



Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real para detecção de *Mycobacterium leprae* como alternativa para o diagnóstico da hanseníase

Maria Gláucia Silva de Lima¹, Milton Ozório Moraes², Carolina Chrusciak Talhari Cortez³

Resumo

A hanseníase é uma doença infectocontagiosa causada pelo *Mycobacterium leprae* que afeta a pele e nervos periféricos. A Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR), vem contribuindo para o diagnóstico da hanseníase, principalmente em casos de difícil diagnóstico. Este trabalho teve por objetivo avaliar o desempenho da qPCR na detecção de *M. leprae* em biópsias cutâneas de pacientes com suspeita clínica de hanseníase e submetidos à exame histopatológico. As amostras foram processadas no Laboratório de Biologia Molecular da Fundação Alfredo da Matta, na cidade de Manaus, Amazonas. A quantificação de DNA de 82 biópsias frescas e 98 biópsias parafinadas foi realizada por fluorimetria. Para as ampliações de DNA foi utilizada a qPCR, a partir de uma sequência específica do gene 16S de *M. leprae*. Os resultados das 38 biópsias frescas de pacientes com hanseníase foram: positividade no teste molecular para hanseníase (68,5%), sensibilidade (68,5%) e especificidade (66,70%). Das 61 biópsias parafinadas de pacientes com hanseníase, 73,8% foram positivas, com sensibilidade de 73,8% no teste molecular. Os resultados sugerem que a qPCR confirma a diferença entre pacientes multibacilares e paucibacilares tanto em biópsias frescas quanto em biópsias parafinadas, com prevalência de genomas em pacientes multibacilares no grupo de amostras frescas. Os dados quantitativos nas amostras de pacientes paucibacilares embora apresentem menor número de genomas, também têm percentual maior de positividade. A qPCR pode ser eficaz, em especial nos casos inconclusivos, de difícil diagnóstico como nas formas paucibacilares, além de ser reprodutível e não necessitar de microscopistas experientes.

Palavras-Chave: genoma, lepra, paucibacilar, qPCR, saúde pública.

Real-time Polymerase Chain Reaction for the detection of *Mycobacterium leprae* as an alternative for the diagnosis of leprosy. The *Mycobacterium leprae* is a microorganism that can cause an infection that affects skin and nerves. This infection is curable and known as leprosy or Hansen's disease. The skin and nerves symptoms are sometimes not enough for the diagnosis. Polymerase chain reaction (qPCR) has been used together with the clinical features to confirm cases. This study was conducted to identify the performance of qPCR as a diagnostic method to confirm *M. leprae* in biopsies from patients with Hansen's clinical features. At the Molecular Biology Laboratory at Alfredo da

¹ Professora, Faculdade Estácio do Amazonas, Manaus, AM, Brasil, glaucialima_lds@hotmail.com

² Pesquisador Associado Saúde Pública, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, milton.moraes@fiocruz.br

³ Profa Adjunta de Dermatologia UEAniversidade, Manaus, AM, Brasil, carolinatalhari@gmail.com

Matta Foundation, Manaus-AM-Brazil. The fluorimetry was performed from the DNA of 82 fresh biopsy samples and 98 biopsy blocks. Between the fresh biopsy 38 samples and between the biopsy blocks 61 samples were able to perform the qPCR. The DNA from those samples were amplified using the sequence from *M. leprae's* 16S gene. The results from the fresh samples identified 68.5% of positivity for Hansen's disease, 68.5% of sensibility, 66.7% of specificity. As from the blocks samples was identified 73.8% of positivity and 73.8% of specificity. The results suggest that qPCR is efficient to provide confirmation between paucibacillary and multibacillary patients. The paucibacillary samples analysed presented less genoma prevalence and more positivity for Hansen's. The qPCR is a method that not only has reproducibility and requires simple training but also the study showed that it can assist the diagnosis confirmation in inconclusive cases.

Keywords: genome, leprosy, paucibacillary, qPCR, public health.

1. Introdução

A hanseníase é uma doença infecciosa-crônica causada pelo *Mycobacterium leprae*, parasita intracelular obrigatório com afinidade por macrófagos do tecido cutâneo e células de Schwann do sistema nervoso periférico (MARCIANO et al., 2018; HAROUN et al., 2019). A presença do bacilo no organismo humano resulta em lesões dermato-neurológicas, com alto poder incapacitante (SOUZA e MATOS, 2017).

Devido ao alto poder incapacitante, a hanseníase constitui um problema de saúde pública em vários países do mundo (SANTOS et al., 2019). No ano de 2017, em todo o mundo, um total de 210.671 pacientes foram diagnosticados com hanseníase (BANDEIRA et al., 2019). No Brasil, em 2018, foram identificados um total de 28.660 novos casos da doença. Entre os estados na região Norte, a hanseníase permanece endêmica no Amazonas, onde foram identificados 425 novos casos (BRASIL, 2020).

A classificação de proposta por Ridley e Jopling, em 1966, considera os dados clínicos, histológicos e bacteriológicos da hanseníase. Essa classificação inclui duas formas polares, tuberculóide (apresentam poucos bacilos e forte resposta de imunidade

celular) e virchowiana (alta carga bacteriana e fraca imunidade celular). Além disso, três formas intermediárias encontram-se entre os polos: borderline-tuberculóide, borderline e borderline-virchowiana (PENNA et al., 2017). Entretanto, para fins de tratamento, a doença é classificada como paucibacilar (PB) e multibacilar (MB). A hanseníase PB, forma mais branda da doença, é caracterizada por poucas lesões cutâneas (até cinco), hipopigmentadas, pálidas, avermelhadas, hipo ou anestésicas e baixa carga bacilar (GASCHIGNARD et al., 2016; SARKAR e PRADHAN, 2016). Na forma MB, há presença de mais de cinco lesões que se desenvolvem como nódulos, placas ou infiltração difusa da pele, além de elevada carga bacilar (CRUZ et al., 2017; PRADHAN et al., 2019).

