



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO
DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Amanda Juliane Finardi

**Caracterização genética e distribuição espacial dos isolados
de *Mycobacterium leprae* em região de baixa prevalência no Brasil.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestra em Doenças Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra. Ida Maria Foschiani Dias Baptista

**Botucatu
2016**

Amanda Juliane Finardi

Caracterização genética e distribuição espacial dos isolados de *Mycobacterium leprae* em região de baixa prevalência no Brasil.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestra em Doenças Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra. Ida Maria Foschiani Dias Baptista

Botucatu
2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Finardi, Amanda Juliane.

Caracterização genética e distribuição espacial dos isolados de *Mycobacterium leprae* em região de baixa prevalência no Brasil / Amanda Juliane Finardi. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Ida Maria Foschiani Dias Baptista

Capes: 2.02.02.

1. Hanseníase - Transmissão. 2. Distribuição espacial da população. 3. *Mycobacterium leprae*. 4. Medicina tropical. 5. Estudos transversais.

Palavras-chave: Hanseníase; *Mycobacterium leprae*; SNP; Transmissão; VNTR.

“Se houver qualquer risco para a trajetória humana, ele não reside tanto na sobrevivência de nossa própria espécie, mas na concretização da suprema ironia da evolução orgânica: no instante em que alcançou o conhecimento de si própria por meio da mente humana, a vida condenou suas mais maravilhosas criações.”

E.O. Wilson

Dedicatória

Dedico esse trabalho a minha mãe Sônia e meu avô Claudio que em toda minha vida me ensinaram e mostraram os verdadeiros valores da vida: o amor. Sou grata pelo privilégio de conviver com pessoas que lutam e tornam meus dias infinitos de alegria, mesmo nos momentos de turbulência.

Agradeço a minha orientadora Ida Maria, por ter aberto as portas do seu laboratório para minha formação profissional. As inúmeras oportunidades de ensinamentos, discussões, incentivos e correções foram essências para a conclusão deste trabalho. A amizade cultivada ao longo desses 5 anos, tornaram os dias mais leves, mostrando que a amizade enriquece nossos dias.

Agradecimentos

Ao meu querido Fábio, por sempre estar presente, pelo amor, carinho e atenção nos meus dias.

A todos os pacientes envolvidos neste estudo.

Ao Instituto Lauro de Souza Lima que me proporcionou toda estrutura para meu desenvolvimento ao longo deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, especialmente a Prof.^a Alexandrina Sartori e Prof. Carlos Magno, pelo incentivo no decorrer do mestrado.

A seção técnica de pós-graduação e a secretária Bruna Jorgetto pela atenção.

A Luciana Fachin e Luíza Pinheiro pelo apoio no laboratório.

A Dr^a Patrícia Sammarco Rosa pela contribuição neste estudo.

A Eloíse Moraes a amizade conquistada dentro e fora do laboratório, foi de grande incentivo em todas as etapas desse trabalho.

A Beatriz pelo conhecimento e amizade compartilhada.

Aos colegas de laboratório Priscila Medeiros, Elderson, Babi, Maríane, Keren, Pamela e Giovana pelos momentos de descontração no dia a dia.

Resumo

Desde 2005, São Paulo conseguiu eliminar a hanseníase como problema de saúde pública, no entanto, casos novos continuam a serem detectados em várias regiões do estado. Para entender sobre a estrutura populacional do *Mycobacterium leprae* na região e utilizando clusterização como uma medida de transmissão recente, a genotipagem foi aplicada. Biópsias de pele de 128 casos de hanseníase de 15 Departamentos Regionais de Saúde foram submetidos à tipagem por MLVA e SNP. Nós obtivemos o genótipo completo para 95 isolados e 13 dos 16 VNTRs foram polimórficos. As repetições 12-5 e 18-8 tinham um número de cópias 6 ou 7 e 7 a 9, respectivamente, que são dificilmente observados em genótipos de outras regiões do país. Uma árvore construída por UPGMA demonstrou a existência de dois grandes grupos e essa separação parece ter ocorrido principalmente pelo STR 18-8, que apresentou 6-9 cópias somente no segundo grupo. Foi construída uma MST com 414 genótipos completos desse presente estudo juntamente com genótipos de outros estados do país que também demonstraram dois grandes grupos. Parte das cepas de SP foram agrupadas com cepas do estado de MT e outras foram agrupadas próximas as cepas do RJ. Cepas de PE e CE, também foram agrupadas entre si. A análise de sequenciamento de SNP da região folP1 e rpoB apresentaram resistência à droga em 5 casos para folP1, sendo que em um desses casos, também para rpoB. Nossos dados sugerem que os dois grupos de *M. leprae* existentes no estado de SP surgiram a partir de dois ancestrais diferentes e que a tipagem por VNTR em hanseníase, pela exclusão de determinados marcadores, principalmente determinada por análise de SNP, pode auxiliar na filogenia. Nós observamos a predominância de 97% de SNP tipo 3, mas subtipagem adicional deverá ser realizada para verificar a associação com tipos de VNTR.

Abstract

Since 2005, São Paulo claims to have eliminated leprosy as a public health problem but new cases continue being detected in several regions of the state. To learn about the population structure of *Mycobacterium leprae* in the region and use clustering as a measure for recent transmission, genotyping was performed. Skin biopsy samples from 128 leprosy cases from 15 regional departments of health were submitted to MLVA and SNP typing. We obtained complete genotypes for 95 isolates and 13 of the 16 VNTRs were polymorphic. The repeats 12-5 and 18-8 had a copy number of 6 or 7 and 7 to 9 respectively that are hardly observed in genotypes from other regions of the country. A UPGMA based tree demonstrated the existence of two major groups and this separation seems to be driven mainly by STR 18-8, presenting 6-9 copies only in the second group. A MST constructed with 414 complete genotypes of the present study together with genotypes from other states of the country also demonstrated two major groups. On part of the SP strains were grouped with the strains from MT and another close to RJ strains; strains from PE and CE, two states from Northeast Brazil were also grouped. Sequence analysis of folP1 and rpoB presented drug resistance associated SNPs in folP1 in five cases and rpoB in one of these. Our data suggest that the two major groups of *M. leprae* exist in Sao Paulo emerged from two different ancestors and that VNTR typing in leprosy, upon the exclusion of the proper markers, can add on phylogeny mostly determined by SNP analysis. We observed the predominance of 97% of the SNP type 3 but further subtyping should be performed in order to associate with VNTR types.

