Tai	7	7	5	12	2	8	15	10	5	6	11	14	3	2
NIH18	Tai	7	9	5	18	3	7	11	11	5	6	15	19	4	2
NIH19	Tai	7	9	4	13	2	7	17	10	5	6	11	21	4	2
NIH20	Tai	8	10	4	16	2	8	14	11	4	6	12	18	4	2
NIH21	Tai	6	11	4	15	2	8	16	9	5	6	13	12	4	2
NIH22	Tai	8	12	4	8	2	9	16	6	5	6	19	19	4	2

Amostra	País de origem	AC8b	GTA9	GGT5	AT17	21-3	AC9	AT15	AC8a	27-5	6-7	TA18	GAA21	12-5	23-3
NIH23	Tai	8	11	4	10	2	8	23	10	5	6	15	25	4	2
NIH24	Tai	9	8	4	9	2	8	23	10	5	6	16	34	4	2
NIH25	Tai	9	10	4	10	2	8	26	11	5	6	24	25	4	2
NIH26	Tai	8	9	5	10	2	8	23	10	5	6	20	30	4	2
NIH27	Tai	7	8	5	13	3	7	12	10	5	6	13	17	4	2
NIH28	Tai	7	9	6	13	3	7	15	7	5	6	14	18	4	2
NIH29	Tai	7	9	5	13	3	8	13	11	5	6	11	21	4	2
NIH30	Tai	6	12	4	11	2	8	15	12	5	6	18	19	4	2
NIH31	Tai	7	10	4	14	3	8	13	10	5	6	11	18	4	2
NIH32	Tai	6	11	5	12	3	8	15	9	5	6	12	12	4	2
NIH33	Tai	6	11	4	13	2	8	15	7	5	6	23	30	4	2
NIH34	Tai	8	10	4	12	2	8	20	8	5	7	16	26	4	2
NIH35	Tai	7	9	5	17	3	7	15	10	5	6	11	29	4	2
NIH36	Tai	7	9	5	13	3	7	14	8	5	6	9	23	4	2
NIH37	Tai	7	9	5	14	3	7	13	10	5	6	11	19	4	2
NIH38	Tai	7	10	5	11	3	10	22	9	5	5	12	15	4	2
NIH39	Tai	7	9	5	19	3	7	12	10	5	6	12	16	3	2
NIH40	Tai	7	9	5	23	3	8	11	10	5	6	12	15	3	2
NIH41	Tai	7	9	5	16	3	7	12	10	5	6	12	16	3	2
NIH42	Tai	7	9	5	16	3	7	11	10	5	6	12	15	3	2
NIH43	Tai	6	12	4	20	2	8	18	8	5	6	17	16	4	2
NIH44	Tai	8	10	4	19	2	8	14	10	5	6	13	14	4	2
NIH45	Tai	6	9	5	10	2	9	14	10	4	6	17	15	4	2

Amostra	País de origem	AC8b	GTA9	GGT5	AT17	21-3	AC9	AT15	AC8a	27-5	6-7	TA18	GAA21	12-5	23-3
MEL/BPRC/077	Índ	7	13	4	14	2	7	18	9	5	6	15	15	4	2
MEL/BPRC/078	Índ	7	14	4	14	2	7	23	9	5	6	15	15	4	2
MEL/BPRC/090	Índ	8	17	4	9	2	7	11	8	5	7	19	14	4	3
MEL/BPRC/091	Índ	7	10	4	14	2	8	22	10	5	6	14	14	4	2
MEL/BPRC/079	Índ	7	8	4	12	2	9	13	10	5	6	17	12	4	2
MEL/BPRC/080	Índ	7	8	4	12	2	8	12	8	5	6	11	17	4	2