A transmissão da hanseníase ocorre pelo contato prolongado e íntimo do portador do *M. leprae* com indivíduos suscetíveis ou geneticamente predispostos, inalação do microrganismo por via aérea e por contato íntimo (VIVEIRO et al., 2017). Além disso, a existência de uma fonte ambiental do bacilo, como água e solo, próxima ao centro da hanseníase endêmica, também é um fator que favorece a disseminação da doença. A mucosa nasal é a principal via de entrada do *M.*

leprae no organismo humano (CASTRO et al., 2018; SIDDIQUI et al., 2019).

A detecção precoce, associada ao início rápido do tratamento são fundamentais para reduzir as sequelas físicas e as complicações sociais da doença (ALOTAIBI et al., 2016). A identificação tardia geralmente está associada a erros de diagnóstico, ausência de serviços e profissionais de saúde, falta de conscientização, crença na auto cura e uso da medicina tradicional. O estigma social é outro fator associado com o atraso na identificação e tratamento da doença, pois as pessoas afetadas só procuram auxílio médico após o desenvolvimento das incapacidades motoras permanentes e visíveis (VAN 'T NOORDENDE et al., 2019).

O diagnóstico clínico da hanseníase comumente se baseia na identificação de sinais e sintomas clínicos característicos, como lesões cutâneas, perda de sensibilidade, fraqueza nos pés e mãos, presença de deformidades visíveis e esfregaço de pele positivo (FISCHER et al., 2017). Entretanto, formas paucibacilares e neurais podem ser confundidas com outras doenças de pele, como granuloma anular, sarcoidose e pitíriase alba. Além disso, pacientes multibacilares podem não apresentar sintomas clássicos, como perda de sensibilidade, favorecendo a transmissão ativa da doença e as sequelas permanentes da infecção (MEDLEY, et al., 2018).

O desenvolvimento de um teste eficaz para o diagnóstico da hanseníase é essencial para o início precoce do tratamento. Os testes atuais, como o esfregaço de pele e análise histopatológica, embora sejam altamente específicos, são pouco sensíveis (LETURIONDO et al., 2019). Neste contexto, as técnicas moleculares, como Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) vem se destacando como uma alternativa promissora no diagnóstico da

hanseníase por apresentarem alta sensibilidade e especificidade quando comparadas aos métodos tradicionais (MALTEMPE et al., 2016; CHAITANYA et al., 2017).

A PCR em Tempo Real (qPCR) vem sendo utilizada em procedimentos de diagnóstico clínico e histopatológico para rápida detecção da hanseníase (BARBIERI et al., 2019). O uso desta técnica permite a quantificação direta do DNA do *M. leprae* em diferentes amostras laboratoriais, tais como, esfregaço de pele, biópsias cutâneas, urina, sangue e secreção nasal (MARQUES et al., 2018; MANTA et al., 2020). Estudos têm demonstrado que a qPCR aumenta a confiabilidade e precisão dos resultados para avaliação das diferentes formas clínicas da hanseníase, principalmente em casos de pacientes paucibacilares e de difícil diagnóstico (BARBIERI et al., 2014; AZEVEDO et al., 2017; MANTA et al., 2019).

Considerando o alto poder incapacitante da hanseníase, as limitações dos exames disponíveis na rotina laboratorial, a necessidade diagnóstico precoce e a elevada precisão da qPCR, este trabalho teve por objetivo avaliar o desempenho da qPCR na detecção de *M. leprae* em biópsias cutâneas de pacientes com suspeita clínica de hanseníase e exame histopatológico inconclusivo para a doença.

2. Material e Método

2.1 Tipo de estudo

O estudo foi caracterizado como transversal, utilizando amostras de arquivo em parafina e biópsias frescas obtidas no Centro Cirúrgico da Fundação Alfredo da Matta (FUAM). Essas amostras foram conduzidas ao Laboratório de Biologia Molecular da FUAM e utilizadas na validação do teste



de qPCR para diagnóstico da hanseníase. No estudo foram utilizadas amostras sabidamente positivas e negativas para a hanseníase bem como amostras com suspeita clínica de hanseníase e exame histopatológico inconclusivo para a doença, atendidos por demanda espontânea na FUAM, no período de março a agosto de 2014 para amostras frescas. As amostras incluídas em parafina foram recuperadas de arquivo a partir de março de 2014 até maio de 2015.

2.2 Aspectos éticos

O presente estudo foi aprovado no Comitê de Ética e Pesquisa da Fundação Alfredo da Matta (CEP-FUAM) sob parecer n. 522.919, em 06 de fevereiro de 2014. Todos os pacientes incluídos neste estudo leram e foram instruídos quanto a participação no estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE.

2.3 Amostragem

No presente estudo foram coletadas 82 biópsias cutâneas frescas de pacientes, incluídos em três grupos: controle positivo, dermatoses não infecciosas e suspeitos/inconclusivos. No grupo controle, definido com a doença, foram incluídos os pacientes MB (incluindo as formas clínicas virchovianas, borderline virchovianas e borderline-borderline) e pacientes PB (incluindo as formas clínicas indeterminada e tuberculóide). O grupo de outras dermatoses, considerado negativo para a hanseníase, foi composto de amostras com diagnóstico clinicamente confirmado para doenças dermatológicas de origem não infecciosa, como: psoríase, ptiíase versicolor, vitiligo e granuloma anular. E o último grupo, o de suspeitos, ou seja, o grupo teste composto por biópsias de pacientes com suspeita clínica de hanseníase e exame histopatológico

inconclusivo para a doença. Em relação às biópsias parafinadas, foram recuperadas 98 amostras de arquivo da Histopatologia da FUAM e distribuídas também em três grupos idênticos aos das biópsias frescas.

