

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DE SÃO PAULO
COORDENADORIA DE SERVIÇOS DE SAÚDE
INSTITUTO LAURO DE SOUZA LIMA

FELIPE ALVES DOS SANTOS

CONTRIBUIÇÃO DA INOCULAÇÃO DO *Mycobacterium leprae* EM COXIM
PLANTAR DE CAMUNDONGO PARA O ENTENDIMENTO DA REATIVAÇÃO DA
HANSENÍASE APÓS TRATAMENTO

BAURU
2018

FELIPE ALVES DOS SANTOS

Monografia de Conclusão de Curso apresentada ao Programa de Aprimoramento Profissional em Laboratório de Saúde Pública da Secretaria de Estado da Saúde do Instituto Lauro de Souza Lima, sob orientação da Ms. Daniele Ferreira de Faria Bertoluci e co-orientação de Adriano de Souza Pessoa.

**BAURU
2018**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE BIBLIOTECA DO
INSTITUTO "LAURO DE SOUZA LIMA"

S59c Santos, Felipe Alves dos.

Contribuição da inoculação do *Mycobacterium leprae* em coxim plantar de camundongo para o entendimento da reativação da hanseníase após tratamento / Felipe Alves dos Santos, Bauru, 2018. 34f.

Monografia apresentada ao Programa de Aprimoramento Profissional em Laboratório de Saúde Pública da Secretaria de Estado da Saúde do Instituto Lauro de Souza Lima, sob orientação da Me. Daniele Ferreira de Faria Bertoluci e coorientação de Adriano de Souza Pessoa.

1. Hanseníase. 2. *Mycobacterium leprae*. 3. Inoculação. 4. Athymic nude mice. 5. Viabilidade. I. Bertoluci, Daniele Ferreira de Faria. II. Pessoa, Adriano de Souza. III. Título.

WC335.403

CRB8/8012

FELIPE ALVES DOS SANTOS

**CONTRIBUIÇÃO DA INOCULAÇÃO DO *Mycobacterium leprae* EM COXIM
PLANTAR DE CAMUNDONGO PARA O ENTENDIMENTO DA REATIVAÇÃO DA
HANSENÍASE APÓS TRATAMENTO**

Monografia de Conclusão de Curso apresentada ao Programa de Aprimoramento Profissional em Laboratório de Saúde Pública da Secretaria de Estado da Saúde do Instituto Lauro de Souza Lima, sob orientação da Ms. Daniele Ferreira de Faria Bertoluci e co-orientação de Adriano de Souza Pessoa.

Orientador

Co-orientador

27/02/2018

RESUMO

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae*. Para fins terapêuticos a Organização Mundial da Saúde traz uma classificação mais simples que é baseada no número de lesões cutâneas. Os casos com até cinco lesões são considerados paucibacilares e aqueles com mais de cinco lesões são multibacilares. Apesar da eficácia da poliquimioterapia a hanseníase ainda é considerada um desafio para a saúde pública dos países em desenvolvimento. Em 2016 foram registrados 214.783 novos casos da doença em todo o mundo. Quanto ao diagnóstico da hanseníase, é essencialmente clínico e epidemiológico e é realizado por meio da análise do histórico do paciente, das condições de vida do mesmo e do exame dermatoneurológico. No Instituto Lauro de Souza Lima /Bauru, além do exame dermatoneurológico, são realizados exames laboratoriais complementares para o auxílio diagnóstico, tais como baciloscopia de raspado intradérmico, histopatológico, inoculação experimental de camundongos para diagnóstico fenotípicos de resistência e avaliação de viabilidade bacilar, além de análise molecular de susceptibilidade/resistência do *Mycobacterium leprae* as drogas utilizadas no esquema poliquimioterápico. Deste modo, o presente estudo teve como finalidade correlacionar os resultados da inoculação do *Mycobacterium leprae* provenientes de biópsias de paciente tratados e com suspeita de reativação da doença com seu respectivo perfil clínico. Todos os pacientes fizeram pelo menos 12 doses de poliquimioterapia antes da coleta da biópsia e ainda assim houve multiplicação em 52% das amostras inoculadas. A resistência medicamentosa foi observada em apenas dois casos, sugerindo que outros fatores podem estar envolvidos na reativação da doença.

Palavras-chave: Hanseníase. *Mycobacterium leprae*. Inoculação. Athymic nude mice. Viabilidade.

ABSTRACT

Leprosy is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae*. For therapeutic purposes the World Health Organization brings a simple classification based on the number of cutaneous lesions. Cases with up to five lesions are considered paucibacillary and those with more than five lesions are multibacillary. Despite the efficacy of multidrugtherapy leprosy is still considered a challenge to public health in developing countries. In 2016, 214,783 new cases of the disease were registered worldwide. As for the diagnosis of leprosy, it is essentially clinical and epidemiological and is performed through the analysis of the patient's history, the patient's living conditions and the dermato neurological examination. At Lauro de Souza Lima Institute/ Bauru, in addition to the dermato neurological examination, complementary laboratory tests are performed for diagnostic assistance, such slit skin smear microscopy, histopathology, experimental inoculation of mice for the diagnosis of resistant *M. leprae* phenotypes and evaluation of bacillary viability, besides molecular analysis of susceptibility/resistance of *M. leprae* the drugs used in the multidrugtherapy scheme. Thus, the present study aimed to correlate the results of the inoculation of *M. leprae* from biopsies of treated patients and with suspicion of reactivation of the disease with its respective clinical profile. All patients had at least 12 doses of polychemotherapy prior to biopsy collection, and even so, there was multiplication in 52% of the inoculated samples. Drug resistance was observed in only two cases, suggesting that other factors may be involved in the reactivation of the disease.

Keywords: Leprosy. *Mycobacterium leprae*. Inoculation. Athymic nude mice. Viability.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
2. OBJETIVO	11
3. CASUÍSTICA E MÉTODO.....	11
3.1 Casuística	11
3.2 Procedimento de coleta e análise dos resultados	12
4. RESULTADOS	13
4.1 Perfil dos pacientes	13
4.2 Inoculações realizadas ao término do tratamento	14
4.3 Inoculações realizadas entre um a cinco anos após término do tratamento PQT/MB – reativação da doença	15
4.4 Inoculações realizadas após cinco anos do término do tratamento – recidiva.	17
4.5 Inoculações realizadas na vigência do segundo, terceiro ou quarto ciclo de PQT/MB.....	18
4.6 Análise de susceptibilidade do <i>M. leprae</i> a DDS, RFP e OFLO.	19
5. DISCUSSÃO.....	21
6. CONCLUSÃO	27
BIBLIOGRAFIA	28
ANEXO A.....	33
ANEXO B.....	34

1. INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), parasita intracelular que infecta principalmente células da linhagem monocítica-macrofágica, como os macrófagos e as células de Schwann do sistema nervoso periférico, causando deste modo, uma neuropatia desmielinizante generalizada (1).