MEL/BPRC/087	Índ	7	10	4	11	2	9	13	8	5	6	9	13	4	2
MEL/BPRC/083	Índ	7	9	4	12	2	9	13	8	5	6	12	15	4	2
MEL/BPRC/035	Índ	8	9	4	12	2	8	14	6	5	6	10	17	4	2
MEL/BPRC/052	Índ	7	9	4	11	2	10	13	8	5	6	12	15	4	2
MEL/BPRC/067	Índ	7	10	4	14	2	9	18	8	5	6	11	15	4	2
MEL/BPRC/028	Índ	7	10	4	13	2	8	15	9	5	6	18	22	4	2
MEL/BPRC/084	Índ	7	9	4	11	1	9	17	9	5	6	12	15	4	2
MEL/BPRC/021	Índ	7	10	4	13	2	8	13	10	5	7	20	23	4	2
MEL/BPRC/073	Índ	7	7	4	11	2	9	15	8	5	6	10	12	4	2
MEL/BPRC/003	Índ	7	8	4	12	2	10	18	8	5	6	10	14	4	2
MEL/BPRC/093	Índ	7	9	4	13	2	9	15	10	5	6	12	15	4	2
MEL/BPRC/024	Índ	7	11	4	12	2	8	14	9	5	7	9	17	4	2
MEL/BPRC/057	Índ	7	13	4	11	2	8	16	8	5	6	11	16	5	2
MEL/BPRC/004	Índ	9	12	4	10	2	7	13	10	5	9	18	15	4	2
MEL/BPRC/050	Índ	7	9	4	10	2	9	13	8	5	7	10	19	4	2
MEL/BPRC/074	Índ	7	9	5	11	2	8	19	10	5	7	16	21	4	2
MEL/BPRC/009	Índ	7	10	4	11	2	9	14	9	5	6	10	12	4	2

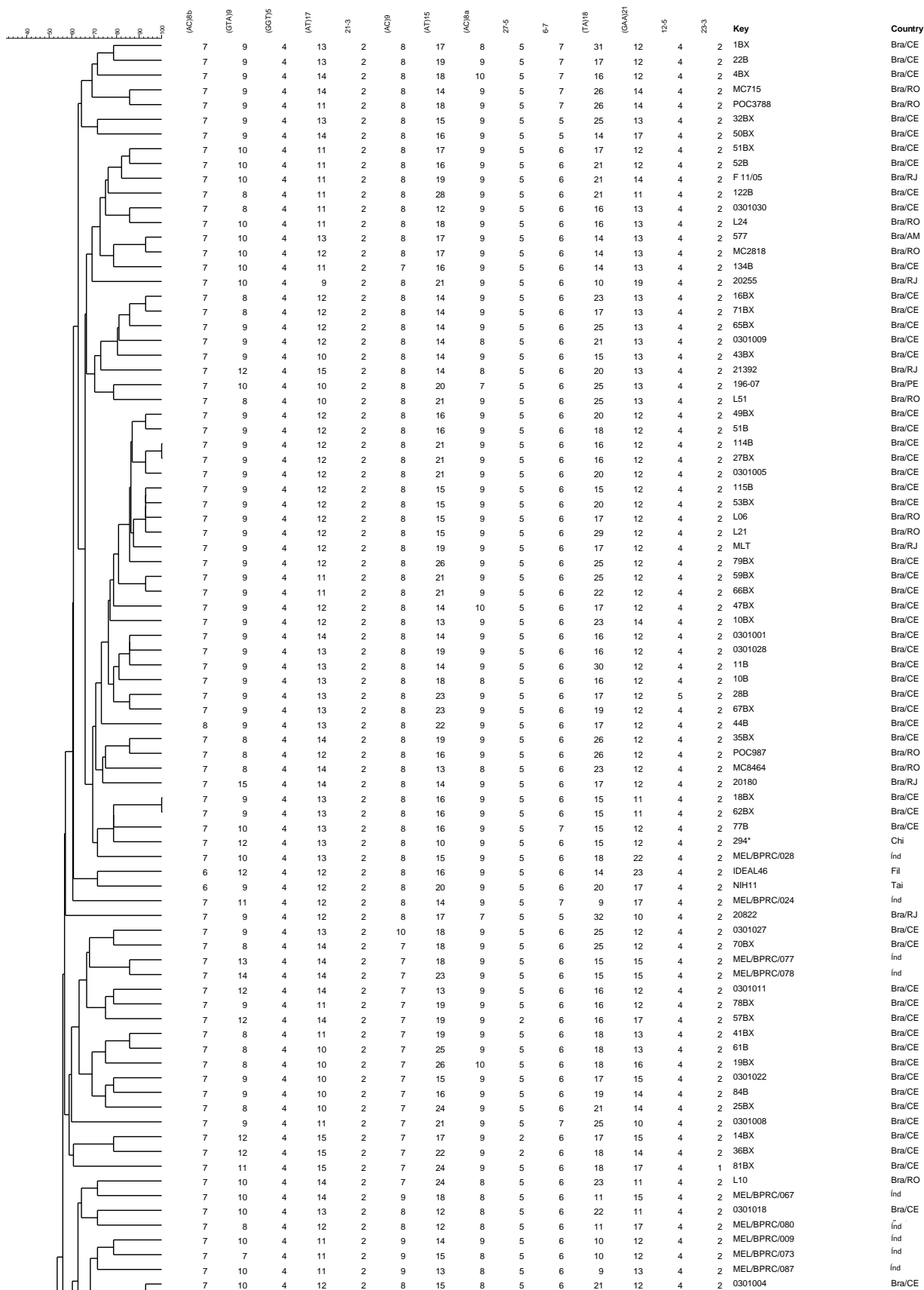
Amostra	País de origem	AC8b	GTA9	GGT5	AT17	21-3	AC9	AT15	AC8a	27-5	6-7	TA18	GAA21	12-5	23-3
MEL/BPRC/014	Índ	7	9	4	13	2	7	18	8	5	6	13	21	4	2
MEL/BPRC/019	Índ	8	10	4	11	2	7	18	10	5	7	15	19	4	2
MEL/BPRC/020	Índ	8	11	4	9	2	8	16	10	5	10	16	23	4	2
MEL/BPRC/101	Índ	7	10	4	13	2	8	25	10	5	8	16	20	4	2
MEL/BPRC/089	Índ	7	9	5	11	1	7	14	8	5	6	12	11	4	2
MEL/BPRC/065	Índ	7	13	4	13	2	8	15	8	5	6	16	16	4	2
MEL/BPRC/103	Índ	7	11	4	11	2	7	17	7	5	6	16	13	4	2
14 AD-232	Col	7	12	4	14	2	8	15	9	4	5	18	10	5	2
19 CB-1	Col	7	6	4	14	2	8	14	9	5	9	18	12	4	1
31 CB-48	Col	7	9	4	12	2	8	16	9	4	5	14	11	5	2
35 CB-54	Col	7	9	4	13	2	8	14	9	4	5	16	11	5	2
287*	Chi	8	9	4	13	2	9	16	12	5	8	23	19	3	2
298*	Chi	8	9	4	13	2	9	16	11	5	8	20	22	3	2
299*	Chi	8	9	4	14	2	9	15	11	5	8	22	22	3	2
302*	Chi	8	9	4	13	2	9	18	10	5	8	20	28	3	2
312*	Chi	8	9	4	14	2	9	15	11	5	8	21	22	3	2