2.4 Coleta das amostras

A coleta das amostras frescas ocorreu no período de março de 2014 a maio de 2015. As biópsias cutâneas foram coletadas com *punch* (3 mm) e conservadas em etanol a 70% (v/v) (BRASIL, 2010). Essas amostras foram armazenadas em freezer -70°C e posteriormente processadas no Laboratório de Biologia Molecular da FUAM. Em relação às biópsias parafinadas, as amostras se encontravam no arquivo da Histopatologia da FUAM e, somente após a análise histopatológica, foram retirados cinco cortes de 5 μm do tecido e armazenados em freezer até o processamento de extração de DNA.

2.5 Extração de DNA

O DNA total foi extraído das amostras pelo *Kit DNeasy Blood and Tissue®* (QIAGEN) seguindo as recomendações do fabricante. Previamente ao protocolo de extração de DNA, nas biópsias armazenadas em etanol 70% (v/v), o tecido foi fragmentado com auxílio de lâminas de bisturi estéril, enquanto que no outro grupo de biópsias, houve um tratamento prévio para retirar a parafina. Um volume de 500 μL de xilol aquecido a 45°C foi adicionado para remoção da parafina. O tubo foi agitado manualmente e centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos para sedimentação dos cortes. O procedimento foi repetido até a retirada total da parafina.

2.6 Quantificação de DNA por Fluorimetria

O DNA total extraído das amostras foi quantificado utilizando o Qubit®3.0

fluorímetro, com o *kit Qubit™ dsDNA BR assay (Life Technologies)*, de acordo com as instruções do fabricante. Este equipamento permite a quantificação de DNA, RNA e proteínas utilizando corantes fluorescentes específicos para cada tipo de biomolécula, mesmo em baixas concentrações.

2.7 Detecção de DNA de *M. leprae* utilizando qPCR

Para a detecção do DNA de *M. leprae*, o alvo de amplificação foi a região gênica de cópia única 16S rRNA específica do bacilo, conforme método descrito por MARTINEZ et al. (2011). O estudo de amplificação do gene alvo foi realizado pela técnica de PCR quantitativo, a qual é baseada no monitoramento do nível de fluorescência detectada durante a amplificação de DNA ciclo a ciclo. As amostras de DNA foram submetidas à amplificação da região ribossomal 16S de *M. leprae*, em triplicata, utilizando como primer senso a sequência 5'- GCA TGT CTT GTG GTG GAA AGC-3' e anti-senso 5'-CAC CCC ACC AAC AAG CTG AT-3', além de utilizar como sonda fluorogênica a sequência 16S rRNA Taq-probe (5'-CAT CCT GCA CCG CA-3') da Applied Biosystem™. As condições de ciclagem utilizadas nas reações de amplificação foram: 50°C por 2 minutos, seguida de incubação a 95°C por 10 minutos; 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, utilizando o sistema PCR em tempo real. As reações foram procedidas no *StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems (Life Technologies)*. A princípio, as triplicatas que tiveram amplificações em pelo menos duas ou três replicatas e com Ct (*Cycle threshold*) menor ou igual a 37 foram consideradas positivas.

2.8 Quantificação absoluta

A plataforma *StepOnePlus™* é capaz de detectar a luz oriunda da reação de amplificação, onde o nível de fluorescência computado é aquele suficiente para atingir um limiar de detecção para cada amostra analisada e por convenção denominado de Ct. A quantidade de DNA do *M. leprae* presente nas amostras clínicas foi estimado através de uma associação estatística entre o valor de Ct, obtido para cada amostra analisada, em função do tamanho do genoma do *M. leprae*. Neste teste foi realizada análise de regressão linear utilizando o software R, onde os valores de Ct, gerados a partir de uma curva padrão (amostras com concentrações conhecidas variando de 1ng a 3,25fg) foram plotados e uma equação da reta construída, sendo possível, a partir desta, estimar o número de cromossomos de *M. leprae*, considerando que o genoma deste bacilo equivalia a 3fg (MARTINEZ et al., 2011).

2.9 Análise estatística

Para avaliar o alvo 16S como marcador de diagnóstico de *M. leprae* foram realizados os testes de Sensibilidade, calculada através da seguinte equação: $[VP/(VP+FN)]$ (onde VP são os verdadeiros positivos e FN os falsos negativos). Esta equação mede a capacidade do teste de detectar os pacientes com a doença. Também foi calculada a Especificidade do teste que avalia a probabilidade de detectar os não doentes. A fórmula utilizada para o cálculo da Especificidade foi: $[VN/(VN+FP)]$ (onde VN são os verdadeiros negativos e FP os falso positivos) (FLETCHER et al., 2014). Além disso, foi realizado o teste de ANOVA e a Correção de Bonferroni no programa *GraphPad Prism 5.04* para comparar o número de genomas entre os tipos de biópsias.

3. Resultados

No presente estudo, das 82 biópsias frescas, apenas 65 tiveram amplificação no teste de qPCR para *M. leprae*. Nas 17 biópsias restantes o DNA não foi usado a amplificação devido a quantidades ínfimas de amostra, presença de impurezas e reagentes da extração. MARTINEZ et al. (2018) citaram que a temperatura e o fator de congelamento/descongelamento das amostras podem interferir de forma significativa na concentração e na integridade do DNA presente em tecidos utilizados em diagnóstico molecular.

