

Revista Conexão na Amazônia, ISSN 2763-7921, n. 02, v. 03, 2021

ANÁLISE MOLECULAR E SOROLÓGICA DA HANSENÍASE NO MUNICÍPIO DE RIO BRANCO/AC

MOLECULAR AND SEROLOGICAL ANALYSIS OF LEPROSY IN THE MUNICIPALITY OF RIO BRANCO/AC

Ricardo dos Santos Pereira¹, Cleilson Rezende da Silva², Elandia Oliveira de Lima³,
Suelen Justo Maria Moreira⁴, Fernanda Saloum de Neves Manta⁴, Milton Ozório Moraes⁵
E-mail: ricardo.pereira@ifac.edu.br, cleilson.silva@ifac.edu.br, elandialimajcm@gmail.com,
sukamoreira@gmail.com, femanta@yahoo.com.br, milton.moraes@fiocruz.br

¹Docente do Instituto Federal do Acre, ²Técnico de Laboratório do Instituto Federal do Acre,
³Docente da Rede Estadual de Ensino do Acre, ⁴Pesquisadora do Laboratório de Hanseníase –
IOC/Fiocruz-RJ, ⁵Coordenador do Laboratório de Hanseníase – IOC/Fiocruz-RJ

Artigo submetido em 05/2021 e aceito em 08/2021

Resumo

A hanseníase é uma doença negligenciada, de formas clínicas distintas e evolução lenta, causada pelo *Mycobacterium leprae* e *lepromatosis*, que infecta células nos nervos e na pele. Sua transmissão ocorre principalmente pelo contato direto entre pacientes e contatos intradomiciliares, onde a principal via de eliminação de bacilos ocorre pelas vias aéreas superiores. Neste trabalho, foram utilizadas estratégias baseadas em métodos moleculares e sorológicos para o diagnóstico precoce e a triagem de casos novos de hanseníase no município de Rio Branco/AC. A detecção do DNA de *M. leprae*, a partir de amostras de pacientes (n=213) e contatos (n=213), foi realizada através da *qPCR* para o gene *16S*. Das amostras positivas para a *qPCR*, 19 amostras (86,36%) foram de pacientes multibacilares, uma de paciente paucibacilar e duas de contatos. Os resultados obtidos apresentaram 100% de positividade em pacientes multibacilares não-tratados ou até três meses de tratamento. Para avaliar a soropositividade de pacientes e contatos, foram realizados testes rápidos (*NDO-LID* e *ML-Flow (PGL-1)*) em 150 pacientes, 119 contatos e 89 controles. Destes, 45,3% foram positivos em pacientes, sendo 53,6% (59/110) em multibacilares e 22,5% (9/40) em paucibacilares. Nos contatos, 37% dos testes foram positivos e nos indivíduos controles, 30,3%. A alta positividade dos testes rápidos em contatos e controles indica a circulação ativa do *M. leprae*. Estes resultados indicam a possibilidade da utilização de testes sorológicos e moleculares para triagem, diagnóstico precoce e acompanhamento do tratamento da doença junto ao SUS.

Palavras-chave: Acre; Hanseníase; *M. leprae*; *qPCR*; Teste rápido.

Abstract

Leprosy is a neglected disease, with different clinical forms and slow evolution, caused by *Mycobacterium leprae* and *lepromatosis*, which infects cells in the nerves and in the skin. Its transmission occurs mainly through direct contact between patients and household contacts, where the main route of elimination of

bacilli occurs through the upper airways. In this work, strategies based on molecular and serological methods were used for the early diagnosis and screening of new cases of leprosy in the city of Rio Branco/AC. The detection of *M. leprae* DNA, from samples of patients (n = 213) and contacts (n = 213), was performed using the qPCR for the 16S gene. Of the positive samples for qPCR, 19 samples (86.36%) were from multibacillary patients, one from paucibacillary patient and two from contacts. The results obtained showed 100% positivity in untreated multibacillary patients or up to three months of treatment. To assess the seropositivity of patients and contacts, rapid tests (NDO-LID and ML-Flow (PGL-1) were performed on 150 patients, 119 contacts and 89 controls. Of these, 45.3% were positive in patients, 53.6% (59/110) in multibacillary and 22.5% (9/40) in paucibacillary, 37% of the tests were positive in the contacts and 30.3% in the control subjects. The high positivity of the rapid tests in contacts and controls indicates the active circulation of *M. leprae*. These results indicate the possibility of using serological and molecular tests for screening, early diagnosis and monitoring of the treatment of the disease with the SUS.

Keywords: Acre; Hansen's disease; *M. leprae*; qPCR; Rapid test.

1 INTRODUÇÃO

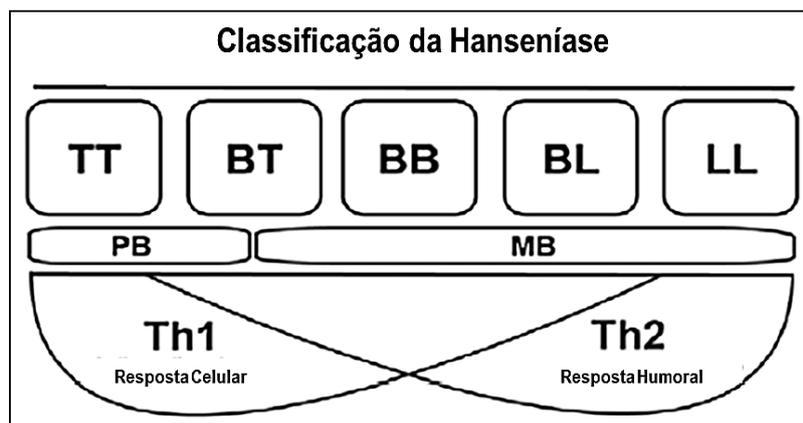
A hanseníase é uma doença infectocontagiosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae*, um patógeno intracelular que apresenta tropismo por macrófagos da pele e células de Schwann dos nervos periféricos (COURA, 2013). Mais recentemente, foi descrito por Han *et al.* (2008) que a doença também é causada pelo *Mycobacterium lepromatosis*, uma espécie que possui patogenicidade similar ao *M. leprae*. No entanto, parece causar um tipo específico da doença, a hanseníase lepromatosa difusa (DLL) (AVANZI, 2018; BENJAK, 2018).

Evidências epidemiológicas sugerem que a principal forma de transmissão da doença seja o contato direto entre pacientes multibacilares não-tratados e seus contatos intradomiciliares (ARAÚJO *et al.*, 2012; SMITH; AERTS, 2014). Acredita-se que a principal via de eliminação de bacilos ocorra através das vias aéreas superiores (secreções nasais e gotículas da fala). Alguns trabalhos discutem o papel do ambiente, da história de ocupação dos territórios (movimentos migratórios e urbanização) e de condições desfavoráveis de vida (condições higiênicas, saneamento, pobreza e desnutrição), na distribuição espacial de muitas doenças infecciosas, como a hanseníase (MAGALHÃES; ROJAS, 2007; SAMPAIO *et al.*, 2013).