289*	Chi	7	10	4	18	2	9	14	8	5	7	16	16	4	2
300*	Chi	8	25	4	15	2	8	15	10	5	8	14	13	3	2
303*	Chi	8	12	4	15	2	8	22	10	5	8	12	20	3	2
304*	Chi	8	24	4	14	2	8	13	10	5	7	21	23	3	2
307*	Chi	8	24	4	14	2	8	13	10	5	7	21	23	3	2
314*	Chi	8	47	4	17	2	9	13	7	5	7	19	20	3	2
293*	Chi	9	19	4	13	2	8	17	12	5	9	15	15	3	2

Amostra	País de origem	AC8b	GTA9	GGT5	AT17	21-3	AC9	AT15	AC8a	27-5	6-7	TA18	GAA21	12-5	23-3
294*	Chi	7	12	4	13	2	8	10	9	5	6	15	12	4	2
308*	Chi	7	26	4	9	2	7	12	8	5	9	11	12	3	2
309*	Chi	10	25	4	14	2	7	20	9	5	8	16	18	3	2
310*	Chi	7	17	4	12	2	9	16	10	5	10	14	11	3	3
IDEAL6	Fil	8	9	5	14	3	9	15	9	5	7	20	24	5	2
IDEAL7	Fil	9	9	5	15	2	8	17	9	5	6	14	36	4	2
IDEAL8	Fil	7	9	5	17	3	9	16	10	5	7	18	21	5	2
IDEAL9	Fil	6	9	5	10	2	8	17	9	5	7	15	16	5	2
IDEAL10	Fil	7	9	6	14	3	8	20	10	5	7	24	23	4	2
IDEAL11	Fil	8	9	5	13	3	9	15	9	5	8	21	19	4	2
IDEAL13	Fil	7	10	4	14	1	9	14	9	5	7	17	20	4	2
IDEAL14	Fil	8	9	5	15	3	9	14	9	5	7	19	25	5	2
IDEAL17	Fil	8	8	5	13	3	8	14	10	5	6	22	27	4	2
IDEAL19	Fil	8	11	4	15	2	8	19	8	5	6	13	9	4	2
IDEAL20	Fil	7	12	5	13	3	8	22	9	5	7	21	31	4	2
IDEAL23	Fil	8	9	5	20	3	9	15	8	4	8	25	19	4	2
IDEAL24	Fil	8	9	5	13	3	9	11	8	5	7	14	16	4	2
IDEAL26	Fil	8	11	5	12	3	9	16	9	5	7	19	21	4	2
IDEAL27	Fil	8	11	5	15	3	8	14	9	5	6	14	22	4	2
IDEAL35	Fil	8	10	5	14	3	9	15	9	5	7	18	25	5	2
IDEAL39	Fil	8	13	5	13	3	9	15	9	5	7	16	31	4	2
IDEAL40	Fil	8	11	5	14	3	9	15	8	5	7	17	26	4	2
IDEAL46	Fil	6	12	4	12	2	8	16	9	5	6	14	23	4	2

Amostra	País de origem	AC8b	GTA9	GGT5	AT17	21-3	AC9	AT15	AC8a	27-5	6-7	TA18	GAA21	12-5	23-3
IDEAL51	Fil	7	8	4	17	1	9	14	9	5	8	14	18	4	2
IDEAL52	Fil	6	9	5	10	2	8	18	9	5	6	13	14	5	2
IDEAL54	Fil	8	12	5	14	3	8	18	9	5	7	23	18	4	2
IDEAL55	Fil	8	11	5	17	3	9	14	10	5	8	18	17	4	2
IDEAL57	Fil	8	12	5	13	3	9	15	9	5	7	19	27	4	2
IDEAL59	Fil	8	9	5	18	3	9	15	8	5	7	21	24	5	2