Nas condições avaliadas, foi verificado que houve convergência entre o laudo da patologia e a conclusão diagnóstica. Nove pacientes

foram diagnosticados com outras dermatoses, como granuloma anular, lesão tumoral, micose fungóide granulomatosa, melanoma, lúpus eritematoso subagudo e linfoma. Destes, dois tiveram resultado de qPCR positivo para granuloma anular e lesão tumoral, com número de genomas de 48,24 e 18,40, respectivamente (Tabela 1). Apesar do resultado positivo de qPCR, essas amostras foram consideradas como controles negativos para fins de comparação para os testes de especificidade e sensibilidade. Visto que a classificação foi realizada baseada no diagnóstico clínico, e que clinicamente estes pacientes foram classificados com outras dermatoses.

Tabela 1. Histórico de hanseníase, laudo histopatológico, baciloscopia, diagnóstico clínico, resultados de qPCR e número de genomas em amostras de biópsias frescas.

Histórico de hanseníase	Laudo histopatológico	Baciloscopia	Diagnóstico clínico	qPCR	Número de genomas
Não	Lúpus tumido	NR	Lúpus tumido	-	ND
Não	Ausente	-	Micose fungóide granulomatosa	-	ND
Não	Descritivo	-	Outras afecções da pele	+	10,49
Não	Carcinoma	NR	Lesão tumoral	+	18,40
Não	Paniculite/ eritema nodoso	NR	Eritema nodoso	-	ND
Não	GAE	-	Granuloma anular	+	48,24
Não	Ceratose actínica	-	Melanoma	-	ND
Não	Descritivo	-	Púrpura pigmentar	-	ND
Não	Descritivo	NR	Lúpus eritematoso subagudo	-	ND

GAE = Granuloma anular elastofílico; NR= não realizada; - = negativo para DNA de *M. leprae*; + = positivo para DNA de *M. leprae*; ND = não determinado.

No desenvolvimento de novos métodos de diagnósticos da hanseníase há carência de padrão-ouro para comparação de resultados e validação de técnicas moleculares. MARTINEZ et al. (2011) avaliaram a sensibilidade e a especificidade de testes moleculares para detecção de DNA de *M. leprae* em amostras clínicas de pacientes hansenianos e indivíduos com outras dermatoses. Algumas doenças granulomatosas podem levar a erros de

diagnóstico, como a sarcoidose, pois a presença de granuloma epitelióide é um sinal cardinal na histopatologia que define uma chave de classificação onde está também a hanseníase, indicando a probabilidade média de ser hanseníase, mas não exclui outra inflamação granulomatosa (BARBIEIRI et al., 2014). A detecção de DNA de *M. leprae*, dentre pacientes com outras dermatoses, pode ainda ser devido a possibilidade de terem uma infecção subclínica. De fato,

muitas das amostras positivas ao qPCR, nesse grupo de outras dermatoses, relatam histórico de contato com a hanseníase. Portanto, poderia sugerir que haveria algum DNA de *M. leprae* na pele, não especificamente relacionado à lesão, sendo está uma condição difícil de se determinar.

Em relação às amostras frescas de pacientes com hanseníase (grupo controle), foram recuperadas 38 amostras. Entre estes 13 pacientes foram diagnosticados como hanseníase multibacilar e todos foram positivos para o teste do qPCR. As 25 amostras restantes foram classificadas como paucibacilares, sendo que 52% (13/25) foram positivos para a qPCR (Tabela 2). Estes resultados indicam que a qPCR é eficiente para a detecção do *M. leprae* tanto em pacientes paucibacilares quanto em multibacilares. Entretanto, em indivíduos multibacilares a técnica apresentou mais sensibilidade (68,50%). Estudos realizados com qPCR indicam uma positividade de 50-75% no grupo de pacientes com poucos bacilos (KRAMME et al., 2004; MARTINEZ et al., 2006; RUDEEANEKSIN et al., 2008; BARBIERI et al., 2019).

Tabela 2- Desempenho do Teste Molecular para o alvo *IS6110* específico para *M. leprae* em biópsias frescas.

Classificação operacional	Biópsias frescas (n=38)	
	Positivo % (n)	Negativo % (n)
Paucibacilares	52 (13)	48 (12)
Multibacilares	100 (13)	0 (0)
Total 38	68,5 (26)	31,5 (12)

A Figura 1 demonstra a relação entre classificação operacional MB e PB versus o número de genomas. Os resultados obtidos evidenciaram que a mediana do número de genomas em pacientes MB é maior que em pacientes PB para esse grupo de amostras.

Entre o grupo de suspeitos, um quantitativo de 12 amostras tiveram

diagnóstico inconclusivo, nas quais os resultados das análises clínica e histopatológica foram insuficientes para definir um diagnóstico com precisão. Entre essas amostras, especificamente oito amostras (66,6%) foram positivas para a qPCR, resultado que evidencia que esta técnica de análise molecular, juntamente com o histórico clínico e a avaliação dermatoneurológica, pode auxiliar no diagnóstico precoce e dos casos inconclusivos, possibilitando o tratamento da doença. Nesses casos, é comum o laudo histopatológico indicar um processo/infiltrado inflamatório granulomatoso, ou inespecífico (descritivo), compatível com hiperchromia residual, eritema anular centrífugo e pele normal (Tabela 3).

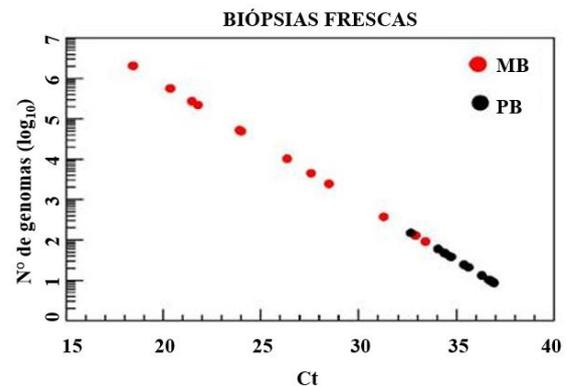


Figura 1 - Classificação operacional MB e PB versus o número de genomas (MB: multibacilar; PB: paucibacilar; Ct: Cycle threshold; Nº: número).