A doença é definida por formas clínicas distintas (classificação de Ridley & Jopling), apresentando um período de incubação variável (meses a anos), de acordo com a genética do indivíduo. Em um polo (forma lepromatosa) são evidenciadas muitas lesões ricas em bacilos e ausência de resposta imune celular. Neste caso, a resposta imune humoral (perfil Th2) é predominante, sendo ineficiente no controle do bacilo, que culmina em uma alta carga bacilar. Em outro polo (forma tuberculóide), ocorre uma resposta imune celular eficiente, poucas lesões e quase nenhum bacilo. Nesse polo há maior atividade da imunidade celular (perfil Th1), que induz a produção de citocinas (principalmente IL-2 e IFN- γ , que vão ativar as respostas microbidas. Com isso, o macrófago consegue conter a disseminação dos bacilos, resultando em uma baciloscopia baixa ou negativa (FAVA *et al.*, 2012).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) e o Ministério da Saúde (MS) classificam a hanseníase (classificação operacional) em duas formas: na forma paucibacilar (PB), que considera até cinco lesões de pele e/ou comprometimento de apenas um tronco nervoso; na forma multibacilar (MB), que considera mais de cinco lesões de pele e / ou mais de um tronco nervoso comprometido (COURA, 2013) (Figura 1). Além disso, existe uma forma menos frequente e de difícil diagnóstico conhecida como hanseníase neural pura (PNL).

Figura 1: Classificação clínica da hanseníase (TT, BT, BB, BL, LL), proposta por Ridley & Joplin (1966), e classificação operacional da doença (PB e MB), proposta pela OMS (2001). Também é apresentado o perfil de citocinas de acordo com a polarização da doença (forma tuberculóide (perfil Th1); forma lepromatosa (perfil Th2)). Legenda: TT (tuberculóide-tuberculóide), BT (*borderline*-tuberculóide), BB (*borderline*-*borderline*), BL (*borderline*-lepromatosa), LL (lepromatosa-lepromatosa); PB (paucibacilar), MB (multibacilar); Th1 (T-helper 1), Th2 (T-helper 2)



Revista Conexão na Amazônia, ISSN 2763-7921, n. 02, v. 03, 2021

Fonte: Adaptação de Fava *et al.*, 2012.

A hanseníase geralmente se manifesta pelos seguintes sintomas: sensação de formigamento, fisgadas ou dormência nas extremidades; manchas brancas ou avermelhadas, geralmente com perda de sensibilidade ao calor, frio, dor e toque; áreas da pele que apresentem alterações na sensibilidade e na secreção de suor; caroços e placas em qualquer região do corpo; diminuição da força muscular (COURA, 2013; BRASIL, 2017).

O diagnóstico padrão da doença é realizado através de exames clínicos (dermatológico e neurológico), bacteriológicos (baciloscópico) e histopatológicos. Este diagnóstico se mostra muitas vezes impreciso e tardio, o que possibilita a evolução para a forma severa da doença.

No que se refere ao tratamento, a OMS em 1982 recomendou um novo esquema terapêutico para o tratamento da hanseníase chamado poliquimioterapia (PQT), composto pela rifampicina, dapsona e clofazimina. A associação dos três medicamentos levou a cura com maior rapidez, melhor adesão dos pacientes e diminuição da probabilidade do surgimento de resistência bacilar. Desta forma, o perfil epidemiológico da hanseníase se modificou, havendo uma redução drástica em sua prevalência (BRASIL, 1989). No Brasil, desde 1991, é adotado o tratamento com a PQT, que contribuiu para a eliminação do bacilo e a redução na disseminação da doença (MONOT *et al.*, 2009; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

A vacinação com BCG (bacilo de *Calmette-Guërin*) também teve uma grande contribuição neste sentido, pois protege as pessoas contra as formas mais graves da hanseníase. A vacinação BCG neonatal, utilizada para prevenir a tuberculose, tem apresentado potencial em reduzir a prevalência da hanseníase (RODRIGUES; LOCKWOOD, 2011). Uma segunda dose da vacina BCG em contatos de pacientes para a hanseníase parece conferir maior proteção, mesmo em contatos que já receberam BCG neonatal (SCHILLING *et al.*, 2009; DUPPRE *et al.*, 2012). Nos últimos anos, estão sendo testadas vacinas recombinantes mais modernas para o combate à hanseníase, mas ainda não foram liberadas para utilização junto à população (REED *et al.*, 2013; STEINMANN *et al.*, 2017).

Revista Conexão na Amazônia, ISSN 2763-7921, n. 02, v. 03, 2021

Além disso, trabalhos vêm mostrando que a quimioprofilaxia com dose única de rifampicina reduz o risco de hanseníase em contatos de pacientes com a doença (BARTH-JAEGGI *et al.*, 2016; RICHARDUS *et al.*, 2021).

Apesar de ter sido observada a redução na taxa de detecção de novos casos de hanseníase no Brasil, o país ainda se mantém enquadrado nos parâmetros de alta endemicidade da doença, apresentando um dos piores panoramas mundiais da hanseníase e ocupando lugar de destaque, sendo o segundo dentre os países com maior número de novos casos detectados, precedido apenas pela Índia, com 27.864 novos casos detectados no ano de 2019, equivalente a 93% de todos os casos da região das Américas e 13,7% dos casos globais registrados no ano (WHO, 2019).

Além disso, ressaltamos as altas taxas de detecção da hanseníase nos “bolsões de pobreza” das regiões norte, nordeste e centro-oeste do país. Tais afirmativas corroboram as hipóteses de que os fatores socioeconômicos e históricos contribuem para justificar a ocorrência desproporcional da hanseníase no Brasil, onde as regiões Centro-Oeste e Norte possuem as maiores taxas de detecção geral da doença (SALES *et al.*, 2011).

Os esforços atuais na pesquisa em hanseníase têm sido concentrados no desenvolvimento de ferramentas que possam auxiliar na identificação de potenciais casos novos. Nesse sentido, alguns pesquisadores (SMITH; AERTS, 2014; WHO, 2016; STEINMANN *et al.*, 2017), sugeriram ações em relação ao levantamento de casos novos e ao acompanhamento de pacientes/contatos, visando ao controle e a eliminação da doença, levando em consideração algumas estratégias: *rastreamento de contatos*, que pode ser realizado através da análise espacial dos municípios e bairros, fundamental para promover a identificação das regiões mais endêmicas, de forma que se possa fazer uma varredura nestes locais por meio da busca ativa de casos novos da doença; *uso de testes para identificação precoce da doença*, que pode utilizar estratégias baseadas em métodos moleculares e sorológicos, que visem o diagnóstico precoce e a triagem de casos novos de hanseníase.