IDEAL61	Fil	8	9	5	15	3	9	NA	9	5	7	17	18	5	3
IDEAL62	Fil	8	9	5	15	3	9	15	9	5	7	18	25	5	2
IDEAL63	Fil	8	10	5	24	3	9	16	9	5	7	16	22	5	2
IDEAL68	Fil	7	9	6	15	3	9	14	9	5	7	17	26	4	2
IDEAL69	Fil	9	9	5	15	3	9	14	9	5	7	17	23	5	2
IDEAL70	Fil	9	9	5	15	3	9	14	9	5	7	17	25	5	2

Tai: Tailândia (n=45; Srisunnam e col., 2009); Índ: Índia (n=30; Shinde e col., 2009); Col: Colômbia (n=06; Castro-Cardona e col., 2009); Chi: China (n=16; Xing e col., 2009); Fil: Filipinas (n=31; Sakamuri e col., 2009).

Dendograma construído com base nos genótipos de *Mycobacterium leprae* definidos no Brasil e em outros países do mundo.



Continuação...

	(AC8B)	(ATA8)	(B75)	(AT17)	213	(AC9)	(AT15)	(AC8a)	275	6-7	(AT18)	(B4121)	165	293	Key	Country
	8	11	4	17	2	7	14	8	5	6	28	14	4	2	34BX	Bra/CE
	8	11	4	22	2	7	20	8	5	6	25	14	4	2	64BX	Bra/CE
	8	11	4	11	2	7	28	8	5	6	29	14	4	2	80BX	Bra/CE
	8	11	4	12	2	7	13	10	5	6	15	14	4	2	31BX	Bra/CE
	8	10	4	16	2	6	30	8	5	6	27	13	4	2	28BX	Bra/CE
	8	11	4	18	2	7	21	9	5	6	10	15	4	2	107B	Bra/CE
	8	7	4	18	2	7	20	8	5	6	18	15	4	2	Eraldo	Bra/PE
	7	11	4	12	2	7	30	8	5	6	18	15	4	2	7BX	Bra/CE
	8	10	4	21	2	7	29	8	5	7	17	14	4	2	17BX	Bra/CE
	8	10	4	20	2	7	29	8	5	7	15	14	4	2	77BX	Bra/CE
	8	10	4	17	2	7	16	8	5	7	21	14	4	2	38BX	Bra/CE
	8	10	4	20	2	7	27	8	5	10	23	14	4	2	69BX	Bra/CE
	8	10	4	17	2	7	26	8	5	7	16	15	4	2	98B	Bra/CE
	8	10	4	14	2	7	25	9	5	7	20	14	4	2	49B	Bra/CE
	7	10	4	18	2	7	26	8	5	7	25	14	4	2	0301010	Bra/CE
	7	10	4	18	2	7	25	8	5	7	16	14	4	2	0301014	Bra/CE
	7	10	4	18	2	9	14	8	5	7	16	16	4	2	289*	Chi
	8	10	4	18	2	7	28	8	5	7	16	14	4	1	59B	Bra/CE
	8	10	4	12	2	8	20	8	5	7	16	26	4	2	NIH34	Tai
	8	11	4	19	2	7	19	8	5	7	19	10	4	2	0101009	Bra/RJ
	8	11	4	15	2	7	18	8	5	7	19	14	4	2	105-04	Bra/PE
	8	17	4	9	2	7	11	8	5	7	19	14	4	3	MELBPRC/090	Ind