Lista de Figuras

Figura 1: Disseminação da hanseníase no mundo. Os círculos indicam o país de origem das amostras analisada e a sua distribuição para os quatro tipos de SNP. As setas coloridas indicam a direção das migrações humanas e as setas cinzentas correspondem às rotas de migração de humanos derivados de estudos genéticos, arqueológicos, antropológicos e, com tempo estimado de migração em anos ¹⁶	5
Figura 2: Disseminação da hanseníase pelo mundo. Pilares estão localizados no país de origem das amostras de <i>M. leprae</i> e marcados por cores de acordo com o esquema para os 16 subtipos SNP. A espessura do pilar corresponde ao número de amostras (1-5, fina; 6-29, intermediário; >30, largo). As setas cinza indicam as rotas de migração humanas, com tempo estimado de migração em anos. Os pontos vermelhos indicam a localização da Rota da Seda, no primeiro século, e * indica os resultados os resultados obtidos a partir de um a-DNA ¹⁶	6
Figura 3: Combinação 01 dos loci VNTRs, analisada no software Peak Scanner. (Kimura, 2009).	29
Figura 4: Esquema da amplificação por PCR e da digestão utilizando enzimas de restrição para diferenciação dos 4 genótipos de SNP de <i>M. leprae</i>	30
Figura 5: Estado de São Paulo segundo Departamentos Regionais de Saúde (DRS), 2012. Secretaria de Estado da Saúde.	34
Figura 6: Distribuição espacial dos 128 casos de hanseníase no estado de São Paulo.	36
Figura 7: Mapa da distribuição espacial dos isolados de <i>M. leprae</i> com repetição 6, 7 e 5-7 para o VNTR 12-5, distribuídos pelas cidades de Castilho, Ouro Verde, Bauru, Boa esperança do Sul, Leme e Capão Bonito.	40
Figura 8: Distribuição espacial dos genótipos com 6 repetições para 12-5 na cidade de Castilho-SP.	40
Figura 9: mapa da distribuição espacial dos isolados com 9 cópias para 18-8. O marcador maior indica 2 casos.	41
Figura 10: Distribuição espacial dos isolados de <i>M. leprae</i> na cidade de Gavião Peixoto.	43
Figura 11: Distribuição espacial dos 116 isolados de <i>M. leprae</i> no estado de São	

Paulo, segundo o genótipo de SNP	45
Figura 12: UPGMA gerado por 14 VNTRS para os 128 isolados de <i>M. leprae</i> do estado de São Paulo	499
Figura 13: Árvore de minimum spanning tree a partir dos 16STRs com base nos 128 perfis completos e incompletos de <i>M. leprae</i> distribuídos pelas 15 DRS do Estado de São Paulo.....	50
Figura 14: Árvore de minimum spanning tree a partir dos 14STRs, excluídos AT17 e TA18, com base nos 128 perfis completos e incompletos de <i>M. leprae</i> distribuídos pelas 15 DRS do Estado de São Paulo.....	511
Figura 15: Árvore de minimum spanning tree a partir dos 14STRs, excluídos AT17 e TA18, com base nos 128 perfis completos e incompletos de <i>M. leprae</i> distribuídos pelas 15 DRS do Estado de São Paulo.....	533
Figura 16: Árvore de minimum spanning tree a partir dos 14STRs, excluídos AT15 e 6-3a, com base nos 414 perfis completos de <i>M. leprae</i> do Estado de São Paulo, Mato Grosso, Pernambuco, Rondônia, Ceará e Rio de Janeiro.....	555

Lista de Tabelas

Tabela 01: Distribuição dos casos avaliados por número de municípios, segundo as DRS.	355
Tabela 02: Número de casos e forma clínica dos pacientes diagnosticados no período de 2001 a 2013.	377
Tabela 03: Frequência e diversidade alélica dos isolados de <i>M. leprae</i> do estado de São Paulo.	388
Tabela 04: Repetições predominantes por VNTR, segundo as DRS	399
Tabela 05: Perfil genético dos isolados de <i>M. leprae</i> com 6,7 e 5-7 repetições para o STR12-5.	411
Tabela 06: Tabela 6:Perfil genético dos isolados de <i>M. leprae</i> com 9 cópias para o locus18-8.	422
Tabela 07: Tabela 7:Perfil genético dos isolados de <i>M. leprae</i> de Gavião Peixoto..	422
Tabela 08: Tabela 8:Perfil genético dos isolados de <i>M. leprae</i> da família 01	444
Tabela 09: Tabela 9:perfil genético dos isolados de <i>M. leprae</i> da família 2.	444
Tabela 10: Isolados de <i>M. leprae</i> que apresentaram resistência a drogas na população estudada.	466
Tabela 11: perfil genético para 16STRS dos isolados de <i>M.leprae</i> com resistência a drogas.	477

Sumário

1.0 Introdução	1
2.0 Referencial Teórico	2
2.1. Aspectos históricos, etiologia e transmissão da hanseníase.	3
2.2. Classificação clínica, diagnóstico e tratamento da hanseníase.....	7
2.3. Epidemiologia da Hanseníase	10
2.3.1. O estado de São Paulo	11
2.4. Resistência a Drogas na Hanseníase	12
2.5 <i>M. leprae</i> : Variabilidade Genética e epidemiologia molecular.....	14
3.0 Justificativa	21
4.0	
Objetivos.....	23
4.1 Objetivo Geral.....	24
4.2 Objetivos específicos.....	24
5.0 Casuística e Metodologia	25
5.1 Casuística.....	26
5.2 Metodologia	26
5.2.1 Extração de DNA de biópsias de pele:	26
5.2.2 Análise de MLVA-VNTR (Multiple-locus VNTR Analysis):.....	27
5.2.3 Amplificação e detecção dos variable number of tandem repeats (VNTRs) utilizando PCR multiplex:.....	28
5.2.4 Fragment Length Analysis (FLA):	28
5.2.5 Genotipagem dos SNPs:	29
5.2.6 Análise de resultados de Multiple loci VNTR analysis (MLVA):	30
5.2.7 Geoprocessamento:	30
5.2.8 PCR para amplificação das regiões gênicas de interesse determinantes de resistência a drogas (DRDR):.....	31
5.2.9 Sequenciamento dos fragmentos:.....	31
6.0 Resultados.....	33
6.1 População Estudada	34
6.2 Diversidade genética do <i>M. leprae</i> no estado de São Paulo.	37
6.3 Análise da distribuição espacial dos genótipos de <i>M. leprae</i>	39

6.4 Multicasos Familiar.....	43
6.5 Análise de SNP	44
6.6 Estrutura Populacional e filogenia.....	47
7.0 Discussão	56
8.0 Conclusões.....	67
9.0 Referências Bibliográficas	69
10.0 Anexos.....	79
Anexo 1: Mapa da distribuição espacial dos casos de hanseníase LL, no estado de São Paulo	80
Anexo 2: Mapa da distribuição dos casos de hanseníase BL, no estado de São Paulo.....	81
Anexo 3: Mapa da distribuição dos casos de hanseníase BB, no estado de São Paulo.....	82
Anexo 4: Mapa da distribuição dos casos de hanseníase BT, no estado de São Paulo.....	83
Anexo 5: Mapa da distribuição dos casos de hanseníase TT, no estado de São Paulo.....	84
Anexo 6: UPGMA gerado com os 16 VNTRS para os 128 isolados de <i>Mycobacterium leprae</i> do Estado de São Paulo.....	85
Anexo 7:Quadro com Conjunto de <i>primers</i> utilizados na metodologia para análise de SNP.....	88
Anexo 8: Quadro do Conjunto de <i>primers</i> utilizados na PCR- DRDR....	89
Anexo 9: tabela dos perfis genético dos 128 isolados de <i>Mycobacterium leprae</i> do estado de São Paulo, analisado por 16 VNTRs e SNP filogeográfico.....	90

1.0 Introdução

Introdução

A poliquimioterapia (PQT) foi introduzida em 1981 pela Organização Mundial de Saúde (OMS), visando o controle da hanseníase e como forma de minimizar o desenvolvimento da resistência de *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) aos fármacos¹.

O declínio no número de casos da hanseníase possibilitou alcançar a meta de eliminação da doença em nível mundial até o ano 2000, com exceção de alguns países que ainda apresentam detecção de novos casos ano a ano. O relatório de 2014 da OMS, baseado no período de 2013, mostrou que há 14 países responsáveis por 96% da detecção de novos casos, sendo a Índia, o país com mais casos relatados, seguido do Brasil e da Indonésia².

Na última década o Brasil diagnosticou 35.000/ano pacientes de hanseníase,³ sendo que isolados com resistência a um ou mais antibióticos foram detectados em muitas áreas^{4, 5, 6, 7, 8, 9, 10}.