Muitos estudos envolvendo diferentes sequências e genes alvos para a amplificação e detecção do *DNA* do *M. leprae* pela *PCR* (reação em cadeia da polimerase) também têm sido realizados. Com o surgimento da *PCR* em tempo real quantitativa (*qPCR*), foi possível uma maior sensibilidade e especificidade

Revista Conexão na Amazônia, ISSN 2763-7921, n. 02, v. 03, 2021

de detecção, possibilitando a utilização da ferramenta como suporte ao diagnóstico clínico da hanseníase (NÓBREGA MARTINEZ, 2009). Além disso, a especificidade e a sensibilidade de quatro diferentes ensaios de *qPCR* (*RLEP*, *16S rDNA*, *Ag 85B* e *sodA*) para o diagnóstico diferencial da hanseníase foram testados, a partir da análise de material de raspado intradérmico auricular e os resultados mostraram que o *RLEP* foi o mais sensível, enquanto o *16S rDNA*, embora um pouco menos sensível, foi mais específico para a detecção da doença. O ensaio utilizando a sonda *16S rDNA* detectou em torno de 40% dos pacientes paucibacilares de difícil diagnóstico (baciloscopia negativa e poucas lesões) (MARTINEZ *et al.*, 2011). Desta forma, a *qPCR* devido a sua maior sensibilidade e especificidade em relação a outras técnicas, mostrou ser uma ferramenta promissora como diagnóstico complementar da hanseníase.

Estudos apontam que os testes sorológicos permitem identificar indivíduos com alto risco de desenvolver a doença e indivíduos com infecção subclínica (KAMPIRAPAP, 2008; ARAÚJO *et al.*, 2012). Dentre eles, pode-se investigar a presença de antígenos específicos, como o *PGL-1*, encontrado em abundância na parede celular do *M. leprae*. Nesse sentido, foi proposto um teste de fluxo lateral (*ML Flow Test*) para detecção do anticorpo IgM para *PGL-1* do *M. leprae* (BUHRER-SÉKULA *et al.*, 2003). Este teste rápido apresentou uma sensibilidade bem superior em relação as propostas avaliadas anteriormente e vem sendo utilizado em diversos trabalhos até hoje (FABRI, 2015; RICHARDUS *et al.*, 2017). Nos últimos anos, também têm sido utilizados testes rápidos baseados na detecção de *LID-1* (proteína de fusão recombinante de *ML0405* e *ML2331*), desenvolvido pelo Instituto de Pesquisa em Doenças Infeciosas (IDRI) (FRADE *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2017). Nesse contexto, a utilização de testes rápidos na vigilância epidemiológica tem demonstrado ser útil desde a triagem inicial de doenças, por meio da identificação de casos assintomáticos, até a verificação da prevalência ou eliminação de doenças na população (PEELING *et al.*, 2006).

Neste contexto, o presente trabalho realizou a análise molecular e sorológica em um subgrupo populacional do estado do Acre, visando a implementação de ferramentas mais sensíveis, precisas e eficazes para ajudar não somente na confirmação do diagnóstico da hanseníase, assim como na vigilância epidemiológica da doença no país.

2 METODOLOGIA

2.1 AUTORIZAÇÃO PARA REALIZAÇÃO DA PESQUISA

O presente projeto foi submetido na Plataforma Brasil, obtendo parecer favorável do CEP à realização da pesquisa (CEP-UFAC: Parecer nº 750.553; CEP-Fiocruz: Parecer nº 775.694; CEP-HC/Acre: Parecer nº 910.309).

2.2 DESENHO DO ESTUDO

Após a aprovação do projeto pelos Comitês de Ética em Pesquisa (CEPs), a coleta das amostras foi realizada em pacientes e contatos (maiores que 18 anos) atendidos pelo Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas do Acre (Centro de Referência de Hanseníase no Estado), após a concordância com a participação na referida pesquisa, mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Este setor recebe encaminhamento de pacientes do município de Rio Branco e de vários municípios do estado do Acre. Desta forma, todos estes pacientes e seus contatos foram incluídos na pesquisa. Como controles da pesquisa, foi utilizado um grupo de doadores saudáveis, residentes no município de Rio Branco, provenientes do banco de sangue do Hemoacre, mediante concordância através da assinatura do TCLE.

Para a análise molecular do DNA de *M. leprae* (qPCR) foi realizado um estudo transversal que compreendeu um grupo retrospectivo (pacientes cadastrados e contatos anteriores a 2016 – tratados ou em tratamento) e um grupo prospectivo (casos novos e contatos entre 2016-2017 – não tratados) para a hanseníase. Para a análise da sorologia para o *M. leprae*, foram realizados os testes rápidos NDO-LID (pacientes e contatos) e ML-Flow (PGL-1) (pacientes, contatos e controles).

2.3 ANÁLISE MOLECULAR DO DNA DE *M. LEPRAE*

Para a análise molecular foram coletadas amostras de raspado intradérmico do lóbulo auricular de pacientes e contatos, conforme recomendações do Ministério da Saúde (BRASIL, 2010). As amostras coletadas foram armazenadas em etanol absoluto e acondicionadas em freezer a -20°C até o momento do experimento.

Revista Conexão na Amazônia, ISSN 2763-7921, n. 02, v. 03, 2021

A extração do *DNA* das amostras foi realizada através do *Kit DNeasy Blood and Tissue* (QIAGEN), a partir de uma adaptação das instruções do fabricante. A avaliação da pureza e da concentração de *DNA* foi realizada por espectrofotometria utilizando o instrumento NanoDrop® ND-1000 (*Thermo Scientific, USA*).

O ensaio de qPCR foi padronizado com a utilização de *primers* específicos para amplificar sequências do gene *16S rDNA* (*primer* AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG (posição 69–91 do gene *16S*) e *primer* CAT CCT GCA CCG CAA AAA GCT T (posição 218–239 do gene *16S*)), além da sonda *ML16S rDNA* (*Taq-Probe* FAM - 5' – CAT CCT GCA CCG CA – 3'), sendo utilizados para determinar o número relativo de bactérias, conforme estabelecido por Martinez *et al.* (2011).

A amplificação ocorreu em volume final de 25 µL, contendo aproximadamente 50 ng de *DNA* genômico. O *Master Mix*, *primers* e sondas foram utilizados seguindo as recomendações do fabricante (*Thermo Scientific, USA*) (12,5 µL de *Taqman Universal PCR Master Mix (2X)*; 0,5 µL de *Primer Forward 16S (25 µM)*; 0,5 µL de *Primer Reverse 16S (25 µM)*; 0,5 µL de Sonda *16S (10 µM)*). A reação foi programada para 50°C por 2 minutos e 95°C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C. Tais análises foram realizadas no sistema de PCR em Tempo Real *StepOnePlus* (*Applied BioSystems, Carlsbad, CA, USA*) no Laboratório de Hanseníase (IOC-Fiocruz/RJ). O acúmulo de fluorescência foi analisado em *software* específico (*StepOne Software, Applied BioSystems*). Os valores de *Ct* e variação *Rn* obtidos foram analisados no pacote de programas estatísticos R (Ritz & Spiess, 2008). Além disso, foi construída uma curva-padrão, a partir da qual foi possível estimar o número de genomas do bacilo nas amostras de raspado intradérmico auricular analisadas.