Os dados do presente estudo para as amostras inconclusivas sugerem que quando avaliado o resultado da histopatologia descritivo, apenas frente ao número de genomas, é possível inferir que a amostra é de um paciente de hanseníase, claramente apoiada por suspeita clínica dermatológica. Quando a amostra apresenta um alto número de genomas é razoável inferir que a probabilidade do diagnóstico ser hanseníase é alta. Entretanto, dado a

especificidade do ensaio (66,70%) observada nesta pesquisa, algumas amostras são provavelmente falsos positivos. Em estudos realizados por AZEVEDO et al. (2017) e BARBIERI et al. (2019) foram determinadas especificidades de qPCR para a identificação de *M. leprae* em 100% e 91%, respectivamente. Considerando que o estabelecimento do ponto de corte, ainda que empírico, seja baseado em estudos anteriores (MARTINEZ et al., 2011; BARBIERI et al., 2014), onde o valor

do Ct faz uma inferência a partir de curvas padrão utilizadas anteriormente, que indicam que o valor de Ct de 37, apresenta aproximadamente 8 genomas. Este valor, teoricamente, sugeriria uma chance maior de especificidade mais alta. Assim, apenas um acompanhamento de longo prazo e eventualmente a prova terapêutica quando indicado pelo dermatologista que poderiam auxiliar na análise definitiva dos resultados.

Tabela 3 – Hipótese diagnóstica, histórico de hanseníase, laudo histopatológico, baciloscopia, resultados de qPCR e número de genomas em amostras de biópsias frescas com diagnóstico inconclusivo para hanseníase

Hipótese diagnóstica	Histórico de Hanseníase	Laudo histopatológico	Baciloscopia	qPCR	Número de genomas
Hanseníase ou neuralgia parastésica	Não	Hiperchromia residual	-	+	12,00
Hipocromia, eritema	Não	Descritivo	NR	+	20,90
Hanseníase BT	Sim	Descritivo	-	+	11,29
Hanseníase V	Sim	Descritivo	-	-	ND
Paniculite, micobacteriose	Não	Descritivo	NR	-	ND
Lúpus eritematoso discoide	Não	Descritivo	NR	-	ND
Granuloma doença de Lyme	Não	Descritivo	-	+	20,34
Lúpus eritematoso discoide	Sim	PIG	NR	+	22,64
Eritema anular centrífugo	Não	EAC	NR	+	11,83
Hanseníase foliculite	Não	Hanseníase, sífilis	-	-	ND
Hiperchromia residual, hanseníase	Sim	Infiltrado Inflamatório	-	+	12,65
Hanseníase indeterminada	Sim	Pele normal	-	+	10,99

PIG = Processo inflamatório granulomatoso; EAC = Eritema anular centrífugo; - = negativo; NR = não realizada; + = positivo; ND = não determinado.

Em relação às amostras parafinadas, 31 eram de pacientes multibacilares e 30 de pacientes paucibacilares. Os resultados de desempenho demonstraram que a qPCR para amplificação do fragmento de DNA 16S do *M. leprae* é menos sensível em amostras de pacientes multibacilares (69%) do que em paucibacilares (80%) (Tabela 4). Os resultados do presente estudo corroboram com os descritos por YAN et al. (2014) que verificaram

positividade de 75% em biópsias parafinadas de pacientes paucibacilares. MARQUES et al. (2017) observaram que a qPCR foi 18,28 % mais sensível para amostra de pacientes MB quando comparados com os PB. MANTA et al. (2020) citaram que a sensibilidade da qPCR varia de acordo com a metodologia de extração do DNA, alvo de ampliação da região gênica, local de coleta e tipo de amostra clínica.

Tabela 4 - Desempenho do Teste Molecular para o alvo *16S* específico para *M. leprae* em biópsias parafinadas.

Classificação operacional	Biópsias de parafina (n=61)	
	Positivas % (n)	Negativas % (n)
Paucibacilares	80 (24)	20 (6)
Multibacilares	69 (21)	31 (10)
Total 61		

A sensibilidade do teste de qPCR para biópsias parafinadas foi de 73,8%. Entretanto, não foi possível calcular a especificidade neste grupo, pois não havia um grupo de não doentes para usar como comparação. A estimativa da quantidade de genomas dentre os pacientes MB e PB provenientes das biópsias parafinadas é mostrada na Figura 2. Os resultados evidenciaram que o número de genomas em pacientes MB é maior que em pacientes PB, resultado semelhante ao observado em biópsias frescas. Segundo as citações de CRONIN et al. (2004) e XIE et al. (2011) em amostras parafinadas pode haver fragmentação do material genético, o que pode explicar a diferença de sensibilidade da qPCR entre as amostras frescas e parafinadas.

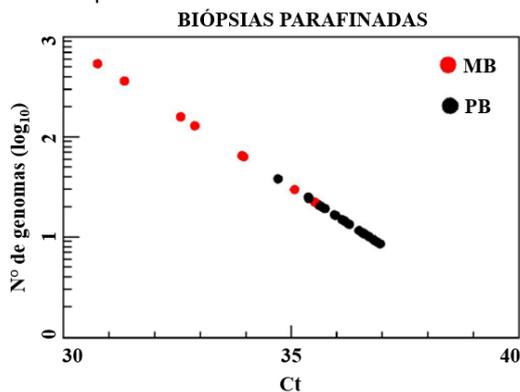


Figura 2 - Relação entre a classificação operacional MB e PB versus o número de genomas (MB: multibacilar; PB: paucibacilar; Ct: Cycle threshold; N°: número).