Apesar de o Brasil apresentar altas taxas de detecção da hanseníase ainda em algumas regiões, o estado de São Paulo atingiu em janeiro de 2005 a meta de eliminação da hanseníase proposta pela OMS, ou seja, ter menos de um caso por grupo de 10 mil habitantes. No entanto algumas regiões do estado ainda apresentam bolsões com incidência da doença¹¹.

Os mecanismos básicos da transmissão de *M. leprae* com relação aos reservatórios e o modo de transmissão permanecem desconhecidos e podem ser um empecilho para o controle da hanseníase¹².

Assim, a vigilância molecular da resistência a drogas antimicrobianas, a tipagem de *M. leprae* por mapeamento de sequências *Variable Number Tandem Repeats* (VNTR)^{13,14} e os *single nucleotide polymorphism* (SNPs)^{15,16} têm aplicações na detecção da transmissão da doença e no acompanhamento da eficácia de programas de controle^{17, 18, 19}.

2.0 Referencial Teórico

2. Referencial Teórico

2.1. Aspectos históricos, etiologia e transmissão da hanseníase.

Acredita-se que a hanseníase, também conhecida como lepra, seja uma das doenças mais antigas que acometem o homem, com relatos desde os tempos bíblicos. Na era babilônica a palavra lepra era usada para definir uma doença escamosa²⁰. Muitas patologias dermatológicas que apresentavam algum tipo de descarnação estavam ligadas à hanseníase, que também era sinônimo de lupus, sífilis, vitiligo, escabiose, psoríase e elefantíase. Relatos da doença feitos há mais de 4 mil anos demonstram a existência dessa enfermidade na Índia, China e Japão. Segundo papiros datados da época de Ramsés II, a hanseníase esteve também presente no Egito há mais de 4.300 a.C., fato comprovado pela existência de alguns esqueletos egípcios com características específicas da doença^{21,22}.

Na Bíblia, em Levíticos, também há relatos da doença. Um termo hebreu, *tsaraath* ou *saraath*, era usado para relatar afecções impuras²². Opromolla (1981) também citou que pessoas portadoras de *tsaraath* eram isoladas até que não houvesse mais sinais da doença²³.

Descrita em 1874 pelo médico norueguês Gerhard Henrik Armauer Hansen, a hanseníase é uma doença infecciosa, causada pelo *M. leprae*, um bacilo intracelular obrigatório; esta foi a primeira doença relacionada à infecção causada por uma bactéria²⁴.

O *M. leprae* pertence ao grupo das micobactérias, ordem *Actinomycetales* e a família *Mycobacteriaceae*. Possui um único gênero denominado *Mycobacterium (fungus bacterium)*, termo proposto por Lehmann e Neumann em 1896^{24,25}.

Apresenta-se como bastonetes retos ou levemente encurvados. Seu tamanho pode variar entre 2 e 8 µm de comprimento por 0,2 a 0,5 µm de largura. Nos esfregaços de pele e nos cortes histopatológicos os bacilos são visualizados isolados, em agrupamentos variados ou em arranjos especiais

denominados globias, característica peculiar do *M. leprae*, que resulta da sólida união de bacilos por meio de uma substância chamada gléia^{26, 26, 27,28}.

É um bacilo fortemente álcool-ácido resistente, cujo formato é muito semelhante ao de outras micobactérias, como, por exemplo, *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). Trata-se de um parasita intracelular obrigatório que se reproduz por divisão binária e seu tempo médio de multiplicação varia entre 11-16 dias, característica que reflete no tempo de incubação prolongado e na cronicidade da doença^{26, 29, 30, 31}.

Outra importante característica de *M. leprae* é a impossibilidade do seu cultivo em meio de cultura *axênico*, que pôde ser melhor compreendido após o sequenciamento de seu genoma. Uma drástica redução e deterioração em seu genoma foram observadas, afetando muitas áreas metabólicas, exemplificada pela retenção de um conjunto mínimo de genes necessários para a biossíntese de sua parede celular³⁰, ficando assim o cultivo do bacilo até o momento, restrito a modelos animais como, por exemplo, camundongos BALB/c e Nude, e tatus *Dasypus novemcinctus*^{32, 33}.

Admite-se que a principal forma de contágio seja a eliminação de bacilos por meio das vias aéreas superiores, que são consideradas importantes portas de entrada dos bacilos. Dessa maneira, o diagnóstico e o tratamento precoce contribuem sobremaneira na interrupção da cadeia de transmissão³⁴.

O fluxo migratório pode ser mais uma das causas de risco de transmissão da doença, mesmo em áreas onde a hanseníase já se encontra erradicada³⁴. Os fluxos migratórios influenciaram na disseminação da doença desde a sua origem. Usando genômica comparada, analisada a partir de raros *SNPs*, foi demonstrado que a disseminação em nível mundial de todos os casos de hanseníase avaliados nesse estudo pertencia a um único clone. A doença parece ter se originado na África Oriental ou Oriente Médio e se espalhado com sucessivas migrações humanas. Assim os Europeus ou

Africanos do norte introduziram a hanseníase na África Ocidental e nas Américas nos últimos 500 anos. O esquema de disseminação da hanseníase pode ser visto na figura 01¹⁵.

Essa informação foi publicada por Monot et. al, 2005 em um painel de 175 amostras originárias de 21 países dos 5 continentes por meio da análise de 3 *SNPs*, que definem 4 genótipos principais de *M. leprae* a saber: o tipo 1 com predominância na Ásia, no Pacífico e no leste da África, o tipo 2 e mais raro, presente na Etiópia, no Nepal, no norte da Índia e na Nova Caledônia, o tipo 3 predominante em amostras da Europa, norte da África e nas Américas e o tipo 4 no Caribe e oeste da África. A distribuição geográfica dos isolados com base nesses genótipos sugeriu que a hanseníase teve a sua origem na Ásia Central ou no Leste da África. Acredita-se que o Leste da África seja o berço da doença, por apresentar o tipo 2, mais raro, e provavelmente o mais antigo genótipo de *M. leprae*¹⁵.

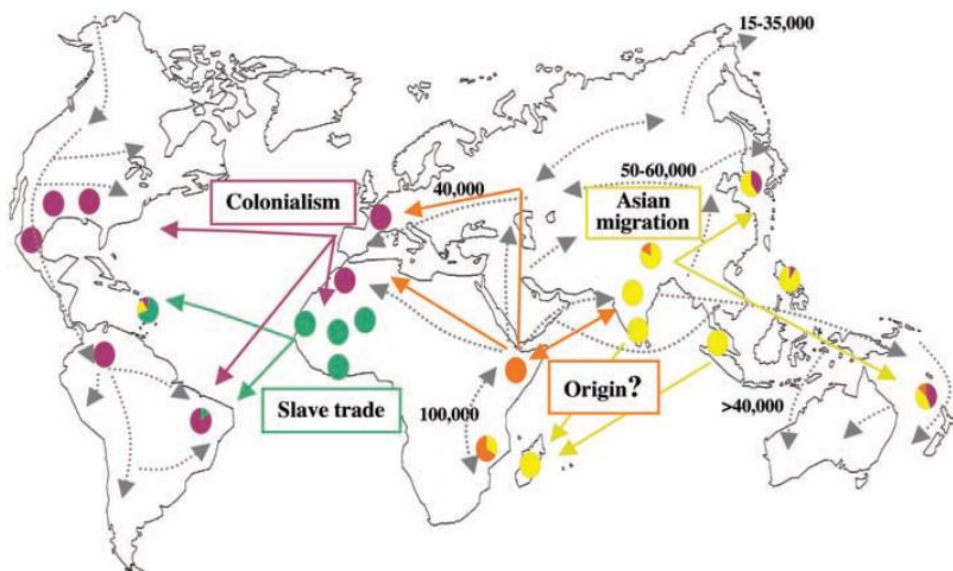


Figura1: Disseminação da hanseníase no mundo. Os círculos indicam o país de origem das amostras analisadas e a sua distribuição para os quatro tipos de SNP. As setas coloridas indicam a direção das migrações humanas e as setas cinzas correspondem às rotas de migração de humanos derivados de estudos genéticos, arqueológicos, antropológicos e, com tempo estimado de migração em anos¹⁶.