A tabulação dos dados foi realizada com o *Software Microsoft Excel* (*Microsoft Office 365*).

2.4 ANÁLISE DA SOROLOGIA PARA *LID-1* E/OU *PGL-1* DE *M. LEPRAE*

Para a análise da sorologia para o *M. leprae*, foram realizados os testes rápidos *NDO-LID* (pacientes e contatos) e *ML-Flow (PGL-1)* (pacientes, contatos e controles), e seguidas as instruções do fabricante, onde amostras de sangue total (cerca de 10 µL) de pacientes e contatos foram coletadas por punção digital,

Revista Conexão na Amazônia, ISSN 2763-7921, n. 02, v. 03, 2021

com o auxílio de lancetas automáticas e capilares de vidro, e aplicadas no teste rápido juntamente com solução tampão (03 gotas).

Para realização dos testes rápidos *ML-Flow (PGL-1)*, foram seguidas as instruções do fabricante, onde foram coletadas amostras de sangue total (2,0 mL) de pacientes, contatos e controles, por punção venosa, em tubos de sangue *BD Vacutainer – Seco* (4,0 mL), as quais foram acondicionadas em freezer a -20°C até o momento do experimento. Posteriormente, as amostras de sangue foram descongeladas e centrifugadas a 735 x g, por 10 minutos, para separação do soro. O soro foi recolhido em microtubos de 1,5 mL e acondicionados em freezer a -20°C até o momento do experimento. Para a realização do teste rápido, foram utilizados 5 µL de soro e 04 gotas (130 µL) de solução tamponante.

A leitura dos testes foi realizada visualmente, após vinte minutos, por dois pesquisadores de forma independente. Em caso de discordância entre os leitores, um terceiro pesquisador realizava a leitura do teste. Os testes foram considerados válidos quando houve coloração da linha controle (C). Os testes rápidos *NDO-LID* foram classificados com base em seu manual, por meio de um *score* (Negativo (0), Positividade baixa (+1), Positividade média (+2), Positividade alta (+3)). Os testes rápidos *ML-Flow (PGL-1)* também foram classificados de acordo com seu manual, de forma mais específica que os testes utilizados anteriormente, por meio de um *score* (Negativo (0), Positividade baixa (+1), Positividade média (+2), Positividade alta (+3), Positividade muito alta (+4)).

Os testes rápidos *ML-Flow (PGL-1)* dos pacientes multibacilares e paucibacilares, devido a presença do grupo controle no estudo, foram validados a partir do cálculo dos percentuais de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia.

A tabulação dos dados foi realizada com o *Software Microsoft Excel (Microsoft Office 365)*. Os gráficos foram elaborados com o *Software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, Inc.)*.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA HANSENÍASE

Inicialmente, foi realizada a caracterização dos pacientes com hanseníase que participaram do estudo de diagnóstico molecular (*qPCR*), apresentada na

Revista Conexão na Amazônia, ISSN 2763-7921, n. 02, v. 03, 2021

Tabela 1, onde a maioria dos pacientes residia no município de Rio Branco, era do sexo masculino, possuía etnia mestiça e era classificada como multibacilar.

Tabela 1: Caracterização dos pacientes com hanseníase que participaram do estudo de diagnóstico molecular (*qPCR*). Legenda: *SD* (Desvio Padrão)

Caracterização dos pacientes com Hanseníase	
Casos (n=213)	
Idade (média (SD))	49 (17,2)
Localidade	
Rio Branco (n (%))	131 (61,5)
Municípios/AC (n (%))	76 (35,68)
Outros Estados (n (%))	6 (2,82)
Sexo	
Masculino (n (%))	140 (65,73%)
Feminino (n (%))	73 (34,27%)
Etnia	
Caucasianos (n (%))	40 (18,78%)
Mestiços (n (%))	164 (77%)
Negros (n (%))	05 (2,35%)
Indígenas (n (%))	04 (1,87%)
Classificação OMS	
Multibacilar (n,(%))	154 (72,30%)
Paucibacilar (n,(%))	59 (27,70%)
Baciloscopia	
Positiva (n (%))	81 (38,03%)
Negativa (n (%))	132 (61,97%)

Fonte: Elaborado pelos autores (2021).

Para a análise molecular do *DNA* de *M. leprae* foram processadas 213 amostras de pacientes (146 multibacilares e 67 paucibacilares) e 213 amostras de contatos intradomiciliares, conforme Tabela 2. A partir da análise das amostras através da *PCR* em tempo real quantitativa (*qPCR*) para o gene *16 S*, 15,8% (23/146) se mostraram positivas em pacientes multibacilares e 1,5% (01/67) em pacientes paucibacilares. Além disso, 2,4% (05/213) das amostras de contatos intradomiciliares se mostraram positivas. As demais amostras analisadas se mostraram negativas para a *qPCR*, sendo 84,2% (123/146) em pacientes multibacilares, 98,5% (66/67) em pacientes paucibacilares e 97,6% (208/213) em contatos intradomiciliares.

Tabela 2: Amostras analisadas de pacientes e contatos para hanseníase

PCR em Tempo Real Quantitativa (qPCR)			
	Multibacilares (%)	Paucibacilares (%)	Contatos (%)
Positivos	23 (15,8)	1 (1,5)	5 (2,4)
Negativos	123 (84,2)	66 (98,5)	208 (97,6)
Total	146 (100)	67 (100)	213 (100)

Fonte: Elaborado pelos autores (2021).

A partir da Tabela 3, é possível observar que das 29 amostras positivas para a *qPCR*, 22 amostras eram do grupo prospectivo (75,9%) e 07 amostras do grupo retrospectivo (24,1%) para a doença.

Tabela 3: Amostras de pacientes e contatos para hanseníase (grupo de estudo retrospectivo (anterior a 2016) e prospectivo (2016-2017))

PCR em Tempo Real Quantitativa (qPCR)						
	Grupo Retrospectivo			Grupo Prospectivo		
	Multibacilares (%)	Paucibacilares (%)	Contatos (%)	Multibacilares (%)	Paucibacilares (%)	Contatos (%)
Positivos	4 (3,8)	0 (0)	3 (2,1)	19 (47,5)	1 (9,1)	2 (2,9)
Negativos	102 (96,2)	56 (100)	141 (97,9)	21 (52,5)	10 (90,9)	67 (97,1)
Total	106 (100)	56 (100)	144 (100)	40 (100)	11 (100)	69 (100)

Fonte: Elaborado pelos autores (2021).