A análise do número de genomas é interessante, pois confirma que as amostras de pacientes MB têm mais DNA e conseqüentemente, mais bacilos que

os pacientes PB, sugerindo que a metodologia seria capaz de inferir uma espécie de índice baciloscópico molecular (Figura 3). A detecção de DNA das amostras recuperadas de parafina dentre os pacientes paucibacilares, foi um resultado promissor, considerando que pode haver degradação desse composto orgânico durante o período de fixação. Embora haja a necessidade de melhoria do teste de qPCR, nas condições utilizadas no presente estudo para aplicação clínica, a detecção de alta carga molecular é certamente compatível com hanseníase e pode antever algumas aplicações interessantes. Além disso, a possibilidade de quantificar precisamente o número de bacilos em pacientes com alta carga bacilar pode ser uma estratégia para acompanhamento ou avaliação da ausência de melhora frente ao tratamento e/ou falha terapêutica. Portanto, a técnica poderia ser usada em análises de seguimento nos mesmos pacientes para avaliar a eficácia do tratamento.

A técnica de qPCR para detecção de *M. leprae* possui vantagens, pois pode ser utilizada na análise simultânea de grandes números de amostras, com resultados em três horas. Na baciloscopia o tempo necessário para a coloração e contagem dos bacilos é significativamente superior, principalmente quando são avaliadas amostras de pacientes. Entretanto, a qPCR apresenta limitações relacionadas com o elevado custo dos equipamentos e reagentes, ao contrário da

microscopia tradicional. Em alguns serviços de saúde pública, onde não há profissionais capacitados para avaliação de amostras de pacientes com hanseníase, o uso da qPCR pode diminuir a chance de resultados falso-negativos quando utilizada como ferramenta diagnóstica complementar (AZEVEDO et al., 2017)

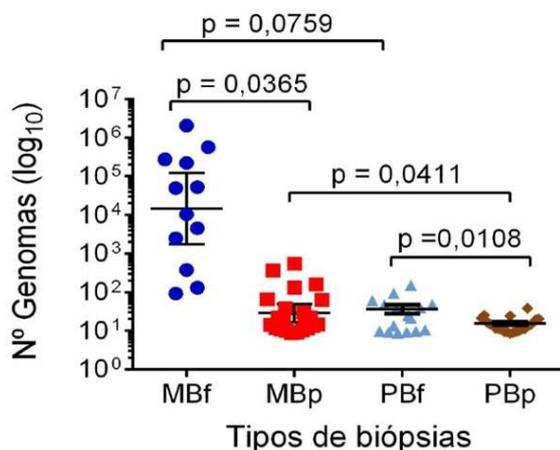


Figura 3 - Relação entre os tipos de biópsias versus o número de genomas (MBf: multibacilar biópsia fresca; MBp: multibacilar biópsia parafinada; PBf: paucibacilar biópsia fresca; PBp: paucibacilar biópsia parafinada; Ct: Cycle threshold; N°: número; p: p-valor).

4. Conclusão

A técnica de qPCR demonstrou resultados promissores para detecção de *Mycobacterium leprae* tanto em biópsias frescas quanto parafinadas. Entretanto, em amostras frescas de pacientes multibacilares, o teste demonstrou melhor rendimento. A quantificação do número de genomas corroborou com a classificação operacional de pacientes com hanseníase, no qual um maior número de genomas em multibacilares, em comparação com os paucibacilares. O teste demonstrou sensibilidade de 68,5% e especificidade de 67,70% em biópsias frescas. Estes dados indicam que a utilização da qPCR pode ser de grande importância, principalmente em casos considerados inconclusivos, de

difícil diagnóstico, nas formas paucibacilares da hanseníase, além de ser reprodutível e não necessitar de microscopistas experientes.

Agradecimentos

Ao laboratório de Biologia Molecular da Fundação Alfredo da Matta, bem como a todos os colaboradores que possibilitaram o desenvolvimento deste projeto de pesquisa.

Divulgação

Este artigo é inédito e não está sendo considerado para qualquer outra publicação. Os autores e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, a revista *Scientia Amazonia* detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação, deste artigo, por meio eletrônico.

Referências

- ALOTAIBI, M. H., BAHAMMAM, S. A., RAHMAN, S. U., BAHNASSY, A. A., HASSAN, I. S., ALOTHMAN, A. F., ALKAYAL, A. M. The demographic and clinical characteristics of leprosy in Saudi Arabia. **Journal of Infection and Public Health**, v. 9, p. 611-617, 2016. doi: 10.1016/j.jiph.2015.12.015
- AZEVEDO, M. C. S., RAMUNO, N. M., FACHIN, L. R. V., TASSA, M., ROSA, P. S., BELONE, A. F. F., DIÓRIO, S. M., SOARES, C. T.; GARLET, G. P., TROMBONE, A. P. F. qPCR detection of *Mycobacterium leprae* in biopsies and slit skin smear of different leprosy clinical forms. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 71-78, 2017. doi: 10.1016/j.bjid.2016.09.017
- BANDEIRA, S. S., PIRES, C. A., QUARESMA, J. A. S. Leprosy Reactions In Childhood: A Prospective Cohort Study In The Brazilian Amazon. **Infection and Drug Resistance**, v. 12, p. 3249-3257, 2019. doi: 10.2147/IDR.S217181
- BARBIERI, R. R., MANTA, F. S. N., MOREIRA, S. J. M., SALES, A. M., NERY, J. A. C., NASCIMENTO, L.