Em 2009 Monot et.al, conduziram um novo estudo para fins filogeográficos e a presença dos 78 *SNPs* informativos foi subsequentemente pesquisada em aproximadamente 400 isolados, possibilitando a classificação do *M. leprae* em 16 subtipos de *SNP* (Fig 02), de distribuição geográfica limitada e que se correlacionam com os padrões de migrações humanas e rotas comerciais. Assim o *SNP* tipo 1 apresentou 4 subtipos (1A-D), o *SNP* tipo 2 também apresentou 4 subtipos (2E-H), o *SNP* tipo 3 apresentou 5 subtipos (3 I-M) e o *SNP* tipo 4 apresentou 3 subtipos (4 N-P) A distribuição global desses novos subtipos de *SNPs* demonstrou uma estreita relação entre o genótipo de *M. leprae*, o país de origem e o padrão de migração humana. Os resultados confirmaram ainda a hipótese anterior de que a hanseníase teria se originado no leste da África, tendo se disseminado para Ásia, Meio Oeste, Europa e posteriormente para países da África Central através do comércio de escravos.¹⁶

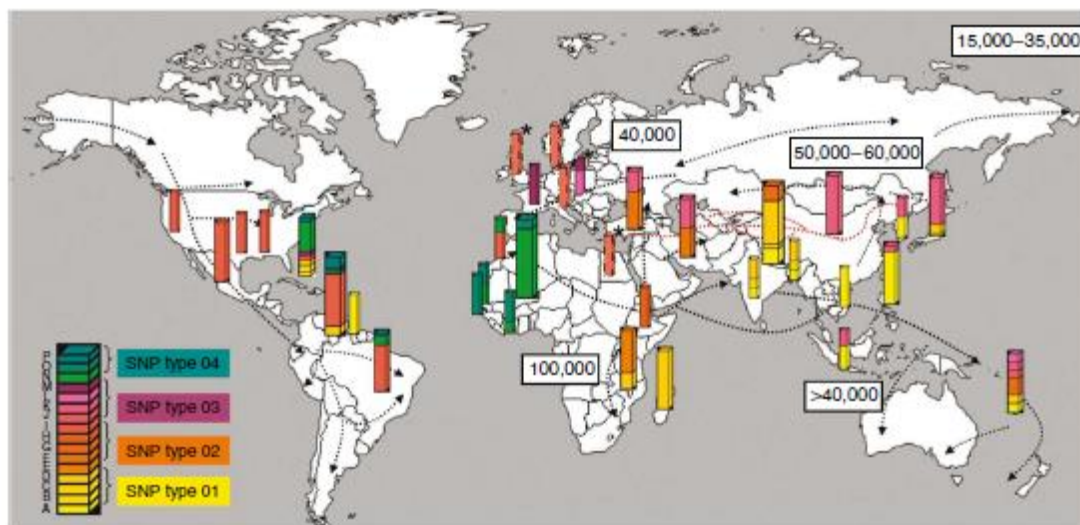


Figura 2: Disseminação da hanseníase pelo mundo. Pilares estão localizados no país de origem das amostras de *M. leprae* e marcados por cores de acordo com o esquema para os 16 subtipos *SNP*. A espessura do pilar corresponde ao número de amostras (1-5, fina; 6-29, intermediário; >30, largo). As setas cinza indicam as rotas de migração humana, com tempo estimado de migração em anos. Os pontos vermelhos indicam a localização da Rota da Seda, no primeiro século, e * indica os resultados os resultados obtidos a partir de um a-DNA¹⁶.

2.2. Classificação clínica, diagnóstico e tratamento da Hanseníase.

A hanseníase é uma doença crônica, caracterizada por aspectos bioepidemiológicos que resultam em diversas formas de manifestação clínica. Após a entrada do bacilo de *M. leprae* no organismo, quando não ocorre a sua destruição, este se aloja nas células de Schwann e pele, podendo em alguns casos chegar aos linfonodos, olhos, testículos e fígado ^{26, 35}.

Em 1966 Ridley e Jopling, propuseram um método de classificação da hanseníase, tendo em conta a imunidade do hospedeiro frente ao *M. leprae*, utilizando um conceito espectral baseado em critérios clínicos, baciloscópicos, imunológicos e histopatológicos. Esta classificação indica duas formas polares e três formas intermediárias: Polo Tuberculóide (TT), Polo Lepromatoso (LL), e como intermediários os grupos borderline-tuberculóide (BT), borderline-borderline (BB), borderline-lepromatoso (BL)^{26, 27, 36}.

A hanseníase inicialmente se manifesta na forma indeterminada, podendo evoluir para cura espontânea, ou desenvolver-se lentamente apresentando as características clínicas definidas nos espectros da doença que são definidas de acordo com a resposta imunológica do hospedeiro frente ao *M. leprae* ²⁶.

No polo TT a hanseníase é caracterizada por apresentar franca resistência, baixa carga bacilar e com lesões únicas ou em pequenos números, apresentando alta resposta imune frente ao *M. leprae* quando avaliado por meio do teste de Mitsuda. O polo LL apresenta baixa resistência, alta carga bacilar e com lesões numerosas por todo o corpo. Para a classificação nas formas intermediárias da doença: BT, BB e BL, também são considerados os aspectos bacteriológicos, histopatológicos e imunológicos ^{26, 35}.

O diagnóstico da hanseníase é clínico-epidemiológico e laboratorial e o diagnóstico clínico é baseado nos sinais e sintomas ao exame da pele, dos nervos periféricos e na história epidemiológica, sendo os sinais cardinais da doença as áreas com anestésias, os nervos espessados e as lesões cutâneas

29.

Apesar da hanseníase não ter um exame considerado “padrão ouro”, alguns métodos laboratoriais estão disponíveis para o auxílio do diagnóstico clínico da doença, assim como outras abordagens diagnósticas alternativas^{29,37}.

Em muitos serviços, o exame baciloscópico para detecção de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) é utilizado para confirmação diagnóstica e auxílio na classificação clínica, sendo realizados por meio do raspado intradérmico de lesão de pele, lóbulos das orelhas e cotovelos. O exame permite a avaliação dos índices baciloscópicos que determina a quantidade de bacilos em escala logarítmica de Ridley & Jopling de 0 a 6+ e o índice morfológico mostra a proporção de bacilos viáveis no paciente, o qual é realizado pela observação da morfologia do bacilo, que deve estar com a parede celular íntegra. Os bacilos íntegros apresentam-se totalmente corados em vermelho, enquanto os bacilos fragmentados apresentam falhas na parede³⁴. Os pacientes multibacilares (MB) apresentam baciloscopia positiva, enquanto os pacientes paucibacilares (PB) regularmente são baciloscopia negativa³⁸.