Na Figura 2, foi apresentada a relação existente entre a *qPCR* e a baciloscopia dos pacientes avaliados para a hanseníase. Das 22 amostras positivas para a *qPCR* do grupo de estudo prospectivo, é importante destacar que 86,4% (19/22) das amostras eram de pacientes multibacilares, sendo 89,5% (17/19) de pacientes positivos para a baciloscopia (06 pacientes não-tratados e 11 pacientes que iniciaram o tratamento até três meses quando da coleta das amostras) e 10,5% (2/19) de pacientes negativos para a baciloscopia (02 pacientes que iniciaram o tratamento até três meses quando da coleta das amostras). Além disso, foi observado que 4,5% (1/22) das amostras de pacientes paucibacilares (baciloscopia negativa) e 9,1% (2/22) das amostras de contatos intradomiciliares (contatos de pacientes não-tratados) foram positivas para a *qPCR* no grupo de estudo prospectivo. Os pacientes do grupo prospectivo que foram negativos para a *qPCR* (21 multibacilares e 10 paucibacilares) estavam em tratamento há mais de seis meses quando da coleta das amostras.

Figura 2: Relação entre a *qPCR* e a baciloscopia dos pacientes avaliados para a hanseníase. a) Pacientes do grupo prospectivo (2016-2017). b) Pacientes do grupo retrospectivo (anteriores a 2016)

a)	qPCR	Baciloscopia		qPCR	Baciloscopia	
		+	-		+	-
	+	17	02	+	0	01
	-	07	14	-	0	10
		Multibacilar			Paucibacilar	

b)	qPCR	Baciloscopia		qPCR	Baciloscopia	
		+	-		+	-
	+	04	0	+	0	0
	-	47	55	-	0	56
		Multibacilar			Paucibacilar	

Fonte: Elaborado pelos autores (2021).

Estas relações ficaram ainda mais claras quando observamos a positividade da *qPCR* em relação a fase de tratamento dos pacientes (Tabela 4).

Tabela 4: Amostras de pacientes (multibacilares e paucibacilares) analisadas pela *qPCR* em relação a fase de tratamento para a hanseníase

	PCR em Tempo Real Quantitativa (<i>qPCR</i>)					
	Pacientes (MB)			Pacientes (PB)		
	Tratamento (meses)					
	Fase inicial (0 ≤ 3)	Fase Final (6 ≤ 12)	Fase Posterior (> 12)	Fase inicial (0 ≤ 3)	Fase Final (6 ≤ 12)	Fase Posterior (> 12)
Positivos	19	0	4	1	0	0
Negativos	0	21	102	0	10	56
Total	19	21	106	1	10	56

Fonte: Elaborado pelos autores (2021).

Os resultados obtidos através do método de diagnóstico molecular (*qPCR*) neste estudo apresentaram um alto índice de eficiência (100%) em pacientes multibacilares não-tratados ou no início do tratamento (até três meses de tratamento). É importante destacar que estes pacientes apresentavam índices baciloscópicos altos (IB = +3, +4 ou +5). Em pacientes multibacilares em tratamento há mais de seis meses ou que já haviam encerrado o tratamento (doze meses), a técnica utilizada não detectou a presença do *DNA* do patógeno conforme o desejado, demonstrado a eficácia do tratamento e do *qPCR*. Já em pacientes paucibacilares prospectivos, a eficiência do diagnóstico molecular foi

Revista Conexão na Amazônia, ISSN 2763-7921, n. 02, v. 03, 2021

baixa (9,1%). Segundo alguns autores (RUDEEANEKSIN *et al.*, 2008; MARTINEZ *et al.*, 2011), a positividade para as formas clínicas multibacilares (MB) chega a 100%, enquanto para as formas paucibacilares (PB) fica entre 34-80%. Foi possível perceber, quase na totalidade dos casos, uma relação direta entre a positividade da *qPCR* e da baciloscopia, conforme visto na figura 2.

Posteriormente, foram analisados os contatos positivos para a *qPCR*, onde foi possível observar que 40% (2/5) dos contatos eram de pacientes multibacilares não-tratados e 60% (3/5) eram contatos de pacientes multibacilares tratados (Tabela 5). Merece destaque o elevado número de contatos negativos de pacientes multibacilares não-tratados (95,7%).

Tabela 5: Amostras de contatos para a hanseníase analisadas pela *qPCR* em relação aos pacientes (multibacilares e paucibacilares) tratados e não-tratados

PCR em Tempo Real Quantitativa (qPCR)				
	Pacientes (MB)		Pacientes (PB)	
	Tratados (%)	Não-tratados (%)	Tratados (%)	Não-tratados (%)
Contatos Positivos	3 (2,6)	2 (4,3)	0 (0)	0 (0)
Contatos Negativos	111 (97,4)	45 (95,7)	51 (100)	1 (100)
Total	114 (100)	47 (100)	51 (100)	1 (100)

Fonte: Elaborado pelos autores (2021).

Manta *et al.* (2020) demonstraram que a presença de *DNA* de *M. leprae* é bem detectada em amostras de biópsias de pele e raspado dérmico, independentemente do método de extração ou da forma clínica do paciente. O mesmo ocorre nesse estudo quando pacientes não-tratados são analisados. Porém, os resultados encontrados neste estudo para o grupo dos contatos mostrou um nível de positividade muito baixa para a análise de *qPCR* comparados a outros estudos (MANTA *et al.*, 2019), o que pode sugerir que, para além da dificuldade natural de detecção do patógeno em amostras de raspado intradérmico auricular de pacientes paucibacilares e contatos intradomiciliares, possíveis problemas na coleta das amostras possam ter ocorrido, evidenciando a importância de treinamento e capacitação de toda a equipe técnica envolvida na assistência.

Por fim, vale ressaltar que a utilização nesse estudo de pacientes em tratamento e já tratados para a doença nos possibilitou observar uma relação interessante entre a fase do tratamento e a positividade para a doença em relação aos testes rápidos e a *qPCR*.

3.2 DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO PARA A HANSENÍASE

Em relação aos testes rápidos, inicialmente foram utilizados os testes *NDO-LID*, que de acordo com a literatura se mostravam um pouco mais sensíveis que os testes *ML-Flow (PGL-1)*, além de poderem ser realizados a partir de amostras de sangue dos indivíduos, o que facilitava muito sua utilização (DUTHIE *et al.*, 2014; AMORIM *et al.*, 2016). No entanto, como será apresentado e discutido a seguir, a sensibilidade dos testes *NDO-LID* foi baixa a partir de amostras de sangue. Além disso, no decorrer da pesquisa, devido a questões orçamentárias do projeto, tornou-se inviável a aquisição do produto para a conclusão do estudo, inclusive em relação ao estudo do grupo controle. Nesse sentido, foi decidido que seriam utilizados os testes *ML-Flow (PGL-1)* na continuidade da pesquisa, a partir de amostras de soro dos indivíduos.