O *M. leprae* é uma micobactéria com formato de bacilo, não cultivável *in vitro* e com tamanho variando entre 1 a 8µm. Em sua parede celular há uma grande quantidade de lipídeos, especialmente do tipo ácido micólico, que confere ao bacilo a característica de álcool-ácido resistência, quando submetido à coloração pelo método de Ziehl-Neelsen (3,4).

A transmissão da hanseníase ocorre pela eliminação de bacilos por meio do trato respiratório, por vias superiores, sendo esta também, a mais provável via de entrada do *M. leprae* no corpo. Pacientes multibacilares não tratados (virchowiano e dimorfo), são considerados os principais transmissores por apresentarem alta carga bacilar. Além disso, o contato íntimo e prolongado, como familiares que residem na mesma casa, por exemplo, causam a infecção de indivíduos suscetíveis (7).

É uma doença dependente da resposta imunológica do hospedeiro frente ao patógeno e com um espectro de manifestações clínicas. Segundo a classificação proposta por Ridley e Jopling, as formas clínicas são tuberculóide (TT), virchowiano (VV), dimorfo-tuberculóide, (DT), dimorfo-dimorfo, (DD) e dimorfo virchowiano, (DV) (2, 6).

Para fins terapêuticos a Organização Mundial da Saúde (OMS) traz uma classificação mais simples que é baseada no número de lesões cutâneas. Os casos com até cinco lesões são considerados paucibacilares (PB) e aqueles com mais de cinco lesões são multibacilares (MB). Existe ainda a recomendação de que se use a baciloscopia de raspado intradérmico como exame complementar para a classificação dos casos em PB ou MB, de difícil classificação clínica. A baciloscopia positiva classifica o caso como MB, independentemente do número de lesões; o resultado negativo não exclui o diagnóstico da doença (15).

A implantação da poliquimioterapia (PQT) em 1981 pela OMS foi um dos mais importantes avanços técnicos na história do controle da doença, que juntamente com um esforço global organizado levou a uma importante diminuição da prevalência da hanseníase, de estimados cinco milhões de casos em 1985 para menos de 200 mil casos em 2014. A PQT/OMS é constituída pelo conjunto dos seguintes medicamentos associados: a rifampicina (RFP), dapsona (DDS) e a clofazimina (CLO). Essa associação previne a seleção de cepas do bacilo com resistência medicamentosa, que ocorre com frequência quando se utiliza apenas um medicamento, impossibilitando a cura da doença (16, 22, 18).

Inicialmente os esquemas de tratamento não eram supervisionados e a CLO só era usada nos doentes que apresentavam sulfono-resistência primária. Pacientes virchowianos, dimorfos ou indeterminados eram examinados duas vezes ao ano, recebendo as cartelas para o tratamento autoadministrado; pacientes tuberculóides retornavam à consulta clínica apenas uma vez ao ano (27).

Atualmente o tratamento PQT/OMS para MB é de 12 doses, podendo ser completado em até 18 meses. Para PB é de 06 doses, podendo ser completado até 09 meses. A efetividade do esquema baseia-se nas doses supervisionadas (28). Para crianças o esquema é administrado do mesmo modo, porém as doses são ajustadas de acordo com o peso.

Apesar da eficácia da PQT, a hanseníase ainda é considerada um desafio para a saúde pública dos países em desenvolvimento. Em 2016 foram registrados 214.783 novos casos da doença em todo o mundo, sendo a Índia, Brasil e Indonésia os responsáveis pelo maior número de notificações (5). Campanhas locais de eliminação da hanseníase coordenadas pela OMS estão sendo realizadas com foco em áreas endêmicas, e apesar do progresso observado, ainda é provável que a eliminação não seja alcançada em níveis subnacionais em alguns países.

Outro importante indicador para o controle da hanseníase é o número de recidivas, pois elas estão diretamente ligadas à eficácia ou não do tratamento. Em 2016 foram notificados 2.743 casos de recidivas no mundo, sendo o Brasil responsável por 1.431 deles ou 52,2% do total notificado (5).

Define-se como recidiva todos os casos de hanseníase tratados regularmente com esquemas oficiais padronizados, que receberam alta por cura, isto é, saíram do registro ativo da doença no Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN), e que voltam a apresentar novos sinais e sintomas clínicos de doença infecciosa ativa após período superior a cinco anos de cura (17).

Quanto ao diagnóstico da hanseníase, é essencialmente clínico e epidemiológico e é realizado por meio da análise do histórico do paciente, das condições de vida do mesmo e do exame dermatoneurológico. Quando necessário, utilizam-se métodos complementares como o exame baciloscópico e histopatológico, principalmente em casos duvidosos (21).

No Instituto Lauro de Souza Lima (ILSL)/Bauru, além do exame dermatoneurológico, são realizados exames laboratoriais complementares para o auxílio diagnóstico, tais como baciloscopia de raspado intradérmico, histopatológico, inoculação experimental de camundongos para diagnóstico fenotípicos de resistência e avaliação de viabilidade bacilar, além de análise molecular de suscetibilidade/resistência do *M. leprae* as drogas utilizadas no esquema poliquimioterápico.

A avaliação molecular da suscetibilidade/resistência do *M. leprae* a DDS, RFP e OFLO é feita por meio da extração do DNA genômico das amostras e análise da sequência de regiões específicas do gene *folP1*, *rpoβ* e *gyrA*, responsáveis pela resistência do *M. leprae* a DDS, RFP e OFLO, respectivamente.

O exame baciloscópico é usado para detecção dos bacilos. O material é coletado de pontos índices sendo eles lóbulos auriculares, cotovelos, joelhos e lesões de pele. O resultado é expresso conforme a escala logarítmica de Ridley, variando de 0 a 6+ (8,9).

O histopatológico é realizado em biópsia coletada da borda da lesão, de áreas anestésicas ou nervos. O tipo celular que compõe o granuloma define os dois polos clássicos da hanseníase: células epitelióides para o polo tuberculóide e macrófagos espumosos para o polo virchowiano (10, 11,12, 24).

Existem também outros métodos diagnósticos alternativos que vêm sendo utilizados, como o PGL-1 (glicolípideo-fenólico 1) que é um antígeno

específico do *M. leprae* e leva a formação de anticorpos IgG e IgM, e esses anticorpos são pesquisados no soro do paciente (13,14).

Além dos métodos laboratoriais já citados, em virtude da ausência de crescimento do bacilo em meios axênicos, para o melhor entendimento da doença se faz necessária à utilização de modelos experimentais para seu cultivo *in vivo*.