Outro teste, com caráter prognóstico, que pode auxiliar na classificação da forma clínica da hanseníase é a reação de Mitsuda. O teste é feito por meio da injeção da lepromina (suspensão de bacilos mortos pelo calor) na derme, e após o período de 28 dias é realizada a leitura, com ou sem a presença de pápula, nódulo ou ulceração no local da inoculação. O resultado negativo é a ausência de sinal no local da inoculação ou a presença de pápula ou nódulo inferior a 5 mm de diâmetro, enquanto a reação positiva é baseada na presença de pápula ou nódulo superior a 5 mm de diâmetro^{26,35}.

Uma proposta diagnóstica alternativa é a sorologia, que foi desenvolvida a partir de alguns antígenos específicos do *M. leprae*, como por exemplo, o PGL-1 que são encontrados nos tecidos infectados e desencadeiam resposta

imune humoral precocemente. Os pacientes MB apresentam altos níveis desses antígenos, enquanto que os PB apresentam níveis baixos ou ausentes. Contudo, o teste não é recomendado como diagnóstico quando avaliado isoladamente, uma vez que contatos dos pacientes podem apresentar um resultado positivo fraco ³³.

Desde o final dos anos 80, inúmeros grupos de pesquisa ao redor do mundo, têm utilizado a *Polymerase Chain Reaction (PCR)* para o desenvolvimento de diferentes sistemas de amplificação de sequências genômicas de isolados de *M. leprae* com a finalidade de aumentar o limite de detecção, principalmente naqueles casos onde um número baixo de bactérias está presente^{39, 40, 41, 42, 43, 44,45}.

Desse modo, inúmeras metodologias para a detecção de *M. leprae* em amostras clínicas foram descritas ^{46,47} e muitos estudos envolvendo sistemas simples e específicos foram padronizados para amplificação de regiões gênicas que codificam o antígeno de 36-kDa ⁴⁸, de 18-kDa ⁴⁹ ou de 65-kDa ⁵⁰, assim como para outras sequências repetitivas do *M. leprae* ⁵¹.

Outro ponto a destacar é que embora a *PCR* para *DNA* seja amplamente aceita para detecção da infecção, uma importante limitação é sua inabilidade para distinguir entre organismos viáveis e não viáveis. Dessa forma, nos últimos anos, métodos de detecção de RNA vêm sendo propostos, como ferramenta promissora para detecção não somente de *M. leprae*, mas também para realizar importante discriminação entre organismo viável e não viável com vistas ao correto prognóstico dos pacientes de hanseníase durante o tratamento, determinação de resistência a drogas ou identificação das recidivas e sua diferenciação com as reações hansênicas ^{52,53}.

A introdução da PQT, uma associação de três drogas para hanseníase multibacilar (MB): rifampicina, clofazimina e sulfona; e duas drogas para os paucibacilares (PB): rifampicina e sulfona ⁵⁴ permitiu o estabelecimento da classificação, dividindo as formas clínicas em paucibacilares (PB) – nos casos

com até cinco lesões cutâneas – e em multibacilares (MB) – mais do que cinco lesões ⁵⁵.

Cabe aqui o registro de que além de um diagnóstico precoce, a regularidade na tomada mensal das drogas do esquema PQT é fundamental para o êxito do tratamento da hanseníase ⁵⁶.

2.3. Epidemiologia da Hanseníase

Com a implementação da PQT em 1981 pela Organização Mundial da Saúde (OMS), a prevalência mundial da hanseníase sofreu um significativo declínio nas últimas três décadas. Desse modo o declínio no número de casos da doença permitiu alcançar a meta de eliminação em nível mundial no ano 2000. Entretanto, 12 países não obtiveram o mesmo sucesso, sendo estes: Angola, Brasil, República-Centro Africano, República Democrática do Congo, Guiné, Índia, Indonésia, Madagascar, Moçambique, Mianmar, Nepal e Nigéria. Evidenciando a necessidade da busca por casos novos e o tratamento com a PQT, como fatores chave cruciais para o controle efetivo da doença ⁵⁷.

Segundo o relatório de 2014 da OMS, com base no período de 2013, há 14 países que são responsáveis por 96% da detecção de novos casos. A Índia é o país com mais casos relatados, seguido do Brasil e Indonésia. No ano de 2013 foram registrados 215.656 novos casos da doença, e este número está assim dividido pelo globo: o Sudeste asiático possui o maior número de novos casos registrados com 155.385, seguido das Américas com 33.084, África 20.911, a região do Pacífico Ocidental 4.596, e, com menor taxa de detecção, está à região mediterrânea, com 1.680 novos casos ⁵⁸.

Em 2013, o Brasil foi responsável pela detecção de 31.044 novos casos. A região Nordeste possui os maiores números da doença com 13.276 casos registrados, a região norte com 6.095, o centro-oeste 5.786, a região sudeste 4.712 e região sul com 1.175 novos casos ⁵⁸.

2.3.1. O estado de São Paulo

Embora a disseminação da hanseníase tenha sido registrada nas principais cidades brasileiras durante o período de colonização, este fato não ocorreu no estado de São Paulo antes do século XVIII ^{20,59}.

A ausência de casos da doença poderia estar ligada a duas características específicas da cidade naquela época: i) A sua localização no planalto, que para a época era de difícil acesso e isolado do litoral pela serra do mar e ii) não oferecer atrativos aos colonizadores portugueses por ser uma vila pequena e pobre. Porém, essa situação mudaria a partir do ciclo do ouro no estado, pois a cidade de São Paulo tornou-se parte da rota dos exploradores que vinham de diversos lugares, incluindo Rio de Janeiro, cidade da qual já se relatavam casos da doença ^{20,59}.

Nos anos 1820, 1851, 1874 e 1886 foram realizados censos populacionais que permitiram avaliar o comportamento da hanseníase e apesar da fonte documental apresentar falhas como, erro no diagnóstico ou omissão de doentes das listagens, os dados recuperados permitiram acompanhar o avanço geográfico da hanseníase e o registro de regiões com maior incidência da doença, como por exemplo, o Vale do Paraíba. Esta região faz parte do caminho entre São Paulo e a cidade do Rio de Janeiro, onde já havia relatos de casos de hanseníase ^{20, 59,60}.

A análise dos dados coletados nos censos mostrou que a hanseníase avançou pelo estado de São Paulo à medida que a ocupação do solo ocorreu com o desenvolvimento agrícola e o ciclo do café seguiu para o oeste do estado ^{20, 59,60}.

No início do século XX o estado de São Paulo já era considerado uma região de alta endemicidade. Outros dados do censo do início do século mostraram que em 1908, o estado apresentava 2.000 mil casos de hanseníase. Segundo este censo, esse número poderia dobrar em um período de 15 anos. Estima-se que em 1923, havia 4.115 doentes no Estado, e uma população de

4.600.000 habitantes e em 1927 uma média de 8.000 a 10.000 pessoas doentes no Estado⁵⁹.

A partir da década de 40 houve uma redução no ritmo do crescimento da endemia, e de 1970 até o ano de 1990 houve uma diminuição ano a ano. No período de 1992 a 1996 os índices de casos ativos diminuíram e o principal motivo foi à alta por cura. Nesse período o estado de São Paulo mostrou que houve 41.550 casos de pacientes com alta contra a entrada de 14.359 novos casos⁶⁰.

No Estado de São Paulo o índice de prevalência da hanseníase em 2002 foi de 1,41/10.000 habitantes, com 5.378 doentes em registro ativo; o número de casos detectados nesse mesmo ano foi 2.765 com um coeficiente de detecção de 0,72. Em 2005 os valores encontrados no Estado correspondiam a 0,44/10.000 hab. com o alcance da meta de eliminação ⁶¹. No período de 2006 a 2013 foram diagnosticados 14,627 novos casos e em 2014, 1.441 casos novos ¹¹.