Foram realizados inicialmente testes rápidos *NDO-LID* em 114 pacientes (81 multibacilares e 33 paucibacilares) e 35 contatos intradomiciliares. Destes, 46,9% (38/81) foram positivos em pacientes multibacilares e 15,2% (5/33) em pacientes paucibacilares. Além disso, 28,6% (10/35) dos testes foram positivos em contatos (Tabela 6).

Tabela 6: Classificação dos testes rápidos *NDO-LID* de pacientes (multibacilares e paucibacilares) e contatos para a hanseníase

	Testes Rápidos (NDO/LID)		
	Multibacilares (%)	Paucibacilares (%)	Contatos (%)
Positivos	38 (46,9)	5 (15,2)	10 (28,6)
Negativos	43 (53,1)	28 (84,8)	25 (71,4)
Total	81 (100)	33 (100)	35 (100)

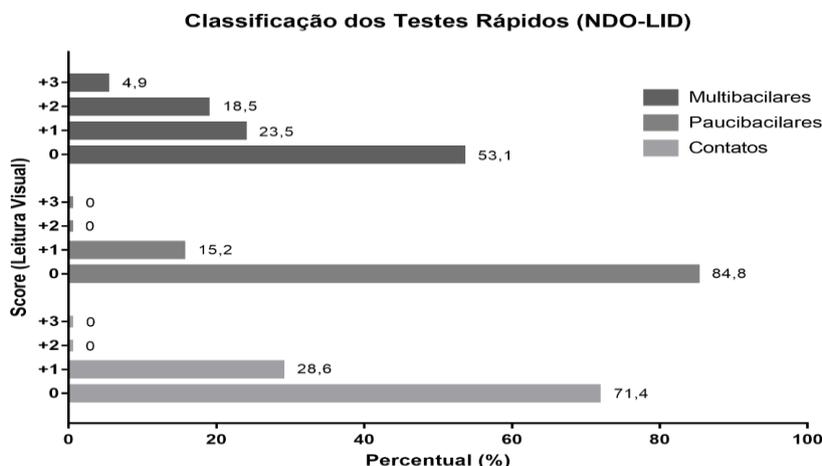
Fonte: Elaborado pelos autores (2021).

Os testes positivos para pacientes multibacilares (46,9%) foram classificados de acordo com sua positividade: 4,9% alta (+3), 18,5% média (+2) e 23,5% baixa (+1). Em relação aos testes positivos para pacientes paucibacilares (15,2%) e aos testes positivos para os contatos (28,6%), todos apresentaram positividade baixa (+1) (Figura 3).

Em relação aos testes rápidos *NDO-LID*, foi observada uma positividade mais baixa que a encontrada em outros trabalhos da literatura (FRADE *et al.*, 2017). Muito provavelmente, isto se deve ao fato de terem sido realizados a partir de amostras de sangue total, que interfere na sensibilidade do teste devido ao grupamento heme da hemoglobina, a fatores de coagulação e outros interfentes

do sangue, prejudicando assim a visualização e a interpretação dos testes. Este processo se torna ainda mais crítico devido ao fato de o teste rápido ter sido aplicado em campo, cuja visualização e interpretação após 20 minutos muitas vezes se torna impraticável.

Figura 3: Classificação dos testes rápidos *NDO-LID* de pacientes (multibacilares e paucibacilares) e contatos para hanseníase. Score: Negativo (0), Positividade baixa (+1), Positividade média (+2), Positividade alta (+3)



Fonte: Elaborado pelos autores (2021). Gráficos: *GraphPad Prism 7.0*.

Foi possível observar que o grupo de pacientes multibacilares apresentou um predomínio de positividade média (+2) (18,5%) e baixa (+1) (23,5%). Já o grupo de pacientes paucibacilares (15,2%) e o grupo de contatos intradomiciliares (28,6%), apresentaram um predomínio de positividade baixa (+1).

Posteriormente, foram realizados testes rápidos *ML-Flow (PGL-1)* em 36 pacientes (29 multibacilares e 7 paucibacilares), 84 contatos intradomiciliares e 89 controles. Destes, 72,4% (21/29) foram positivos em pacientes multibacilares e 57,1% (4/7) em pacientes paucibacilares. Além disso, 40,5% (34/84) dos testes foram positivos em contatos e 30,3% (27/89) positivos em controles, conforme Tabela 7.

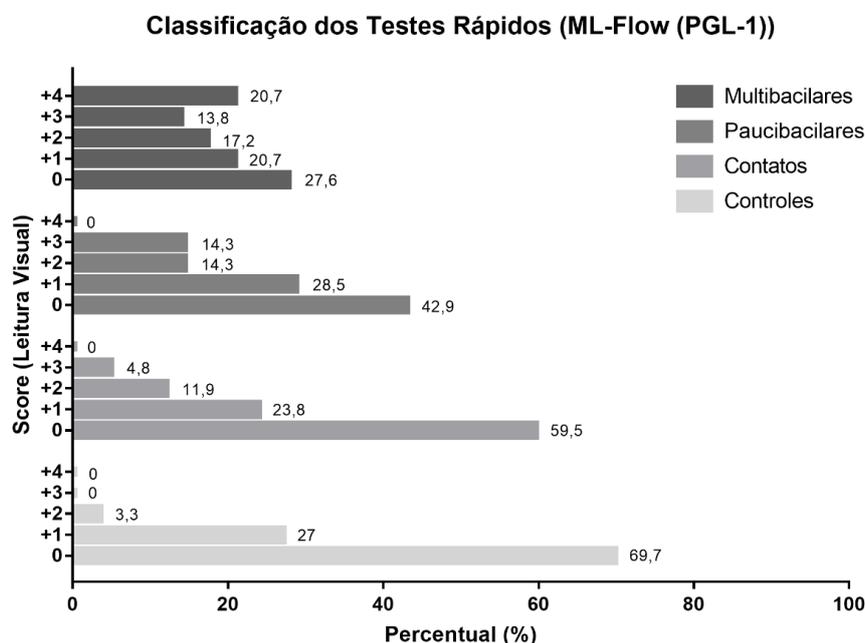
Tabela 7: Classificação dos testes rápidos *ML-Flow (PGL-1)* de pacientes (multibacilares e paucibacilares), contatos e controles para hanseníase

	Testes Rápidos (ML-Flow (PGL-1))			
	Multibacilares (%)	Paucibacilares (%)	Contatos (%)	Controles (%)
Positivos	21 (72,4)	4 (57,1)	34 (40,5)	27 (30,3)
Negativos	8 (27,6)	3 (42,9)	50 (59,5)	62 (69,7)
Total	29 (100)	7 (100)	84 (100)	89 (100)

Fonte: Elaborado pelos autores (2021).