Ao longo da história, modelos animais têm sido muito importantes no estudo de várias doenças que acometem o ser humano, como a tuberculose, por exemplo. O não cultivo do *M. leprae* em meios de cultura artificiais se constitui até hoje em um grande obstáculo para o estudo da doença (19).

O primeiro trabalho experimental em hanseníase com resultados satisfatórios foi obtido por meio da inoculação do bacilo em pele, nervo, cavidade peritoneal e corrente sanguínea de chimpanzé em 1956. Já em 1960, Shepard inoculou uma suspensão do bacilo em coxim plantar de camundongos imunocompetentes, seguindo o raciocínio de tropismo por áreas frias, sendo este um grande avanço na técnica de avaliação para recidiva e resistência medicamentosa (19).

Há 50 anos, a técnica de Shepard tem sido utilizada em testes para triagem de novas drogas, pesquisa de viabilidade bacilar, testes para agentes imunoproliféricos e estudos para determinação da concentração mínima inibitória (MIC). Um avanço advindo desta técnica foi a implementação da PQT, já que testes em camundongos mostraram uma maior eficiência na associação de drogas do que a monoterapia (20).

Uma importante linhagem de camundongo utilizada na hanseníase experimental é a *athymic nude mice* (nu/nu). Por tratar-se de linhagem imunodeficiente e bastante susceptível à infecção, ela tem sido usada como modelo para detecção de bacilos persistentes e manutenção de cepas de interesse científico, uma vez que é possível inocular suspensões com concentrações variadas de bacilo (19).

Inicialmente essa linhagem foi descrita por Prabhakaran *et al* (1975) que não observaram diferenças significantes entre as linhagens BALB/c e *athymic nude mice* quando os animais permaneceram inoculados por um período de seis meses. Posteriormente em 1976 Colston e Hilston, reproduziram o estudo dos mesmos autores, porém avaliaram os resultados após 10 meses de

inoculação. Desta forma, foi possível recuperar 10^9 de bacilos vivos com disseminação por outros órgãos além do coxim plantar (19, 23).

Desde 1986, o ILSL tem realizado inoculação do bacilo em coxim plantar de camundongos para diagnósticos fenotípicos de susceptibilidade a DDS e RFP. Mais recentemente, a linhagem *athymic nude* também passou a ser utilizada, mas com o objetivo de avaliar a viabilidade bacilar e para manutenção de cepas utilizadas em diferentes protocolos de pesquisa.

O ILSL, além de ser um centro de referência para o estudo da hanseníase, é o único no Brasil a manter um laboratório de hanseníase experimental. Com a disponibilidade da técnica de inoculação, nosso serviço tem se aplicado em fornecer subsídios que possam auxiliar o médico nas tomadas de decisão, especialmente naqueles casos em que o tratamento não é satisfatório.

Neste contexto, esse estudo teve como objetivo principal correlacionar o resultado da inoculação em coxim plantar de camundongos, com ênfase na viabilidade do bacilo, com o perfil clínico dos pacientes e com isso contribuir para o melhor entendimento da doença, especialmente naqueles casos em que há reativação da doença após o tratamento.

2. OBJETIVO

Correlacionar os resultados da inoculação do *M. leprae* provenientes de biópsias de paciente tratados e com suspeita de reativação da doença com seu respectivo perfil clínico.

3. CASUÍSTICA E MÉTODO

O estudo foi realizado no Instituto Lauro de Souza Lima (ILSL), em Bauru – SP, que é Centro de Referência em Hanseníase para a Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo, Ministério da Saúde e da Organização Mundial da Saúde – OMS.

Este projeto foi submetido à análise e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do ILSL, sob o número 341/17 (anexo B).

3.1 Casuística

Foram avaliados 106 prontuários de pacientes atendidos no ambulatório de dermatologia do ILSL no período de março de 2011 a janeiro de 2017, com suspeita clínica de hanseníase em atividade, a qualquer momento após término do tratamento, e que tiveram solicitação de inoculação do *M. leprae* em coxim plantar de camundongos da linhagem *athymic nude* para avaliar viabilidade bacilar. Dos 106 pacientes, 17 tiveram duas ou mais solicitações de inoculação em coxim plantar de camundongos e 89 apenas uma, totalizando 131 biópsias avaliadas (quadro 1).

Quadro 1: Número de inoculações em coxim plantar de camundongos solicitadas por paciente avaliado (106 pacientes/131 biópsias inoculadas)

Pacientes N=106	Nº de biópsias inoculadas/paciente	Total de biópsias inoculações (N=131)
89	1	89
12	2	24
2	3	6
3	4	12

Para análise dos dados e resultados as 131 biópsias inoculadas foram agrupadas considerando o período decorrido entre o tratamento e a data da inoculação conforme descrito na tabela 1.

Tabela 1. Classificação das inoculações considerando o período decorrido entre o tratamento e a data da inoculação. (N = 131).

Classificação	Período entre tratamento e inoculação	Número de Biópsias N=131 (%)
Término de Tratamento	< 1 ano	55 (42)
Reativação da doença	> 1 e < 5 anos	34 (26)
Recidiva	> 5 anos	16 (12)
Em tratamento	vigência do tratamento*	26 (20)

*Inoculação realizada na vigência do segundo, terceiro ou quarto ciclo de PQT.

3.2 Procedimento de coleta e análise dos resultados

Os dados clínicos, resultados de exames laboratoriais como baciloscopia de raspado intradérmico, histopatológico, sorologia anti-PGL1, avaliação molecular suscetibilidade/resistência do *M. leprae* a DDS, RFP e OFLO e os dados relacionados ao tratamento da hanseníase foram obtidos a partir de levantamento realizado em prontuários arquivados no Serviço de Arquivo Médico e Estatística (SAME) do ILSL.

Como instrumento de coleta dos dados, foi utilizado um formulário com dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais (anexo 1). Os dados foram transferidos para planilha Excell para análise quantitativa e qualitativa. Foi considerada multiplicação bacilar o índice de $\geq 5 \times 10^3$ de bacilos recuperados por pata.

4. RESULTADOS

4.1 Perfil clínico-epidemiológico dos pacientes

Dos 106 prontuários avaliados, a maioria dos pacientes era do sexo masculino (71%), natural (71%) ou procedente (93%) do estado de São Paulo, todos MB, sendo a principal forma clínica a MHV. Os pacientes foram submetidos a diferentes tempos de tratamento com PQT/MB, variando de 12 a 46 doses (tabelas 2 e 3).

Tabela 2. Dados epidemiológicos dos pacientes avaliados no período de março de 2011 a janeiro de 2017.