	8	10	4	11	2	7	18	10	5	7	15	19	4	2	MELBPRC/019	Ind
	8	9	4	11	2	7	18	7	5	6	21	26	4	2	NIH4	Tai
	6	10	4	11	2	7	13	10	5	6	14	16	4	2	NIH3	Tai
	8	11	4	14	2	7	19	8	5	8	31	12	5	2	23BX	Bra/CE
	8	12	4	13	2	7	20	8	5	8	23	13	4	2	52BX	Bra/CE
	8	10	4	16	2	8	14	11	4	6	12	18	4	2	NIH20	Tai
	9	10	4	10	2	8	26	11	5	6	24	25	4	2	NIH25	Tai
	7	7	4	16	2	7	20	10	5	7	18	14	4	2	30BX	Bra/CE
	8	9	4	21	2	9	20	10	5	7	11	12	4	2	NIH1	Tai
	9	12	4	10	2	7	13	10	5	9	18	15	4	2	MELBPRC/004	Ind
	8	12	4	10	2	9	13	10	5	6	18	26	4	2	NIH12	Tai
	8	8	4	10	2	9	13	10	5	5	21	23	4	2	NIH2	Tai
	7	12	4	14	2	9	16	8	3	9	15	12	4	2	2BX	Bra/CE
	7	26	4	9	2	7	12	8	5	9	11	12	3	2	308*	Chi
	7	10	4	11	2	8	10	8	4	7	18	11	4	2	21263	Bra/RJ
	7	9	4	14	2	8	10	8	4	7	14	15	4	2	22368	Bra/RJ
	8	15	4	15	2	8	10	8	4	6	21	16	3	2	23825	Bra/RJ
	7	12	4	15	2	8	20	9	4	5	14	10	5	2	21230	Bra/RJ
	7	12	4	15	2	8	19	9	4	5	14	10	5	2	21372	Bra/RJ
	7	12	4	14	2	8	15	9	4	5	18	10	5	2	14 AD-232	Col
	7	12	4	12	2	8	21	9	4	7	25	10	5	2	F 05/05	Bra/RJ
	7	8	4	16	2	8	19	9	4	5	16	12	5	2	19856	Bra/RJ
	7	10	4	13	2	8	19	9	4	6	15	10	5	2	20368	Bra/RJ
	7	9	4	13	2	8	19	9	4	6	13	10	5	2	570	Bra/SP
	7	10	4	11	2	8	25	9	4	6	15	10	5	2	571	Bra/SP
	7	10	4	12	2	8	21	9	4	6	16	10	5	2	L13	Bra/RO
	7	10	4	12	2	8	15	9	4	6	16	10	5	2	PFM	Bra/SP
	7	10	4	12	2	8	19	9	4	6	16	9	5	2	478	Bra/SP
	7	10	4	13	2	8	21	9	4	6	16	9	5	2	L23	Bra/RO
	7	10	4	14	2	8	19	9	4	6	20	12	5	2	484	Bra/SP
	7	10	4	14	2	8	14	9	4	6	20	12	5	2	535	Bra/SP
	7	10	4	11	2	8	25	9	4	6	20	12	5	2	21190	Bra/RJ
	7	10	4	9	2	8	19	9	4	6	14	12	5	2	569	Bra/SP
	7	9	4	14	2	8	26	9	4	6	14	10	5	2	512	Bra/SP
	7	9	4	14	2	8	15	9	4	6	14	10	5	2	567	Bra/SP
	7	9	4	15	2	8	21	9	4	6	14	10	5	2	510	Bra/SP
	7	13	4	14	2	8	16	9	4	6	14	10	5	2	537	Bra/SP
	7	10	4	14	2	8	16	9	4	6	18	10	5	2	379	Bra/SP