Quando realizada a análise dos testes positivos para pacientes multibacilares (72,4%), eles foram classificados de acordo com sua positividade em: 20,7% muito alta (+4), 13,8% alta (+3), 17,2% média (+2) e 20,7% baixa (+1). Em relação aos 57,1% dos testes positivos para pacientes paucibacilares, eles foram classificados de acordo com sua positividade em: 14,3% alta (+3), 14,3% média (+2) e 28,5% baixa (+1). Já os 40,5% dos testes positivos para contatos, 4,8% apresentaram positividade alta (+3), 11,9% positividade média (+2) e 23,8% positividade baixa (+1). De 30,3% dos testes positivos para os controles, 3,3% apresentaram positividade média (+2) e 27% positividade baixa (+1) (Figura 4).

Figura 4: Classificação dos testes rápidos *ML-Flow (PGL-1)* de pacientes (multibacilares e paucibacilares), contatos e controles para hanseníase. Score: Negativo (0), Positividade baixa (+1), Positividade média (+2), Positividade alta (+3), Positividade muito alta (+4)



Fonte: Elaborado pelos autores (2021). Gráficos: *GraphPad Prism 7.0*.

Foi possível observar que os testes rápidos que apresentavam maior positividade eram de pacientes multibacilares e paucibacilares que não haviam iniciado o tratamento ou que estavam no início do tratamento (até três meses). Enquanto isso, os pacientes que já haviam concluído o tratamento, apresentaram positividade baixa ou eram negativos para o teste rápido. O mesmo quadro foi observado para os testes rápidos *NDO-LID*.

Revista Conexão na Amazônia, ISSN 2763-7921, n. 02, v. 03, 2021

A utilização dos testes rápidos *ML-Flow (PGL-1)* revelou um resultado mais satisfatório em relação aos testes rápidos *NDO-LID*, talvez por terem sido realizados a partir de amostras de soro.

É importante destacar o alto percentual de falso-positivos em contatos intradomiciliares (40,5%) e no grupo controle (30,3%), conforme observado em outros trabalhos da literatura (PENNA *et al.*, 2016; FRADE *et al.*, 2017). Estes dados poderiam descartar sua utilização para a triagem da doença e dificultar o uso exclusivo dos testes rápidos para diagnóstico da hanseníase. No entanto, novos estudos com a utilização de testes rápidos devem ser realizados para sua validação.

Para os testes rápidos *ML-Flow (PGL-1)*, devido a presença do grupo controle no estudo, foi possível avaliar sua eficácia para o grupo de pacientes multibacilares (Tabela 8) e paucibacilares (Tabela 9). Estes resultados se mostraram condizentes com a literatura (BUHRER-SÉKULA *et al.*, 2003; MOURA, 2014).

Tabela 8: Avaliação dos testes rápidos *ML-Flow (PGL-1)* utilizados no estudo no grupo de pacientes multibacilares. Legenda: VPP (Valor Preditivo Positivo), VPN (Valor Preditivo Negativo)

SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE	VPP	VPN	Acurácia
72,4%	69,7%	43,8%	88,6%	70,3%

Fonte: Elaborado pelos autores (2021).

Tabela 9: Avaliação dos testes rápidos *ML-Flow (PGL-1)* utilizados no estudo no grupo de pacientes paucibacilares. Legenda: VPP (Valor Preditivo Positivo), VPN (Valor Preditivo Negativo)

SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE	VPP	VPN	Acurácia
57,1%	69,7%	12,9%	95,4%	68,8%

Fonte: Elaborado pelos autores (2021).

Trabalhos mostram que a sensibilidade de alguns tipos de teste rápido (*NDO-LID*, *NDO*, *LID* ou *PGL-1*) em pacientes multibacilares variam de 80% a 95%, enquanto em pacientes paucibacilares variam de 15% a 64% (DUTHIE *et al.*, 2014; AMORIM *et al.*, 2016).

Os resultados dos testes rápidos obtidos neste e em outros trabalhos da literatura vêm comprovar a eficácia desta metodologia, mesmo apresentando algumas limitações, que uma vez aperfeiçoada (busca de novos alvos que

Revista Conexão na Amazônia, ISSN 2763-7921, n. 02, v. 03, 2021

tornem os testes rápidos mais específicos e sensíveis; uso de aplicativos gratuitos para leitura dos testes rápidos; padronização do score de classificação; por exemplo), poderá ser usada em maior escala para triagem inicial da doença em contatos intradomiciliares e na busca ativa de casos novos de hanseníase.

4 CONCLUSÕES

A partir das estratégias avaliadas neste trabalho, foi possível realizar de forma direta ou indireta a triagem da doença a partir da utilização de testes rápidos (para a avaliação de contatos intradomiciliares e na busca ativa de casos novos) e o diagnóstico precoce/acompanhamento do tratamento da doença (*qPCR*). No entanto, estudos adicionais são necessários para a validação e otimização destas metodologias.

Assim, os resultados obtidos neste estudo, como em outros trabalhos do nosso grupo e de pesquisadores na área, aliados a progressiva redução de custos destas tecnologias ocorrida na última década, vêm confirmando uma possível utilização desta metodologia como diagnóstico para a doença junto ao SUS. No entanto, apesar da existência de todas estas tecnologias, para que ocorra o controle da hanseníase no Brasil e no mundo são necessárias parcerias, grande mobilização social e vontade política dos gestores. Nessa perspectiva, o Programa Saúde da Família existente no país, associado ao papel dos Agentes Comunitários de Saúde (ACS), deveria ser intensificado em relação a vigilância de contatos, de forma a identificar precocemente casos novos da doença e auxiliar no tratamento de pacientes, contribuindo assim para a interrupção da cadeia de transmissão da hanseníase.

5 AGRADECIMENTOS

À PROINP e a PROEX do Instituto Federal do Acre (IFAC), pelos auxílios financeiros ao projeto e concessão de bolsas aos estudantes.

Ao Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Fiocruz/RJ, pelo apoio financeiro ao projeto, em especial ao Laboratório de Hanseníase pela disponibilização de sua estrutura física para realização dos experimentos da pesquisa.