Variáveis	Nº Pacientes	%
Sexo		
M	79	(74,5)
F	32	(30,2)
Idade		
< 15	1	(0,9)
> 15	104	(98,1)
NR	1	(0,9)
Naturalidade		
SP	75	(70,8)
MG	11	(10,4)
PR	6	(5,7)
BA	2	(1,9)
CE	2	(1,9)
PB	2	(1,9)
PE	2	(1,9)
Outros	6	(5,7)
Procedência		
SP	99	(93,4)
MS	2	(1,9)
MT	2	(1,9)
PR	1	(0,9)
GO	1	(0,9)
TO	1	0,9

NR: não relatado; ^a Outras naturalidades: AL, GO, MA, MT, TO, RS

Tabela 3. Dados clínicos dos pacientes avaliados no período de março de 2011 a janeiro de 2017.

Variáveis	Nº Pacientes (%)
<i>Classificação R&J</i>	
MHD	11 (10,4)
MHDV	27 (25,5)
MHV	68 (64,2)
<i>Regime do 1º tratamento</i>	
PQT/PB ^a	5 (4,7)
PQT/MB ^b 12	58 (54,7)
PQT/MB (15 a 18)	6 (5,7)
PQT/MB 24	21 (19,8)
PQT/MB 36	4 (3,8)
PQT/MB 46	1 (0,9)
Monoterapia DDS ^c	5 (4,7)
NR	6 (5,7)

NR: não relatado; ^aMultidroga terapia com número de doses entre 6 e 12; ^bMultidroga terapia multibacilar; ^cMonoterapia com dapsona.

4.2 Inoculações realizadas ao término do tratamento

Das 131 biópsias inoculadas, 55 eram de pacientes classificados como término de tratamento recente, ou seja, o período decorrido entre inoculação e a última dose da PQT foi de até um ano. Houve multiplicação bacilar em 33/55 (60%) das amostras inoculadas. Os dados referentes aos exames laboratoriais e tratamento dos pacientes, cujas biópsias resultaram em multiplicação bacilar, estão expressos na tabela 4.

Tabela 4. Dados laboratoriais e de tratamento dos pacientes, cujas biópsias foram inoculadas no término do tratamento PQT/MB e que resultaram em multiplicação bacilar.

Variável	Nº de biópsias (%) N=33
Baciloscopia de raspado intradérmico	
IB (média)	3,5
Com BT	13 (39,4)
Sem BT	12 (36,4)
NR ¹	8 (24,2%)
Baciloscopia do histopatológico	
IB (média)	5,3
Íntegros/bem corados	16 (48,5)
Descorados/ fragmentados	16 (48,5)
NR ¹	1 (3,0)
PGL-1	
Reagente	12 (36,4)
Não reagente	10 (30,3)
NR ¹	11 (33,3)
Ciclos completos de PQT ²	
1	19 (57,6)
2	09 (27,2)
3	03 (9,1)
4	02 (6,1)
Conduta pós laudo	
Acompanhamento	18 (54,5)
Tratamento reintroduzido	3 (9,1)
Alta	11(33,3)
Paciente não retornou	1 (3,0)
Perfil de suscetibilidade/resistência	
Sensível	33 (100)
Resistente	0 (0)

¹NR: não realizado; ²Ciclos completos de PQT/MB/12 no momento da coleta da biópsia. BT=bacilo típico.

4.3 Inoculações realizadas entre um a cinco anos após término do tratamento PQT/MB – reativação da doença

Das 131 biópsias inoculadas, 34 eram de pacientes que foram classificados como reativação da doença, ou seja, o período decorrido entre inoculação e a última dose da PQT foi entre um a cinco anos. Houve multiplicação bacilar em 11/34 (32%) das amostras inoculadas. Os dados

referentes aos exames laboratoriais e tratamento dos pacientes, cujas biópsias resultaram em multiplicação bacilar, estão expressos na tabela 5.

Tabela 5. Dados laboratoriais e de tratamento dos pacientes, cujas biópsias foram inoculadas entre um a cinco anos após PQT/MB e que resultaram em multiplicação bacilar.

Variável	Nº de amostras (%) N=11
Baciloscopia do raspado	
IB (média)	3,1
Com BT	2 (18,2)
Sem BT	6 (54,5)
NR ¹	3 (27,3)
Baciloscopia do Histopatológico	
IB (média)	4,25
Íntegros/bem corados	5 (45,5)
Descorados/ fragmentados	5 (45,5)
NR ¹	1 (9,1)
PGL-1	
Reagente	3 (27,3)
Não reagente	2 (18,2)
NR ¹	6 (54,5)
Ciclos completos de PQT ²	
1	8 (72,7)
2	2 (18,2)
3	1 (9,1)
Conduta pós laudo	
Acompanhamento	1 (9,1)
Tratamento reintroduzido	9 (81,8)
Alta	1 (9,1)
Perfil de suscetibilidade/resistência	
Sensível	10 (90,9)
Resistente	0 (0)
NR	1 (9,1)

¹ NR: não relatado; ²Ciclos completos de PQT 12 doses no momento da coleta da biópsia.

4.4 Inoculações realizadas após cinco anos do término do tratamento – recidiva.

Das 131 biópsias inoculadas, 16 eram de pacientes que foram classificados como recidiva, ou seja, o período decorrido entre inoculação e a última dose da PQT/MB foi superior a cinco anos. Houve multiplicação bacilar em 9/16 (56%) das amostras inoculadas. Os dados referentes aos exames laboratoriais e tratamento dos pacientes, cujas biópsias resultaram em multiplicação bacilar, estão expressos na tabela 6.

Tabela 6. Dados laboratoriais e de tratamento dos pacientes, cujas biópsias foram inoculadas cinco anos após término da PQT/MB, e que resultaram em multiplicação bacilar.

Variável	Nº de amostras (%) N=09
Baciloscopia do raspado	
IB (média)	3,1
Com BT	5 (55,6)
Sem BT	3 (33,3)
NR ¹	1 (11,1)
Baciloscopia do Histopatológico	
IB (média)	5
Íntegros/bem corados	7 (77,8)
Descorados/ fragmentados	1 (11,1)
NR ¹	1 (11,1)
PGL-1	
Reagente	5 (55,6)
Não reagente	2 (22,2)
NR ¹	2 (22,2)
Tratamentos realizados antes da inoculação	
Monoterapia	2 (22,2)
PQT/PB/6	1 (11,1)
PQT 12 (1 ciclo)	1 (11,1)
Monoterapia + PQT 12 (2 ciclos)	1 (11,1)
Monoterapia + PQT 12 (4 ciclos)	2 (22,2)
PQT 12 (4 ciclos)	1 (11,1)
NR ¹	1 (11,1)
Conduta pós laudo	
Tratamento reintroduzido	5 (55,6)
Tratamento Alternativo	4 (44,4)
Perfil de sensibilidade	
Sensível	7 (77,8)
Resistente	2 (22,2)

¹ NR: não relatado

4.5 Inoculações realizadas na vigência do segundo, terceiro ou quarto ciclo de PQT/MB.

Das 131 biópsias inoculadas, 26 eram de pacientes classificados como em tratamento, ou seja, a inoculação foi realizada na vigência do segundo, terceiro ou quarto ciclo de PQT/MB. Nestes casos, houve multiplicação bacilar em 15/26 (58%) das amostras. A análise dos exames laboratoriais e informações sobre tratamento dos pacientes com multiplicação bacilar estão expressas na tabela 7.