	7	10	4	14	2	8	21	9	4	6	18	10	5	2	564	Bra/SP
	7	11	4	14	2	8	28	9	4	6	23	10	5	2	21726	Bra/RJ
	7	11	4	13	2	8	24	9	4	6	17	10	5	2	0301021	Bra/CE
	7	11	4	11	2	8	17	9	4	6	17	12	5	2	L36	Bra/RO
	7	11	4	12	2	8	12	9	4	6	17	11	5	2	566	Bra/RS
	7	11	4	12	2	8	14	9	4	6	15	11	5	2	MC6986	Bra/RO
	7	12	4	12	2	8	17	9	4	6	15	11	5	2	RM	Bra/SP
	7	10	4	12	2	8	17	9	5	6	19	12	5	2	33B	Bra/CE
	7	10	4	12	2	8	16	9	5	6	21	10	5	2	45BX	Bra/CE
	7	9	4	12	2	8	20	9	4	6	20	12	5	2	20008	Bra/RJ
	7	9	4	12	2	8	20	9	5	6	17	10	5	2	37BX	Bra/CE
	7	10	4	12	2	8	20	9	4	6	19	10	6	2	0101005	Bra/RJ
	7	10	4	12	2	8	17	9	4	6	18	12	6	2	0101007	Bra/RJ
	7	10	4	11	2	8	28	11	4	6	14	10	5	2	479	Bra/SP
	7	11	4	11	2	8	24	11	4	6	16	10	5	2	63BX	Bra/CE
	7	9	4	9	2	8	15	11	4	6	21	11	5	2	20476	Bra/RJ
	7	9	4	9	2	8	15	10	4	6	14	10	5	2	L04	Bra/RO
	7	9	4	11	2	8	15	10	4	6	17	11	5	2	23806	Bra/RJ
	7	9	4	11	2	8	14	10	4	6	17	11	5	2	POC3848	Bra/RO
	7	9	4	11	2	8	7	9	4	6	29	11	5	2	GTM (13A)	Bra/RJ
	7	9	4	13	2	8	24	9	4	6	18	11	5	2	22830	Bra/RJ
	7	9	4	10	2	8	19	9	4	6	31	11	5	2	52-06	Bra/PE
	7	9	4	10	2	8	21	9	4	6	21	14	5	2	555	Bra/SP
	7	9	4	11	2	8	23	9	4	6	16	9	5	2	L15	Bra/RO
	7	9	4	11	2	8	23	9	4	6	16	9	5	2	POC3794	Bra/RO
	7	9	4	11	1	8	27	9	4	6	15	9	5	2	POC3791	Bra/RO
	7	9	4	12	2	8	14	9	4	7	15	11	5	2	23186	Bra/RJ
	7	9	4	11	2	8	14	9	4	7	15	11	5	2	IPG (6A)	Bra/RJ
	7	8	4	13	2	8	14	9	4	7	15	11	5	2	F 18/03	Bra/RJ
	7	9	4	12	2	8	12	9	4	7	16	11	5	2	539	Bra/SP
	7	9	4	13	2	8	14	9	4	5	16	11	5	2	35 CB-54	Col
	7	8	4	13	2	8	20	9	4	7	14	11	5	2	22494	Bra/RJ
	7	9	4	12	2	8	16	9	4	5	14	11	5	2	31 CB-48	Col
	7	10	4	10	2	8	16	9	4	7	15	13	5	2	L19	Bra/RO
	7	9	4	10	2	8	16	9	4	7	17	13	5	2	POC3829	Bra/RO
	7	9	4	13	2	8	15	9	4	7	15	13	5	2	JBF	Bra/SP
	7	9	4	13	2	8	15	9	4	7	15	13	5	2	JRB	Bra/MG

Continuação.