P. R., HACKER, M. A., PACHECO, A. G., MACHADO, A. M., SARNO, E. M., MORAES, M. O. Quantitative polymerase chain reaction in paucibacillary leprosy diagnosis: A follow-up study. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 3, p. 1-12, 2019. doi: 10.1371/journal.pntd.0007147

BARBIERI, R. R., SALES, A. M., ILLARRAMENDI, X., MORAES, M. O., NERY, J. A. C., MOREIRA, S. J. M., SARNO, E. N., MACHADO, A. M., BOZZA, F. A. Diagnostic challenges of single plaque-like lesion paucibacillary leprosy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 7, p. 944-947, 2014. doi: 10.1590/0074-0276140212

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis – DCCI. **Boletim Epidemiológico de Hanseníase**. Brasília: Ministério da Saúde, 2020.

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.

CASTRO, C. M., ERAZO, L., GUNTURIZ, M. L. Strategies for Reducing Leprosy Stigma. **Mycobacterial Diseases**, v. 8, n. 1, p. 1-4, 2018. doi: 10.4172/2161-1068.1000253

CHAITANYA, V. S., CUELLO, L., DAS, M., SUDHARSAN, A., GANESAN, P., KANMANI, K., RAJAN, L., EBENEZER, M. Analysis of a Novel Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay as a Sensitive Tool for the Diagnosis of Indeterminate and Tuberculoid Forms of Leprosy. **The International Journal of Mycobacteriology**, v. 6. p. 1-8, 2017. doi: 10.4103/2212-5531.201885

CRONIN, M., PHO, M., DUTTA, D., STEPHANS, J. C., SHAK, S., KIEFER, M. C., ESTEBAN, J. M., BAKER, J. B. Measurement of gene expression in archival paraffin-embedded tissues: development and performance of a 92-gene reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. **American Journal of Pathology**, v. 164, n. 1, p. 35-42, 2004. doi:10.1016/S0002-9440(10)63093-3

CRUZ, R. C. S., BÜHRER-SÉKULA, S., PENNA, M. L. F., PENNA, G. O., TALHARI, S. Leprosy: current situation, clinical and laboratory aspects, treatment history and perspective of the uniform multidrug therapy for all patients. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 92, n. 6, p. 761-73, 2017. doi: 10.1590/abd1806-4841.20176724

FISCHER, M. Leprosy - an overview of clinical features, diagnosis, and treatment. **Journal of German Society of Dermatology**, v. 15, n. 8, p. 801-827, 2017. doi: 10.1111/ddg.13301

FLETCHER, R. H; FLETCHER, S. W; FLETCHER, G. S. **Epidemiologia Clínica: Elementos Essenciais**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014

GASCHIGNARD, J., GRANT, A. V., THUC, N. V., ORLOVA, M., COBAT, A., HUONG, N. T., BA, N. N., THAI, V. H., ABEL, L., SCHURR, E., ALCAÏS, A. Pauci- and Multibacillary Leprosy: Two Distinct, Genetically Neglected Diseases. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 5, p. 1-20, 2016. doi: 10.1371/journal.pntd.0004345

HAROUN, O. M.O., VOLLERTB, J., LOCKWOOD, D. N., BENNETT, D. L. H., PAI, V. V., SHETTY, V., WAKADE, A. V., KHODKE, A. S., SCHILDER, A., PFAU, D., ENAX-KRUMOVA, E. K., MAIER, C., TREEDE, R. D., RICE, A. S. C. Clinical characteristics of neuropathic pain in leprosy and associated somatosensory profiles: a deep phenotyping study in India. **PAIN Reports**, v. 4, p. 1-11, 2019. doi: 10.1097/PR9.0000000000000743

KRAMME, S., BRETZEL, G., PANNING, M., KAWUMA, J., DROSTEN, C. Detection and quantification of Mycobacterium leprae in tissue samples by real-time PCR. **Medical Microbiology Immunology**, v. 193, n. 4, p. 189-193, 2004. doi: 10.1007/s00430-003-0188-8

LETURIONDO, A. L., NORONHA, A. B., NASCIMENTO, M. O. O., FERREIRA, C. O., RODRIGUES, F. C., MORAES, M. O., TALHARI, C. Performance of serological tests PGL1 and NDO-LID in the diagnosis of leprosy in a reference Center in Brazil. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, n. 22, p. 1-6, 2019. doi: 10.1186/s12879-018-3653-0



MALTEMPE, F. G., BALDIN, V. P., LOPES, M. A., SIQUEIRA, V. L. D., SCODRO, R. B. L., CARDOSO, R. F., CALEFFI-FERRACIOLI, K. R. Critical analysis: use of polymerase chain reaction to diagnose leprosy. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, n. 1, p. 163-169, 2016. doi: 10.1590/S1984-82502016000100018

MANTA, F. S. N., BARBIERI, R. R., MOREIRA, S. J. M., SANTOS, P. T. S., NERY, J. A. C., DUPPRE, N. C., SALES, A. M., PACHECO, A. G., HACKER, M. A., MACHADO, A. M., SARNO, E. N., MORAES, M. O. Quantitative PCR for leprosy diagnosis and monitoring in household contacts: A follow-up study, 2011–2018. **Scientific Reports**, v. 9, n. 16675, p. 1-8, 2019. doi: 10.1038/s41598-019-52640-5

MANTA, F. S. N., LEAL-CALVO, T., MOREIRA, S. J. M., MARQUES, B. L. C., RIBEIRO-ALVES, M., ROSA, P. S., NERY, J. A. C., RAMPAZZO, R. C. P., COSTA, A. D. T., KRIEGER, M. A., MORAES, M. O. Ultra-sensitive detection of *Mycobacterium leprae*: DNA extraction and PCR assays. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 5, p. 1-15, 2020. doi: 10.1371/journal.pntd.0008325

MARCIANO, L. H. S. C., BELONE, A. F. F., ROSA, P. S., COELHO, N. M. B., GHIDELLA, C. C., NARDI, S. M. T., MIRANDA, W. C., BARROZO, L. V., LASTÓRIA, J. C. Epidemiological and geographical characterization of leprosy in a Brazilian hyperendemic municipality. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 34, n. 8, p. 1-16, 2018. doi: 10.1590/0102-311X00197216