Tabela 7. Dados laboratoriais e de tratamento dos pacientes, cujas biópsias foram inoculadas na vigência do tratamento PQT/MB e que tiveram multiplicação bacilar.

Variável	Nº de amostras (%) N=15
Baciloscopia do raspado	
IB (média)	3,3
Com BT	5 (33,3)
Sem BT	7 (46,7)
NR ¹	3 (20)
Baciloscopia do Histopatológico	
IB (média)	4,9
Íntegros/bem corados	5 (33,3)
Descorados/ fragmentados	8 (53,3)
NR ¹	2 (13,3)
PGL-1	
Reagente	8(53,3)
Não reagente	4 (26,7)
NR ¹	3 (20)
Ciclos completos de PQT²	
1	8 (53,3)
2	4 (26,7)
3	3 (20)
Conduta pós laudo	
Mantida PQT/MB 12 ³	15 (100,0)
Perfil de suscetibilidade/resistência	
Sensível	15 (100,0)
Resistente	0 (0)

¹ NR: não relatado; ²Ciclos completos de PQT/MB 12 no momento da coleta da biópsia; ³tratamento foi mantido para 100% dos pacientes por pelo menos mais um ciclo de PQT/MB 12.

4.6 Análise de susceptibilidade do *M. leprae* a DDS, RFP e OFLO.

Biópsias de todos os 106 pacientes incluídos no estudo foram submetidas à análise molecular para verificar o perfil de susceptibilidade do bacilo as drogas DDS, RFP e OFLO. Bacilos resistentes a DDS, RFP e/ou OFLO foram detectados em amostras de seis pacientes (5,6%). O perfil de cada um desses pacientes está descrito no quadro 2.

Foi realizada avaliação molecular do perfil de resistência a DDS, RFP e OFLO de todas as biópsias. Foi detectada resistência do *M. leprae* a DDS, RFP e/ou OFLO em amostras de seis pacientes (5,6%). Os dados referentes a inoculação, tratamento e perfil de sensibilidade estão expressos no quadro 2.

Quadro 2: Perfil dos pacientes que apresentaram *M. leprae* resistentes a DDS, RFP e/ou OFLO.

Paciente	Tratamento	Classificação	Resistente	Resultado da inoculação	Conduta pós Laudo
1	1º tto: PQTMB 12 doses (2x)	Em tto	Folp + rpoB	Sem multiplicação	Manteve PQT
2	1º tto monoterapia + 2º tto: PQTMB 24 + 3º tto: COM (CLO+OFX+MIN)	Recidiva	Folp + rpoB + GyR	Multiplicação	TTO alternativo
3	1ºtto: PQT-PB + 2ºtto PQT-MB 12	Recidiva	Folp	Sem multiplicação	Alta ambulatorial
4	1º tto: 78 a 90 + 2º tto:PQT/MB/24 +3º tto:PQT/MB/24 + 4 º MB/12 + Esquema alternativo	Recidiva	Folp + rpoB	Multiplicação	TTO alternativo
5	1º tto: PQTMB 12 doses	Término tto	Folp + rpoB	Sem multiplicação	Alta ambulatorial
6	1º tto: PQTMB 12 doses + 2º tto: 12 doses + 3º tto: PQT- MB jan 2017 até atual (esquema alt: CLO + OFX + CLA)	Termino tto	Folp + rpoB	Sem multiplicação	TTO alternativo

5. DISCUSSÃO

Desde a implantação da PQT, o número de casos novos de hanseníase diminuiu significativamente no mundo. A eliminação da doença como problema de saúde pública foi alcançada em 2000 em escala mundial e até 2005 na maioria dos países. O Brasil, no entanto, ainda não conseguiu eliminar a doença, uma vez que mantém a taxa de prevalência em 1,10/10.000 habitantes (27) demonstrando claramente que estratégias efetivas de controle necessitam ser implementadas no país. Neste cenário, para a cura da doença é importante assegurar que o paciente siga corretamente o tratamento.

O critério de alta por cura em hanseníase segue os critérios estabelecidos de regularidade ao tratamento: número de doses e tempo de tratamento: 06 cartelas em até 09 meses para PB e 12 cartelas em até 18 meses para MB, acompanhado de avaliação neurológica, avaliação do grau de incapacidade física e orientação para os cuidados pós-alta. No entanto, existem falhas na assistência aos pacientes de hanseníase no momento da alta que podem levar os pacientes à necessidade de retratamento. Além disto, outras situações são observadas: pacientes que não completaram o tratamento preconizado (tratamento insuficiente) devem reiniciá-lo. Pacientes MB que, excepcionalmente não apresentarem melhora clínica com presença de lesões ativas da doença ao final do tratamento, devem ser encaminhados para avaliação em serviço de referência. A maioria dos pacientes de hanseníase continua melhorando após a conclusão do tratamento com 12 doses, no entanto, é possível que alguns deles não demonstrem qualquer melhora e por isso deverão ser avaliados em serviço de referência (municipal, regional, estadual ou nacional) quanto à necessidade de 12 doses adicionais de PQT/MB. É importante salientar que os pacientes tomam mensalmente dose supervisionada de RFP, com o objetivo de garantir que esse medicamento tenha sido ingerido por ele, uma vez que é o único com ação bactericida do esquema terapêutico (28).

Considerando as normativas dos programas de controle, podemos observar que na grande maioria dos casos, a cura, e conseqüentemente a alta, não estão vinculadas a realização de exames laboratoriais, prevalecendo apenas o critério clínico. Em parte, isso se deve ao fato de que os exames

disponíveis, como raspado intradérmico (baciloscopia), histopatologia ou sorologia anti PGL-1, são úteis quando há concordância com os achados clínicos e epidemiológicos do paciente. Em decorrência disso, geralmente são solicitados no momento do diagnóstico ou em casos suspeitos de recidiva. É sabido, por exemplo, que a baciloscopia é um exame que possui baixa sensibilidade, uma vez que o resultado negativo não exclui a doença (29). A sorologia também é um exame limitado, pois o resultado está ligado a forma clínica do paciente. A detecção de anticorpos anti PGL1 é muito útil para diagnosticar casos MB, no entanto são pouco ou indetectáveis em pacientes PB (30).

A inexistência de um exame laboratorial que possa garantir o status de viabilidade do bacilo, aliado ao fato do mesmo não ser cultivável “*in vitro*”, contribuem para que o desfecho clínico seja importante no momento em que o tratamento chega ao fim.