REFERÊNCIAS

- AMORIM, F. M. *et al.* Identifying Leprosy and Those at Risk of Developing Leprosy by Detection of Antibodies against LID-1 and LID-NDO. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 9, p. e0004934, 2016.
- ARAÚJO, S. *et al.* Unveiling healthy carriers and subclinical infections among household contacts of leprosy patients who play potential roles in the disease chain of transmission. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. SUPPL.1, p. 55–59, 2012.
- AVANZI, C. **Genomics: a Swiss army knife to fight leprosy**. EPFL, 2018.
- BARTH-JAEGGI, T. *et al.* Leprosy Post-Exposure Prophylaxis (LPEP) programme: Study protocol for evaluating the feasibility and impact on case detection rates of contact tracing and single dose rifampicin. **BMJ Open**, v. 6, n. 11, p. e013633, 2016.
- BENJAK, A. *et al.* Phylogenomics and antimicrobial resistance of the leprosy bacillus *Mycobacterium leprae*. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 352, 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Controle da hanseníase: uma proposta de integração ensino-serviço**. Brasília: Ministério da Saúde, 1989.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de procedimentos técnicos: baciloscopia em hanseníase**. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Guia prático sobre a hanseníase**. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.
- BUHRER-SÉKULA, S. *et al.* Simple and fast lateral flow test for classification of leprosy patients and identification of contacts with high risk of developing leprosy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 5, p. 1991-5, 2003.
- COURA, J. R. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.
- DÜPPRE, N. C. *et al.* Impact of PGL-I seropositivity on the protective effect of BCG vaccination among leprosy contacts: A cohort study. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 6, p. e1711, 2012.
- DUTHIE, M. S. *et al.* Rapid quantitative serological test for detection of infection with *Mycobacterium leprae*, the causative agent of leprosy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 613-9, 2014.
- FABRI, A. C. **Análise comparativa da reatividade anti-LID-1, NDO-LID, NDO-HSA e PGL-1 em hanseníase**. Belo Horizonte. Tese [Doutorado em Enfermagem] – Universidade Federal de Minas Gerais, 2015.

- FAVA, V. *et al.* Genetics of leprosy reactions: An overview. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, p. 132-42, 2012.
- FRADE, M. A. C. *et al.* Unexpectedly high leprosy seroprevalence detected using a random surveillance strategy in midwestern Brazil: A comparison of ELISA and a rapid diagnostic test. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 2, p. e0005375, 2017.
- HAN, X. Y. *et al.* A new Mycobacterium species causing diffuse lepromatous leprosy. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 130, n. 6, p. 856–864, 2008.
- KAMPIRAPAP, K. Assessment of subclinical leprosy infection through the measurement of PGL-1 antibody levels in residents of a former leprosy colony in Thailand. **Leprosy Review**, v. 79, n. 3, p. 315, 2008.
- MAGALHÃES, M. C. C.; ROJAS, L. I. Diferenciação territorial da hanseníase no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, n. 2, p. 75-84, 2007.
- MANTA, F. S. N. *et al.* Quantitative PCR for leprosy diagnosis and monitoring in household contacts: A follow-up study, 2011–2018. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–8, 2019.
- MANTA, F. S. N. *et al.* Ultra-sensitive detection of mycobacterium leprae: DNA extraction and PCR assays. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, p. e0008325, 2020.
- MARTINEZ, A. N. *et al.* Evaluation of qPCR-Based assays for leprosy diagnosis directly in clinical specimens. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 10, p. 1–8, 2011.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Caderno 7. 7. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.
- MONOT, M. *et al.* Comparative genomic and phylogeographic analysis of Mycobacterium leprae. **Nature Genetics**, v. 41, n. 12, p. 1282, 2009.
- MOURA, R. S. **Avaliação de diferentes métodos para classificação de pacientes e de carreadores de antígenos empregados na sorologia da hanseníase**. Goiânia. Tese [doutorado] – Universidade Federal de Goiás, 2014.
- NÓBREGA MARTÍNEZ, A. **Detecção de Mycobacterium leprae através da técnica de PCR e RT-PCR em tempo real**. Rio de Janeiro. Tese [Doutorado em Biologia Celular e Molecular] – Instituto Oswaldo Cruz, 2009.

Revista Conexão na Amazônia, ISSN 2763-7921, n. 02, v. 03, 2021

PEELING, R. W. *et al.* Why do we need quality-assured diagnostic tests for sexually transmitted infections? **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 12, p. 909, 2006.

PENNA, M. L. F. *et al.* Anti-PGL-1 Positivity as a Risk Marker for the Development of Leprosy among Contacts of Leprosy Cases: Systematic Review and Meta-analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 5, p. e0004703, 2016.

REED, S. G.; ORR, M. T.; FOX, C. B. Key roles of adjuvants in modern vaccines. **Nature Medicine**, v. 19, p. 1597-608, 2013.

RICHARDUS, J. H. *et al.* Leprosy post-exposure prophylaxis with single-dose rifampicin (LPEP): an international feasibility programme. **The Lancet Global Health**, v. 9, n. 1, p. e81-e90, 2021.

RICHARDUS, R. A. *et al.* Longitudinal assessment of anti-PGL-I serology in contacts of leprosy patients in Bangladesh. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 12, p. e0006083, 2017.

RITZ, C.; SPIESS, A. N. qpcR: An R package for sigmoidal model selection in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis. **Bioinformatics**, v. 24, n. 13, p. 1549-51, 2008.

ROBBINS, G. *et al.* Ancient skeletal evidence for leprosy in India (2000 BC). **PloS One**, v. 4, n. 5, p. e5669, 2009.

RODRIGUES, L. C.; LOCKWOOD, D. N. J. Leprosy now: Epidemiology, progress, challenges, and research gaps. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, n. 6, p. 464-70, 2011.

RUDEEANEKSIN, J. *et al.* LightCycler™ real-time PCR for rapid detection and quantitation of *Mycobacterium leprae* in skin specimens. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 263-70, 2008.

SALES, A. M. *et al.* Leprosy among patient contacts: A multilevel study of risk factors. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 3, p. 1–6, 2011.

SAMPAIO, P. B. *et al.* Correlation between the spatial distribution of leprosy and socioeconomic indicators in the city of Vitória, State of ES, Brazil. **Leprosy review**, v. 84, n. 4, p. 256–265, 2013.

SCHILLING, R. P. *et al.* Polymorphism N248S in the human Toll-like receptor 1 gene is related to leprosy and leprosy reactions. **Journal of Infectious Diseases**, v. 199, n. 12, p. 1816-9, 2009.

SILVA, E. A. *et al.* Serodiagnosis of leprosy and follow-up of household contacts using a commercial rapid test containing ND-O/LID-1 antigens. **Leprosy Review**, v. 88, p. 174-83, 2017.

Revista Conexão na Amazônia, ISSN 2763-7921, n. 02, v. 03, 2021

SMITH, W. C. S.; AERTS, A. Role of contact tracing and prevention strategies in the interruption of leprosy transmission. **Leprosy review**, v. 85, n. 1, p. 2–17, 2014.

STEINMANN, P. *et al.* Innovative tools and approaches to end the transmission of *Mycobacterium leprae*. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 9, p. e298-305, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global Leprosy Strategy: Accelerating towards a leprosy-free world**. Geneva: WHO, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global leprosy (Hansen disease) update, 2019**: time to step-up prevention initiatives. *Weekly epidemiological record*, v. 95, n. 36, p. 417–440, 2020.