	(HC2b)	(GT19)	(GC7F)	(HT17)	Z/3	(HC2b)	(HT15)	(HC2b)	Z/5	67	(TA18)	(GA121)	11/5	Z/3	Key	Country
	7	12	4	11	2	8	15	10	4	7	16	11	5	2	POC202991	Bra/RO
	7	12	4	13	2	8	19	9	4	6	19	11	4	2	42BX	Bra/CE
	7	10	4	14	2	8	23	10	4	7	18	12	5	2	F 19/03	Bra/RJ
	7	10	4	14	2	8	22	10	4	7	18	12	5	2	MFMS (5A)	Bra/RJ
	7	10	4	14	2	8	23	10	4	6	18	13	5	2	19914	Bra/RJ
	7	10	4	14	2	8	20	10	4	6	21	11	5	2	L42	Bra/RO
	7	10	4	14	2	8	15	9	4	7	13	16	5	2	POC3846	Bra/RO
	7	9	4	12	2	8	18	10	4	7	23	10	5	2	23321	Bra/RJ
	7	15	4	12	2	8	14	8	4	7	15	10	5	2	Idemar	Bra/PE
	7	8	4	19	2	8	12	9	4	7	19	10	4	2	101B	Bra/CE
	7	9	4	19	2	8	12	9	4	7	19	10	5	2	113B	Bra/CE
	7	11	4	16	2	8	18	9	4	7	20	14	5	2	0101006	Bra/RJ
	7	12	4	12	2	8	11	8	4	6	14	15	5	2	548	Bra/SP
	7	7	4	10	2	8	13	8	4	6	16	13	5	2	540	Bra/SP
	7	7	4	10	2	7	22	10	4	6	15	13	5	2	LBD (11A)	Bra/RJ
	7	14	4	10	2	8	12	10	4	6	22	12	5	2	134-05	Bra/PE
	7	10	4	11	2	9	15	9	4	5	15	13	5	2	21644	Bra/RJ
	7	10	4	11	2	9	21	9	4	6	17	10	5	2	551	Bra/SP
	7	12	4	11	2	9	22	9	3	7	15	14	5	2	518	Bra/SP
	7	11	3	10	2	9	14	9	4	7	15	13	5	2	MC7829	Bra/RO
	7	10	3	10	2	8	18	10	4	8	14	11	5	2	20241	Bra/RJ
	7	11	3	10	2	8	16	10	4	6	14	10	5	2	544	Bra/MG
	7	11	3	11	2	8	17	10	4	7	14	14	5	2	22670	Bra/RJ
	7	9	4	11	2	8	18	10	5	7	17	13	5	1	73BX	Bra/CE
	7	9	4	13	2	8	17	10	4	8	14	13	5	1	RAS	Bra/AM
	6	9	5	10	2	8	18	9	5	6	13	14	5	2	IDEAL52	Fil
	6	9	5	10	2	8	17	9	5	7	15	16	5	2	IDEAL9	Fil
	7	9	5	10	2	8	14	9	4	6	12	12	5	2	L01	Bra/RO
	9	9	5	15	2	8	17	9	5	6	14	36	4	2	IDEAL7	Fil
	6	9	6	9	2	8	16	9	4	6	17	11	5	2	VGR (1A)	Bra/RJ
	6	9	5	10	2	9	14	10	4	6	17	15	4	2	NIH45	Tai
	8	13	4	14	2	8	15	8	6	6	16	17	4	1	177-04	Bra/PE
	8	25	4	15	2	8	15	10	5	8	14	13	3	2	300*	Chi
	8	12	4	15	2	8	22	10	5	8	12	20	3	2	303*	Chi
	8	24	4	14	2	8	13	10	5	7	21	23	3	2	304*	Chi
	8	24	4	14	2	8	13	10	5	7	21	23	3	2	307*	Chi
	8	47	4	17	2	9	13	7	5	7	19	20	3	2	314*	Chi
	8	9	4	13	2	9	16	12	5	8	23	19	3	2	287*	Chi
	8	9	4	13	2	9	18	10	5	8	20	28	3	2	302*	Chi
	8	9	4	14	2	9	15	11	5	8	22	22	3	2	299*	Chi
	8	9	4	14	2	9	15	11	5	8	21	22	3	2	312*	Chi
	8	9	4	13	2	9	16	11	5	8	20	22	3	2	298*	Chi
	10	25	4	14	2	7	20	9	5	8	16	18	3	2	309*	Chi
	9	19	4	13	2	8	17	12	5	9	15	15	3	2	293*	Chi
	7	17	4	12	2	9	16	10	5	10	14	11	3	3	310*	Chi
	8	10	5	14	3	9	15	9	5	7	18	25	5	2	IDEAL35	Fil
	8	9	5	14	3	9	15	9	5	7	20	24	5	2	IDEAL6	Fil
	8	9	5	18	3	9	15	8	5	7	21	24	5	2	IDEAL59	Fil
	8	9	5	15	3	9	14	9	5	7	19	25	5	2	IDEAL14	Fil
	8	9	5	15	3	9	15	9	5	7	18	25	5	2	IDEAL62	Fil