Considerando o exposto, e que o ILSL é a única instituição no Brasil a realizar a inoculação do bacilo em coxim plantar de camundongos imunocompetentes e imunodeficientes, este estudo teve como objetivo principal, correlacionar os resultados da inoculação do *M. leprae* em coxim plantar de camundongos *athymic nude mice* com o perfil clínico do paciente. Esta linhagem já tem sido utilizada como modelo para detecção de bacilos viáveis e manutenção de cepas de interesse científico em nossa rotina desde 2011.

Para melhor agrupamento dos dados, a casuística foi classificada de acordo com o tempo decorrido entre o término do tratamento e a data em que foi realizada a inoculação; esse período variou de menos de um até mais de cinco anos. Das 131 amostras inoculadas, em 55 (42%) os pacientes haviam terminado o tratamento há menos de um ano; 34 (26%) entre mais de um e menos de cinco anos; 16 (12%) mais de cinco anos e 26 (20%) estavam na vigência do segundo, terceiro ou quarto ciclo da PQT. Todos os pacientes já tinham completado pelo menos um ciclo de PQT/MB. Eles foram encaminhados por outras unidades de saúde por apresentarem suspeita clínica de hanseníase em atividade, após terem completado o tratamento. Além do exame clínico, na maioria dos casos, o médico também solicitou baciloscopia de raspado intradérmico, histopatologia e sorologia anti PGL1.

Também foi coletada uma ou mais biópsias para inoculação do bacilo em coxim plantar de camundongos com objetivo de avaliar viabilidade bacilar.

Dos 106 pacientes avaliados 32 (30,2%) eram do sexo feminino. Segundo a OMS, aproximadamente 36% dos casos globais são diagnosticados em mulheres, demonstrando que a nossa casuística segue esta tendência (31). No Brasil, de acordo com dados epidemiológicos, de 2012 a 2016, foram diagnosticados 151.764 casos novos de hanseníase. Entre estes, 84.447 ocorreram no sexo masculino, o que corresponde a 55,6% do total. Neste período, observou-se que a taxa de detecção por 100 mil habitantes na população masculina foi maior que na população feminina em todas as faixas etárias, sobretudo a partir dos 15 anos de idade. O sexo masculino também representa a maior parte dos casos MB e com grau 2 de incapacidade física, sinalizadores do diagnóstico tardio. Além das questões operacionais que promovem o diagnóstico mais tardio nos homens, é possível que fatores biológicos estejam envolvidos na associação entre a hanseníase MB e o sexo masculino. Esses fatos reforçam que o maior acometimento entre os homens pode estar relacionado ao menor cuidado dispensado à saúde por parte da população masculina (32).

Em relação à idade, apenas um era menor de 15 anos (0,9%) - quatro anos o qual estava em tratamento. A taxa de detecção em menores de 15 anos tem diminuído nos últimos anos, sendo de 3,63 em 2016 (33). O diagnóstico precoce e a eliminação da incapacidade em menores de 15 anos têm sido umas metas adotadas pelos programas nacionais e internacionais de controle da hanseníase. A doença pode acometer todas as faixas etárias, mas quando se manifesta na infância, especialmente na faixa etária de zero a cinco anos, indica alta endemicidade, transmissão recente do bacilo, carência de informações sobre a doença nessa faixa etária e falta de ações efetivas de educação em saúde. A meta de eliminar a incapacidade em novos casos entre as crianças foi introduzida porque combina uma meta relacionada com as crianças com a meta de detecção precoce e redução da incapacidade. A meta enfatiza a não aceitação da incapacidade decorrente de hanseníase em crianças estimulando o apoio da comunidade ao programa (31). Esse resultado, alerta para a importância de seguimento de pacientes pós-alta.

Quanto à procedência, 99 (93,4%) eram do Estado de São Paulo. Quando o paciente tem alguma queixa após o término do tratamento, ele busca atendimento em sua unidade de origem. Porém, quando o médico suspeita de doença ativa, acaba por encaminhá-lo para avaliação em serviço de referência, seguindo à recomendação do programa nacional (34). Como o ILSL é um centro de referência, ele recebe muito destes casos para atendimento e elucidação diagnóstica.

Em relação ao exame baciloscópico, a presença de bacilo típico (BT) tanto no raspado quanto no histopatológico só apresentou uma concordância maior com a multiplicação bacilar nos pacientes classificados como “recidiva”. Isso demonstra que o aumento do índice bacilar ocorre conforme a doença se instala novamente. Nesta casuística, o IB médio da baciloscopia de raspado dérmico foi de 3,5+ e a presença de BT foi observada em 39,4% das lâminas de pacientes que tiveram inoculação positiva, mostrando que a análise morfológica do bacilo por meio da coloração é pouco sensível para detecção da viabilidade, ou seja, a ausência de BT não descarta viabilidade bacilar. Quanto ao exame histopatológico, a média do IB foi maior, 5,3%, com percentuais idênticos de inoculação positiva quanto a presença de BT/bem corados (48,5%) e descorados/fragmentados (48,5%). O PGL1 também se mostrou pouco sensível com apenas 36,4% das amostras reagentes. Em estudo de revisão sistemática, Moura et al (2008), mostraram a eficácia da sorologia anti PGL1 na classificação clínica, monitoramento da terapia e nas reações hanseniáticas como teste preditivo; para diagnóstico precoce e seguimento de populações de alto risco as metodologias utilizadas ainda não demonstram custo benefício favorável (30).

Das 131 biópsias inoculadas, houve multiplicação bacilar em 68 (52%), independente do tempo decorrido entre o término do tratamento e a inoculação. O maior percentual de multiplicação ocorreu nas biópsias classificadas como “término de tratamento” (60%), o segundo na “vigência do 2º, 3º ou 4º tratamento” (58%), terceiro “recidiva” (56%) e o menor nas classificadas como reativação (32%). Apesar da amostragem deste relato ser proveniente de uma amostra por conveniência, e não randomizada (pela disponibilidade do serviço oferecido pelo ILSL), a positividade das inoculações foi expressiva. Isto sugere que em pacientes com alta carga bacilar, dever-se-ia fazer

acompanhamento pós alta, pois a chance de reativação da doença, seja por tratamento insuficiente, seja por falha terapêutica sem causa conhecida, é muito grande.