2.4. Resistência a Drogas na Hanseníase

Até o final da década de 30 nenhuma droga eficaz estava disponível para o tratamento da hanseníase. Somente no início da década de quarenta nos Estados Unidos, Faget experimentou uma Sulfona, o *Promin*, no tratamento da hanseníase, tendo obtido bons resultados ^{62,63}.

Já no início da década de 50 a dapsona foi introduzida como quimioterapia padrão na hanseníase e passou a ser usada em todo o mundo. Entretanto, no final dos anos 70 começaram a surgir cepas resistentes a essa droga, com níveis acima de 40% em determinadas localidades ^{29,30}. Posteriormente, novas drogas foram adicionadas ao tratamento da hanseníase como a rifampicina e a clofazimina ^{62,63}.

Devido à impossibilidade do cultivo do *M. leprae* em meios artificiais, a

detecção de resistência a drogas na hanseníase ficou limitada aos estudos com modelos animais. Desta forma, em 1960, Shepard padronizou um ensaio de inoculação em coxim plantar de camundongos e desde então, é o método considerado “padrão ouro” para o teste de novas drogas no tratamento da hanseníase e na detecção de cepas resistentes a drogas ^{49, 62,63}.

Variações da técnica de Shepard envolvendo titulação com número variável de bacilos se mostraram úteis para detectar diferenças nos índices de viabilidade de diferentes suspensões de bacilo, mas em virtude de trabalho árduo, demorado e de alto custo, a técnica tornou-se inviável, por isso poucos laboratórios no mundo mantêm a metodologia ^{62,63}.

A partir do sequenciamento do genoma de *M. leprae*, e do melhor entendimento dos mecanismos de resistência a drogas em micobactérias, foi possível o desenvolvimento de metodologias moleculares para detecção de mutações associadas à resistência a dapsona, rifampicina e as fluoroquinolonas ⁶³.

As metodologias moleculares como o sequenciamento direto permitem uma rápida e eficiente detecção da resistência a drogas em *M. leprae*. Essa metodologia é baseada na amplificação por *PCR* de parte dos genes que podem conter regiões determinantes de resistência a drogas, do inglês, *DRDR* (*Drug Resistance-Determining Region*) como *folP*, *rpoB* e *gyrA*, associados respectivamente, dapsona, rifampicina e fluoroquinolona ⁶².

A dapsona é uma sulfona sintética que é codificada na região *folP*, que possui dois homólogos: *folP1* e *folP2*. A região de *folP1* codifica a síntese de dihidropteroato (DHPS) que atua na via de biossíntese de folato em micobactérias e têm apresentado relação com resistência a dapsona. Mutações missense na região dos códons 53 e 55 no *folP1* são responsáveis pela resistência a dapsona em *M.leprae* ^{62,63}.

O componente chave para o tratamento da hanseníase é a rifampicina e sua resistência é resultado de mutações no gene *rpoB*, que codifica a

subunidade da RNA-polimerase. A resistência à rifampicina em *M. leprae* também está ligada as regiões missense, cujas mutações mais comuns dentro do gene *rpoB* estão localizadas no códon 456 e 425^{62,63}.

Apesar de seu mecanismo de ação ainda não estar elucidado em *M. leprae*, a ofloxacina é uma carboxiquinolona fluorada com atividade moderada e em outras bactérias parece inibir o processo de replicação do DNA por meio da inibição da DNA girase, um tetrâmero contendo duas subunidades A e duas subunidades B (*gyrA* e *gyrB*). As mutações dentro do gene *gyrA*, estão associadas à resistência a ofloxacina em *M. tuberculosis* e *M. leprae*. A região missense no codon Ala91 foi identificada na maioria das cepas resistentes a ofloxacina^{62,63}.

2.5 *M. leprae*: Variabilidade Genética e epidemiologia molecular

A disparidade entre as taxas de prevalência e novas taxas de detecção de casos ao longo de muitos anos enfatiza a falta de conhecimento sobre o período de transmissão e de incubação da hanseníase. Abordagens para direcionar estas questões estão limitadas pela falta de conhecimentos fundamentais sobre a epidemiologia da doença, as fontes de infecção, seu modo preciso de transmissão e a importância da avaliação de contato. Os avanços recentes na genotipagem de bactérias baseadas na inserção e deleções de DNA, polimorfismos de nucleotídeo único (*SNP*) e outras estruturas polimórficas de DNA, tais como repetições em tandem de número variável (*VNTR*), revolucionaram a nossa compreensão das origens das doenças, fluxos migratórios, bem como a resistência a drogas e sua propagação. Estas ferramentas têm melhorado a nossa compreensão sobre os surtos de doenças e seus padrões de transmissão⁶⁴.

Muitos *VNTRs*, no genoma de *Mycobacterium leprae* foram relatados com potencial polimórfico para atuar como marcadores genéticos na

diferenciação dos isolados ⁶⁵.

Os primeiros marcadores genéticos identificados foram (i) uma sequência intragênica de 6 pb no gene *rpoT* (6-3), e a segunda, um elemento repetição trinucleotídico (TTC21) acima de um pseudogene. Essa sequência apresentou um número variável de repetições em tandem (*VNTRs*) quando sequenciado em diferentes isolados ^{66,67}.

Apesar da identificação desses dois *VNTRs*, ainda era limitado o poder de discriminação para diferenciação entre os isolados. Assim, com a publicação do genoma completo de *M. leprae* a partir de um isolado de *Tamil Nadu* (Índia), chamado de cepa TN, começaram a ser descritos outros marcadores genômicos polimórficos para os estudos de genotipagem ^{68,69}.

Groathouse et.al,2004, realizaram um estudo que identificou 9 *VNTRs* polimórficos (AT17, C20, CG6, 6-7, 12-5, 18-8, 21-3, 27-5, AGA20), que foram aplicados em um painel de isolados de *M. leprae* a partir de tatus. Em outro estudo, foram analisados a diversidade alélica e estabilidade de outros 4 *VNTRs* do *M.leprae* em um painel de isolados a partir de pacientes e animais, onde foi demonstrado que os marcadores AT17, TA18, GTA9 e GAA apresentam potencial para diferenciar cepas de *M. leprae* ⁷⁰.

Ainda em 2004, a utilização de 3 *VNTRs* em um painel de isolados de biópsia de pele de 33 pacientes multibacilares, mostrou uma variação de 10 a 25 repetições no TTC 21, 6 a 13 repetições no AGT e AT de 8 a 19 repetições. Entre os 33 isolados de *M. leprae*, oito pares de isolados e três trios de isolados apresentaram repetições idênticas em dois locis (TTC e AGT e TTC e AT), e dois pacientes apresentaram o mesmo genótipo baseado nos 3 *VNTRs* (TTC, AGT e AT). Nesse trabalho foi incluído um caso multifamiliar com 4 pacientes, sendo que 3 destes mostraram divergência apenas de 1 repetição no AT ⁷¹.

Ainda nesse estudo, foram avaliados os mesmos *VNTRs* em diferentes materiais biológicos (biópsia de pele, material para baciloscopia, swab nasal e

células mononucleares do sangue periférico) para sete pacientes. Esse estudo mostrou que os diferentes materiais biológicos do mesmo paciente apresentaram o mesmo genótipo, ou seja, correspondiam em número de repetições para os *VNTRS*⁷¹.