	9	9	5	15	3	9	14	9	5	7	17	23	5	2	IDEAL69	Fil
	9	9	5	15	3	9	14	9	5	7	17	25	5	2	IDEAL70	Fil
	8	9	5	15	3	9	9	9	5	7	17	18	5	3	IDEAL61	Fil
	8	10	5	24	3	9	16	9	5	7	16	22	5	2	IDEAL63	Fil
	7	9	5	17	3	9	16	10	5	7	18	21	5	2	IDEAL8	Fil
	8	9	5	13	3	9	11	8	5	7	14	16	4	2	IDEAL24	Fil
	8	11	5	14	3	9	15	8	5	7	17	26	4	2	IDEAL40	Fil
	8	13	5	13	3	9	15	9	5	7	16	31	4	2	IDEAL39	Fil
	8	12	5	13	3	9	15	9	5	7	19	27	4	2	IDEAL57	Fil
	8	9	5	13	3	9	15	9	5	8	21	19	4	2	IDEAL11	Fil
	8	11	5	12	3	9	16	9	5	7	19	21	4	2	IDEAL26	Fil
	7	12	5	13	3	8	22	9	5	7	21	31	4	2	IDEAL20	Fil
	8	12	5	14	3	8	18	9	5	7	23	18	4	2	IDEAL54	Fil
	8	9	5	20	3	9	15	8	4	8	25	19	4	2	IDEAL23	Fil
	8	8	5	13	3	8	14	10	5	6	22	27	4	2	IDEAL17	Fil
	8	11	5	15	3	8	14	9	5	6	14	22	4	2	IDEAL27	Fil
	8	11	5	17	3	9	14	10	5	8	18	17	4	2	IDEAL55	Fil
	6	11	5	12	3	8	15	9	5	6	12	12	4	2	NIH32	Tai
	7	10	4	14	1	9	14	9	5	7	17	20	4	2	IDEAL13	Fil
	7	10	4	14	3	9	13	9	5	5	13	17	4	2	NIH5	Tai
	7	8	4	17	1	9	14	9	5	8	14	18	4	2	IDEAL51	Fil
	7	9	6	15	3	9	14	9	5	7	17	26	4	2	IDEAL68	Fil
	7	8	5	13	3	7	12	10	5	6	13	17	4	2	NIH27	Tai
	7	9	5	13	3	7	14	10	5	6	13	19	4	2	NIH6	Tai
	7	9	5	14	3	7	14	10	5	6	11	17	4	2	NIH15	Tai
	7	9	5	14	3	7	13	10	5	6	11	19	4	2	NIH37	Tai
	7	9	5	10	3	7	12	10	5	6	11	10	4	2	NIH16	Tai
	7	9	5	17	3	7	15	10	5	6	11	29	4	2	NIH35	Tai
	7	9	5	18	3	7	11	11	5	6	15	19	4	2	NIH18	Tai
	7	9	5	13	3	8	13	11	5	6	11	21	4	2	NIH29	Tai
	7	9	5	11	1	7	14	8	5	6	12	11	4	2	MEL/BPRC/089	Índ
	7	9	5	13	3	7	14	8	5	6	9	23	4	2	NIH36	Tai
	7	10	5	13	3	7	11	9	5	6	12	18	4	2	NIH8	Tai
	7	8	5	13	3	7	13	9	5	6	11	18	4	2	NIH9	Tai
	7	9	6	13	3	7	15	7	5	6	14	18	4	2	NIH28	Tai
	7	9	5	23	3	8	11	10	5	6	12	15	3	2	NIH40	Tai
	7	9	5	16	3	7	11	10	5	6	12	15	3	2	NIH42	Tai
	7	9	5	19	3	7	12	10	5	6	12	16	3	2	NIH39	Tai
	7	9	5	16	3	7	12	10	5	6	12	16	3	2	NIH41	Tai
	7	9	5	14	3	10	14	10	5	5	12	16	4	2	NIH14	Tai
	7	10	5	11	3	10	22	9	5	5	12	15	4	2	NIH38	Tai
	7	9	6	14	3	8	20	10	5	7	24	23	4	2	IDEAL10	Fil
	7	9	5	11	2	8	19	10	5	7	16	21	4	2	MEL/BPRC/074	Índ
	7	7	5	14	2	8	18	8	5	6	25	13	3	2	015-07	Bra/PE
	7	7	5	12	2	8	15	10	5	6	11	14	3	2	NIH17	Tai

BRA/AM: estado do Amazonas no Brasil; BRA/CE: estado do Ceará no Brasil; BRA/MG: estado de Minas Gerais no Brasil; BR/PE: estado de Pernambuco no Brasil; BR/RJ: estado do Rio de Janeiro no Brasil; BR/RO: estado de Rondônia no Brasil; BR/SP: estado de São Paulo no Brasil; Chi: China; Col: Colômbia; Fil: Filipinas; Índ: Índia; Tai: Tailândia;