MARQUES, L. É. C., FROTA, C. C., QUETZ, J. S., BINDÁ, A. H., MOTA, R. M. S., PONTES, M. A. A., GONÇALVES, H. S., KENDALL, C., KERR, L. R. F. S. Evaluation of 16S rRNA qPCR for detection of *Mycobacterium leprae* DNA in nasal secretion and skin biopsy samples from multibacillary and paucibacillary leprosy cases. **Pathogens and Global Health**, v. 112, n. 2, p. 72-78, 2018. doi: 10.1080/20477724.2017.1415736

MARTINEZ, A. N., RIBEIRO-ALVES, M., SARNO, E. N., MORAES, M. O. Evaluation of qPCR-Based Assays for Leprosy Diagnosis Directly in Clinical Specimens. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 10, p. 1-8, 2011. doi: 10.1371/journal.pntd.0001354

MARTINEZ, A. N., BRITTO, C. F., NERY, J. A., SAMPAIO, E. P., JARDIM, M. R., SARNO, E. N., MORAES, M. O. Evaluation of real-time and conventional PCR targeting complex 85 genes for detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin biopsy samples from patients diagnosed with leprosy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 9, p. 3154-3159, 2006. doi:10.1128/JCM.02250-05

MARTINEZ, G. G., SANTOS, A. L. F., OLIVEIRA, C. Q. P., MORAES, T. I. Estocagem de DNA a temperaturas variadas: análise da concentração. **Revista Saúde em Foco**, v. 10, p. 42-50, 2018.

MEDLEY, G. F., BLOK, D. J., CRUMP, R. E., HOLLINGSWORTH, T. D., GALVANI, A. P., NDEFFO-MBAH, M. L., PORCO, T. C., RICHARDUS, J. H. Policy Lessons From Quantitative Modeling of Leprosy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 66, n. S4, p. S281–S285, 2018. doi: 10.1093/cid/ciy005

PENNA, G. O., BÜHRER-SÉKULA, S., KERR, L. R. S., STEFANI, M. M. A., RODRIGUES, L. C., ARAÚJO, M. G., RAMOS, A. M. C., ANDRADE, A. R. C., COSTA, M. B., ROSA, P. S., GONÇALVES, H. S., CURZ, R., BARRETO, M. L., PONTES, M. A. A. P., PENNA, M. L. F. Uniform multidrug therapy for leprosy patients in Brazil (U-MDT/CT-BR): Results of an open label, randomized and controlled clinical trial, among multibacillary patients. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 7, p. 1-19, 2017. doi: 10.1371/journal.pntd.0005725

PRADHAN, S., NAYAK, B. P., DASH, G. Childhood Leprosy: A Review. **Indian Journal of Paediatric Dermatology**, v. 20, n. 2, p. 112-116, 2019. doi: 10.4103/ijpd.IJPD_47_18

RUDEEANEKSIN, J., SRISUNGNGAM, S., SAWANPANYALERT, P., SITTIWAKIN, T., LIKANONSAKUL, S., PASADORN, S., PALITTAPONGARNPIM, P., BRENNAN, P. J., PHETSUKSIRI, B. 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. 263-270, 2008. doi: 10.1111/j.1574-695X.2008.00472.x

SANTOS, K. C. B., CORRÊA, R. G. C. F., ROLIM, I. L. T. P., PASCOAL, L. M., FERREIRA, A. G. N. Strategies for control and surveillance of leprosy



contacts: integrative review. **Saúde Debate**, v. 43, n. 121, p. 576-591, 2019. doi: 10.1590/0103-1104201912122

SARKAR, R., PRADHAN, S. Leprosy and women. **International Journal of Women's Dermatology**, v. 2, p. 117-121, 2016. doi: 10.1016/j.ijwd.2016.09.001

SIDDIQUI, R., ANSARI, M. H., KHAN, M. H., SIDDIQUI, Z. A. Oral Manifestation of Leprosy: A Narrative Review. **Acta Scientific Dental Sciences**, v. 3, n. 2, p. 131-134, 2019.

SOUZA, C. D. F., MATOS, T. S. Characterization of leprosy in children under 15 years in an important municipality of north-eastern Brazil. **O Mundo da Saúde**, v. 41, n. 2, p. 130-137, 2017. doi: 10.15343/0104-7809.20174102130137

VAN 'T NOORDENDE, A. T., KORFAGE, I. J., LISAM, S., ARIF, M. A., KUMAR, A., VAN BRAKEL, W. H. The role of perceptions and knowledge of leprosy in the elimination of leprosy: A baseline study in Fatehpur district, northern India. **PLOS**

Neglected Tropical Diseases, v. 13, n. 4, p. 1-16, 2019. Doi: 10.1371/journal.pntd.0007302

VIVEIRO, L. A. P., VIEIRA, J. O. M., TRINDADE, M. A. B., TANAKA, C. Balance control is compromised in patients with leprosy. **Leprosy Review**, v. 88, p 237-243, 2017.

XIE, R., CHUNG, J. Y., YLAYA, K., WILLIAMS, R. L., GUERRERO, N., NAKATSUKA, N., BADIE, C., HEWITT, S. M. Factors influencing the degradation of archival formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 59, n. 4, p. 356-365, 2011.

YAN, W., XING, Y., YUAN, L. C., YANG, R. D., TAN, F. Y., ZHANG, Y., LI, HUAN-YING. Application of RLEP Real-Time PCR for Detection of *M. leprae* DNA in Paraffin-Embedded Skin Biopsy Specimens for Diagnosis of Paucibacillary Leprosy. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 3, p. 524-529, 2014. doi: 10.4269/ajtmh.13-0659