Em análise adicional com amostras de biópsia de pele e biópsia de nervo de 8 isolados de pacientes, em 7 isolados foram observadas diferenças em número de repetições para os *VNTRS*, indicando a existência de 2 populações distintas⁷¹.

Em 2005 Zhang et.al, avaliaram um painel de 44 *VNTRS* em 27 isolados de origem multibacilar mantidos em camundongos. Neste estudo, 11 *VNTRS* selecionados não apresentaram nenhuma variabilidade genética, enquanto os marcadores *rpoT* (6-3), 6-7, 12-5, 18-8, 21-3 e 27-5 foram variáveis, confirmando com isso, os dados encontrados por Groathouse e colaboradores. Os perfis dos *VNTRS* avaliados nos isolados de passagem de camundongos apresentaram o mesmo número de repetições que os isolados iniciais, demonstrando assim, a estabilidade e a reprodutibilidade desses *VNTR*⁷².

Em 2009, uma análise baseada em *PCR multiplex*, ou seja, a amplificação de diferentes *VNTRS* em uma mesma reação de *PCR*, com oligonucleotídeos marcados com diferentes fluoróforos, foi proposta e padronizada, permitindo que o número de cada repetição fosse determinado pela metodologia *Fragment Length Analysis (FLA)*⁷³.

Neste estudo, um total de 17 *VNTRS*, foram avaliados 4 combinações diferentes de *primers* em isolados oriundos de pacientes com hanseníase da Índia, Etiópia, Malawi, Guiana, Filipinas e Tailândia⁷³.

A partir da publicação desse painel de *VNTRS*, trabalhos utilizando as metodologias *PCR Multiplex* e *FLA* foram realizados em países (Filipinas, China, Colômbia, Tailândia, México, Índia e o Brasil) com a finalidade de avaliar os 17 *VNTRS* quanto a sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade em ensaios padrão, utilizando cepas referência de *M. leprae*, para identificar

os marcadores adequados para a diferenciação dos isolados do bacilo em diferentes regiões geográficas do globo e determinar sua aplicabilidade como um método de genotipagem sistemático no rastreamento da transmissão da hanseníase^{17,19, 74, 75, 76, 77, 78,}.

Os estudos da epidemiologia molecular da hanseníase têm sido limitados devido ao longo período de incubação de *M. leprae* até o desenvolvimento da doença, que resulta em uma disseminação lenta da doença⁷⁹.

No período de 2002 a 2005, um estudo realizado em Qiubei/ China, caracterizou 57 isolados de *M. leprae* com 8 *locis*. Nesse estudo foi demonstrada a transmissão da doença em ambiente intrafamiliar, com a presença de 2 pacientes que possuíam o mesmo número de cópias para 5 *VNTRs*. Também foram identificadas 2 pessoas de uma mesma família com diferenças nos marcadores avaliados, sugerindo que a infecção foi de uma fonte externa ao ambiente familiar⁷⁹.

Ainda nesse mesmo estudo, foi demonstrado que pacientes de dois municípios de Qiubei compartilhavam genótipos similares e concluiu-se que uma feira típica da região, foi a responsável pela transmissão da doença, visto que era o local de encontro da população dessas localidades⁷⁹.

Um segundo estudo em continuidade ao anterior foi conduzido na mesma região de Qiubei até 2010, e 164 casos foram submetidos à genotipagem por 7 *locis* e desse total foram identificados que 53 pertenciam a 23 famílias multicaso, e que 11 destas famílias já haviam sido descritas no estudo anterior. A análise evidenciou ainda que em 5 famílias foram observadas a mudança de apenas 1 repetição em um único *VNTR* quando comparado com outra família ou cluster. Demonstrando assim, uma cadeia de transmissão ativa da doença no local¹⁹.

Outro método descrito para tipagem de *M. leprae* são os *SNPs*, em 2005 Monot e colaboradores, conduziram um estudo a partir de um painel de isolados de 21 países, que permitiu a identificação de 3 *SNPs*, determinando 4

genótipos de *M. leprae*. Esses 4 genótipos, relacionados com a origem geográfica do isolado, propiciaram a elaboração de uma teoria para a disseminação da hanseníase pelo mundo, assim, formulou-se a hipótese de que a doença tenha tido sua origem no leste da África, tendo se espalhado a partir das migrações humanas ¹⁵.

Um novo estudo foi conduzido em 2009 utilizando um banco de 400 amostras, que incluíram isolados não avaliados anteriormente, o que permitiu a definição de 16 genótipos de *M. leprae*. Na verdade, os 4 genótipos definidos inicialmente foram subdivididos (cada um) em 4 subgrupos. O *SNP* tipo 1 apresentou 4 subtipos (1A-D), o *SNP* tipo 2 também apresentou 4 subtipos (2E-H), o *SNP* tipo 3 apresentou 5 subtipos (3 I-M) e o *SNP* tipo 4 apresentou 3 subtipos (4 N-P). Diante desses dados foi confirmada a hipótese de que a hanseníase teve sua origem na África Oriental (*SNP* 2), a partir do qual se originou o *SNP* tipo 1, que seguiu para a Ásia com as migrações humanas, posteriormente o *SNP* tipo 3 foi disseminado para o Oriente Médio e Europa, e por meio do comércio de escravos o *SNP* tipo 4 chegou à África Central ¹⁶.

Em 2013, um novo estudo de epidemiologia molecular da hanseníase na China foi conduzido com um painel de amostras de outras regiões. Neste estudo a análise dos genótipos dos isolados de *M. leprae* foi avaliada por 17 *VNTRs* e 16 subtipos de *SNPs* ⁸⁰.

Esse estudo mostrou claramente a importância de associar o método de tipagem por *SNP*, que elucidou três possíveis rotas de introdução da hanseníase e/ou transmissão da doença na China. A primeira mostrou que a rota do norte por meio da rota da seda da Ásia Central teria disseminado a hanseníase na China. A segunda é a rota da Seda do Sul pelo mar que envolve os países do sudeste da Ásia e a terceira é a rota da seda originária do porto de Ningbo que ligava a China, Japão e a Coreia através do mar da China ¹⁵.

^{16,80}.

Um ponto importante neste estudo foi a presença de alguns isolados com 4 cópias para o *locus rpoT*. Globalmente poucos isolados possuem esse perfil genético, sendo que este foi o primeiro marcador com polimorfismo usado para a diferenciação de cepas japonesas e coreanas^{66,80}.

Os isolados que apresentaram perfil 4 repetições no *VNTR rpoT*, pertencem a duas regiões distantes na China, sendo que uma esta localizada próxima à fronteira ocidental, entre o Tibet e Sichuan, e a outra região esta próxima ao Japão e Coreia do Sul. Os isolados com esse perfil confirmam que há uma relação entre as cepas de origem chinesa e japonesa, no entanto não é claro a conexão entre esses isolados, devido à distância geográfica, portanto acredita-se que possa existir uma explicação familiar e/ou religiosa⁸⁰.

O conjunto de dados obtidos pela caracterização dos 17 *VNTRS* mostrou por meio de uma análise de PCA a presença de 3 subpopulações distintas nesse painel e a formação de um grupo menor. Também se observaram que duas regiões vizinhas Guangdong e Fujian apresentaram perfis distintos de outras regiões da China, Esses isolados quando submetidos à genotipagem de *SNP* mostraram pertencer ao tipo 1 até então desconhecido na população chinesa⁸⁰.