Em 2004, Ebenezer et al, realizaram um estudo para avaliar se os bacilos presentes em biópsias de pacientes virchovianos ainda estariam viáveis após término da PQT/MB/12 e 24 doses. Biópsias de pele coletadas dos pacientes foram maceradas e inoculadas em coxim plantar de camundongos imunodeficientes. Os autores obtiveram uma porcentagem de 3,3% de multiplicação bacilar entre as biópsias após PQT/MB/12 e de zero após 24 doses, independente do IB do paciente. Neste estudo, os autores consideraram multiplicação significativa uma recuperação $\geq 5 \times 10^4$ bacilos/pata; abaixo desse valor foi considerado crescimento equívoco. Em nosso estudo nós consideramos como multiplicação bacilar o valor recuperado de $\geq 5 \times 10^3$ /pata. Este critério foi adotado considerando estudo realizado por Rosa et al (2015) no qual foi demonstrado existir um limite para detecção de bacilos em torno de 10^3 bacilos/ml. Os autores concluíram que a detecção de bacilos na linhagem *athymic nude*, mesmo em quantidade inferior à inoculada, demonstra a existência de bacilos viáveis na amostra do paciente.

No ILSL, quando há suspeita clínica de doença ativa em pacientes já tratados, a conduta tem sido solicitar, além dos exames clássicos, inoculação em pata de camundongo para avaliar a viabilidade do bacilo. Na ausência de meio de cultura ou qualquer outra técnica capaz de demonstrar a viabilidade do bacilo, o método “in vivo” acaba sendo a única opção viável a qual permite a multiplicação do bacilo mesmo que a quantidade presente na biópsia do paciente seja pequena (35). Esta metodologia tem limitações e é inacessível à grande maioria dos serviços, mas ainda assim contribui para o melhor entendimento da doença em casos de suspeita de reativação da doença.

Apesar do sucesso da PQT, novos casos de hanseníase continuam a ser diagnosticados. Em 2016 foram notificados 214.783 novos casos no mundo, com discreto aumento em relação a 2015 (211.973 casos). O Brasil e Índia foram responsáveis por 75% dessas notificações. Campanhas locais de eliminação da hanseníase coordenadas pela OMS estão sendo realizadas com foco em áreas endêmicas, e apesar do progresso observado, ainda é provável

que a eliminação não seja alcançada em níveis subnacionais em alguns países (36). Outro indicador importante para o controle da hanseníase é o número de recidivas, que mede o sucesso do tratamento e geralmente é resultante da falha na resposta ao tratamento. Em 2016 foram registrados 2.743 casos no mundo, sendo o Brasil responsável por 1.431 (52%) deles (36).

Em nosso trabalho, a maioria dos pacientes que apresentaram multiplicação bacilar no camundongo foi tratada com PQT/MB/12. Devido à alta carga bacilar, é possível o tratamento tenha sido insuficiente e poderia se enquadrar nas situações que o ministério da saúde recomenda reavaliação e complemento de mais 12 doses (28).

Em apenas dois dos casos de multiplicação bacilar após tratamento foram isolados bacilos com resistência medicamentosa a DDS e/ou RFP, OFLO sugerindo que a resistência não é um evento que possa comprometer a eficácia da PQT. Dados semelhantes foram publicados em 2017 pela OMS que mostrou que somente 4% das recidivas podem ser explicadas por mutações já conhecidas que conferem resistência bacilar às drogas utilizadas na PQT, o que aponta para necessidade de investigação de outras possíveis causas para as recidivas (36).

Para um melhor entendimento de questões relativas à adesão terapêutica, além de recidivas, em 2016 a OMS começou a coletar informações de pacientes que foram readmitidos após a descontinuação da PQT sob a categoria de "casos de retratamento". Globalmente, 11.881 casos de retratamento foram relatados em 2016; o número mais alto foi da Índia (6.701), seguido por Brasil (3.446). Uma das razões para isso pode estar relacionada a como o organismo do paciente metaboliza o medicamento. Fatores genéticos, fisiológicos, diferenças sexuais, doenças hepáticas, estado nutricional e farmacodinâmico variam entre os indivíduos, podendo influenciar na forma como a droga é absorvida. Para responder a essas questões são necessários estudos envolvendo farmacogenômica, na tentativa de correlacionar a expressão do gene ou polimorfismos com a eficácia e/ou toxicidade de uma substância.

Considerando o exposto, atingir a eliminação da hanseníase ainda é um desafio a ser superado. O conhecimento limitado sobre áreas estratégicas que contribuam para interromper a transmissão e a falta de ferramentas

satisfatórias para o tratamento imediato e adequado prejudicam o controle da hanseníase. O achado de multiplicação de bacilos na maioria das amostras inoculadas aponta para necessidade de mais esforços coordenados de pesquisa na tentativa de elucidar as causas associadas à reativação da doença.

6. CONCLUSÃO

- ✓ A regularidade no tratamento não impede a reativação da doença, uma vez que todos os pacientes fizeram pelo menos 12 doses de PQT/MB antes da coleta da biópsia e ainda assim houve multiplicação em 52% das amostras inoculadas.
- ✓ A linhagem de camundongo *athymic nude* pode contribuir no diagnóstico precoce da reativação da doença.
- ✓ A resistência medicamentosa provavelmente não explique a reativação da doença uma vez que foi observada em apenas dois casos.

BIBLIOGRAFIA

1. Madigna, C et al. A Macrophage Response To Mycobacterium leprae Phenolic Glycolipid Initiates Nerve Damage In Leprosy. BioRxiv 127944; doi: <https://doi.org/10.1101/127944>, 2017.
2. D.S. Ridley, W.H. Jopling, Classification of leprosy according to immunity. A five-group system, *Int. J. Leprosy* 34 (3) (1966) 255 e 273.
3. Eisenstadt et al. Microbiology and classification of mycobacteria. *Clin. Dermatol.*, v.13, n.3, p.97-206, 1995.
4. Santana, J. Mapeamento de epítomos imunodominantes de antígenos de mycobacterium leprae: caracterizações in vitro, in vivo e in silico. Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia à Universidade Federal do Paraná, 2017.
5. world health organization. *Weekly Epidemiological record*. N.35, 2016.
6. Mira, M. T. Genetic host resistance and susceptibility to leprosy. *Microbes and Infection* 8 (2006) 1124 e 1131.
7. Amori, A; Pereira, I; Silva, E. Análise da qualidade de vida de pacientes acometidos por hanseníase. *Journal of Infection Control*. V. 5, N. 4, 2016.
8. Sartori, B. Determinação Molecular da Viabilidade do Mycobacterium leprae: uma comparação com outras abordagens metodológicas. Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, 2015.
9. Eichelman K, Gonzáles Gonzáles SE, Salas-Alanis JC, Ocampo-Candiani J. Lepra: puesta al día. Definición, patogénesis, clasificación, diagnóstico y tratamiento. *Actas Dermo-Sifilográficas*. 2013; 104(7): 554-563.
10. Moschella SL. An update on the diagnosis and treatment of leprosy. *J Am Dermatol*. 2004; 51: 417-426.

11. Kurabachew, M., A. Wondimu, and J. J. Ryon. Reverse transcription-PCR detection of *Mycobacterium leprae* in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36:1352–1356.
12. Ramaprasad P, Fernando A, Madhale S, Rao JR, Edward VK, Samson PD, et al. Transmission and protection in leprosy: indications of the role of mucosal immunity. *Lepr Rev.* 1997; 68: 301-315.
13. Souza, C. Hanseníase: Formas clínicas e Diagnóstico Diferencial. *Rev. Medicina, Ribeirão Preto.* V. 30. 1997. 325-334.
14. Araújo, M. Hanseníase no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* Vol. 36. N. 3. 2003. 373-382.
15. Ministério da Saúde. Guia de procedimentos técnicos: Baciloscopia em Hanseníase. Brasília, 2010.
16. Opromolla, D et al. Noções básicas de Hansenologia. Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato. 2000. 95-99
17. Ministério da Saúde. Manual Técnico Operacional Hans16: Diretrizes para vigilância, atenção e eliminação da hanseníase como problema de saúde pública Brasília: Ministério da Saúde: Secretaria de Vigilância em Saúde, 2016.
18. World Health Organization. Weekly epidemiological record: Global leprosy: update on the 2014 situation Global leprosy situation, 2015.
19. Opromolla, D et al. Noções básicas de Hansenologia. Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato. 2000 19-23.
20. Katoch, V.M. The contemporary relevance of the mouse foot pad model for cultivating *M. leprae*. *Lepr Ver* (2009) 80, 120-123.

21. OBADIA, D et al. Hanseníase: correlação clínico-histopatológica. Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto, Local de publicação (editar no plugin de tradução o arquivo da citação ABNT), 10, Abr. 2014. Disponível em: http://www.epublicacoes_teste.uerj.br/index.php/revistahupe/article/view/8815/6680. Acesso em: 09 Ago. 2017.
27. World Health Organization. Chemotherapy of leprosy. 1994.
23. Lancaster, D et al. Mycobacterium leprae Infection in Nude Mice: Bacteriological and Histological Responses to Primary Infection and Large Inocula. Infection and immunity, Vol. 39, No. 2, p. 865-872, 1983.
24. Obadia, D et al. Hanseníase: correlação clínico-histopatológica. Ver. Hospital Universitário Pedro Ernesto. Vol. 10 , N. 1, 2011.
25. Silva, F. L. Recidiva da Hanseníase no estado da Bahia. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Saúde Coletiva da Universidade Federal da Bahia. Salvador, 2014.
26. Ebenezer GJ, Daniel S, Norman G, Daniel E, Job CK. Are viable Mycobacterium leprae present in lepromatous patients after completion of 12 months' and 24 months' multi-drug therapy? Indian J Lepr. 2004 Jul-Sep;76(3):199-206.
27. Sinan. Ministério da saúde. Taxa de prevalência de hanseníase por 10.000 habitantes Estados e regiões, Brasil, 1990 a 2016. Disponível em <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/julho/10/Taxa-de-prevalencia-de-hansen-ase-1990a2016-.pdf>> acesso em 07 de maio de 2018.
28. Brasil, Ministério da saúde. Diretrizes para vigilância, atenção e eliminação da hanseníase como problema de saúde pública, manual técnico operacional. , Brasília 2016.

29. Brasil, Ministério da saúde. Guia de procedimentos técnicos. Baciloscopia em hanseníase. Brasília, 2010.
30. Moura et al., Sorologia da hanseníase utilizando PGL-I: revisão sistemática. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 41(Suplemento II):11-18, 2008.
31. Who. Estratégia Global para Hanseníase 2016–2020. Aceleração rumo a um mundo sem hanseníase. Disponível em <<http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/208824/9789290225201-pt.pdf;jsessionid=4946FA59360C293771AD01402E25A876?sequence=17>> acesso em 07 de maio de 2018.
32. Boletim epidemiológico. Hanseníase, secretaria de vigilância em saúde – ministério da saúde, vol 49,; nº 4 , 2018.
33. Sinan. Ministério da saúde. Taxa de Detecção de hanseníase em menores de 15 anos. Estados e regiões, Brasil, 1994 a 2016. Disponível em <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/julho/10/Taxa-de-detec---o-dos-casos-novos-de-hansen--ase-em-menores-de-15-anos-199-.pdf>> Acesso em 07 de maio de 2018.
34. Brasil, Ministério da saúde. Orientações, vigilância epidemiológica. Disponível em < <http://portalmms.saude.gov.br/saude-de-a-z/hanseniaze/orientacoes-para-profissionais-de-saude>> acesso em 07 de maio de 2018.
35. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The Continuing Challenges of Leprosy. Clinical Microbiology Reviews. 2006;19(2):338-381. doi:10.1128/CMR.19.2.338-381.2006.

36. World Health Organization. Weekly epidemiological record nº 35, september, 2017,92, 501-520.



ANEXO A

ILSL
Instituto Lauro de Souza Lima

Ficha de coleta de dados em prontuários

Nome: _____

Prontuário: _____ Sexo: (M) (F)

Procedência: _____ Data de diagnóstico: _____

Forma clínica: _____

Paucibacilar () Multibacilar ()

Caso novo () Recidiva () Baciloscopia de raspado no diagnóstico _____

Baciloscopia de raspado pós laudo: _____

Baciloscopia do histopatológico no diagnóstico: _____

Baciloscopia do histopatológico pós laudo: _____

PGL-1 no diagnóstico: _____ PGL-1 pós laudo _____

Tratamento:

Reação: () Sim () Não Se sim, tipo: _____ Se reação, qual tratamento: _____

Protocolo: () Viabilidade () Resistência

Data de inoculação: _____ Período de inoculação: _____ Meses

Resultado da inoculação:

Conduta pós laudo: () reintroduziu o tratamento () suspendeu o tratamento ()

Outros:

Observações:

ANEXO B**INSTITUTO LAURO DE SOUZA LIMA**

Rodovia Comandante João Ribeiro de Barros, km 225/226 – Bauru – SP.
CEP: 17034-971 - Caixa Postal 3021
Fone (14) 3103-5900 – Fax (14) 3103-5914

COMISSÃO CIENTÍFICA

e-mail: ils@ils.br

Bauru, 09 de outubro de 2017

Ilmo. Sra.
Daniele Bertoluci

Assunto: projeto nº. 341/17

Prezado Pesquisador:
Informamos a Vossa Senhoria que o projeto nº. 341/17, intitulado “ Comparação dos resultados da inoculação do Mycobacterium leprae provenientes de biópsias de pacientes tratados e com suspeita de doença ativa com o perfil clínico e epidemiológico” recebeu parecer favorável da Comissão Científica do Instituto Lauro de Souza Lima.

Atenciosamente,


PQC. FABIANA COVOLO DE SOUZA SANTANA
Membro responsável pela Comissão Científica