Vários estudos vêm mostrando que por meio da correta seleção dos *VNTRS* e da associação com *SNP*, é possível verificar bolsões regionais com genótipos específicos, como por exemplo, famílias multicasos. Permite ainda a identificação e monitoramento de *clusters*, o entendimento da distribuição geográfica da hanseníase e a identificação de populações de risco. Evidenciando a importância da combinação dos dados moleculares e epidemiológicos para fornecer um melhor entendimento dos padrões de transmissão da hanseníase.^{76, 78, 80, 81,82}.

Portanto, os estudos de epidemiologia molecular podem colaborar para o entendimento da transmissão da doença em regiões de alta e baixa endemia, identificar a origem de novos casos e assim, auxiliar na definição de novas

estratégias junto aos programas de controle da hanseníase em nível global. ⁷⁷,
78, 79, 80 ,

3.0 Justificativa

Justificativa

A eliminação da hanseníase no estado de São Paulo foi decretada em 2006, no entanto em várias regiões do estado, casos novos ainda são detectados com considerável grau de incapacidade ao diagnóstico, sugerindo significativa prevalência oculta. Esse estudo se propôs a partir da coleta de informações geográficas, demográficas, clínicas e dos dados dos genótipos de *M. leprae* bem definidos, verificar se as taxas de detecção de novos casos no estado de São Paulo estão realmente expressando todos os casos na população geral. Portanto, avaliar a diversidade genética do *M. leprae* em áreas de eliminação e com contínua notificação de casos novos pode endereçar importante contribuição aos programas de controle da doença.

4.0 Objetivos

4.1 Objetivo Geral

- Caracterizar a variabilidade genética entre os isolados de *M. leprae* de pacientes hansenianos do Estado de São Paulo.

4.2 Objetivos específicos

- Determinar a variabilidade genética dos isolados de *M. leprae* por meio das metodologias de MLVA-VNTR e SNP;
- Investigar em todas as amostras coletadas a existência de cepas do *M. leprae* resistentes à dapsona e rifampicina por meio de sequenciamento de regiões específicas dos genes *folP1* e *rpoB*;
- Demonstrar a distribuição espacial dos perfis genéticos de *M. leprae*;
- Definir possíveis cadeias de transmissão da hanseníase e
- Comparar os isolados de *M. leprae* do estado de São Paulo com os demais isolados brasileiros caracterizados;

5.0 Casuística e Metodologia

5.1 Casuística

O estudo foi conduzido a partir de 128 amostras de biópsias de pele, coletadas de todos os casos novos e recorrentes de pacientes com suspeita de hanseníase que foram atendidos por demanda espontânea no ambulatório de hanseníase do Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, São Paulo.

As coletas das amostras de biópsias de pele compreenderam o período de 2001 a 2013. Não foram incluídos nesse estudo pacientes com idade menor que 18 anos.

Os dados clínico-epidemiológicos dos pacientes foram obtidos a partir da coleta por meio dos prontuários de cada paciente. As variáveis selecionadas incluíram: forma clínica, ano do diagnóstico, reação, recidiva, procedência, departamento regional de saúde, endereço completo, profissão, estado civil, escolaridade, tratamento e contato para hanseníase.

Por se tratar de um projeto com amostras retrospectivas, um Termo de Compromisso foi emitido e assinado por todos os pesquisadores envolvidos e enviado para aprovação junto com o projeto ao Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Lauro de Souza Lima, atestando o cumprimento das normas regentes expressas na Resolução nº 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde.

5.2 Metodologia

5.2.1 Extração de DNA de biópsias de pele: O DNA das biópsias de pele foi extraído a partir de um kit comercial (DNeasy Tissue QIAGEN) que proporciona um isolamento de DNA genômico rápido. Para maior conveniência e menor tempo de manipulação, as células foram submetidas à lise diretamente com a proteinase K (incluso no *kit*) sem a necessidade de uma

extração orgânica ou precipitação com etanol. Após a lise, o DNA foi purificado em apenas 20 minutos e em seguida mantido a -20°C até a sua utilização.

5.2.2 Análise de MLVA-VNTR (Multiple-locus VNTR Analysis): Todos os experimentos de PCR foram realizados com o kit QIAGEN Multiplex, conforme instruções do fabricante. Os 17 loci-VNTRs (micro e minissatélites) foram divididos em 4 combinações contendo “primers” distintos para realização do PCR multiplex. Os “primers” marcados com diferentes fluoróforos (NED, PET, VIC e FAM) e não marcados foram reconstituídos em tampão TE 1X (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) para uma concentração de 100 μM . Foram feitas alíquotas estoques com 50 μl de cada “primer” e armazenadas a -20°C . As Alíquotas de trabalho foram preparadas de acordo com as combinações indicadas no quadro 01 e ajustadas para o volume final de 200 μl com tampão TE, de modo que cada um dos “primers” ficasse numa concentração final de 2 μM . Cada “primer” quando misturados nas combinações indicadas, ficaram com uma concentração de 0,2 μM .

Quadro 1: Combinações dos 17 loci -VNTRs utilizados na PCR *multiplex* e *primers*

Combinações PCR <i>multiplex</i>	Loci	Primer senso	Primer Antisenso	Tamanho fragmento (pb)
1	(AC)8b	VIC-GCCCACTTACCTCAACCAAC	CCTATAACGGCACTCAGTCCA	390
	(GTA)9	NED-AGCCTTAGTCGCGCAGATG	TCCGCTGTCCGTCCGCTGA	307
	(GGT)5	6FAM-GCAGCGGTGTAACAGCATAGC	TGTCTGCCTTGCGAAACGGTC	242
	(AT)17	PET-TCTCCAACATGCTGCGACA	GTACAGCGGCCTGATCGAA	181
	6-3a	VIC-ATGCCGAACCGGACCTCGACGTTGA	TCGTCTTCGAGGTCGTCGAGA	91
2	21-3	6FAM-GAATCTGACCTTTTCGAAAATG	CGATGCAGCTTCCTACGG	312
	(AC)9	NED-AGCGCCCGTTGTGCGATAGA	GACTGGATGTCGGCACCCC	236
	(AT)15	PET-CAATATGCGGGTTGGCGCTTCTG	CCGTCTGGCTCGATGGCTGGATTC	168
	(AC)8a	VIC-GTGTACGCGGAACCAGGCA	CCATCTGTTGGTACTACTGA	124
3	27-5	6FAM-ATTGAGCAGATGGCCGGTC	AGCAGTCGGCACGCCCTT	327
	6-7	VIC-GCCATCGTTGTCGGTTCATC	CGGAGGAGGTGGGTACGGT	268
	(TA)18	NED-CGTGCGTCGTGTGTAGGC	GACGTGGCAACATCGAAGTT	230

	(TTC)21	PET-CTACAGGGGGCACTTAGCTC	GGACCTAAACCATCCCGTTTT	201
4	18-8	PET-GCCCGTCTATCCGCATCAA	GCAAAGATCAGCACGCCAAT	348
	12-5	VIC-CTGGTCCACTTGCGGTACGAC	GGAGAAGGAGGCCGAATACA	289
	23-3	6FAM-CCGAAGCCCTGGACGAAG	GCCGTAAATCCGCTCCC	243
	(TA)10	PET-TAGATTCAAACGACCATGCA	CGCCTTTGTGCACTAATAGT	185

5.2.3 Amplificação e detecção dos variable number of tandem repeats (VNTRs) utilizando PCR multiplex: A PCR multiplex foi realizada com o kit QIAGEN Multiplex e cada reação teve um volume final de 25 µl, compreendendo 12,5 µL de Master Mix na concentração (2X), 2,5 µL de mix dos “primers” na concentração de 2 µM de cada, 2,5 µL de Q-solution 5x e Água RNase free q.s.p. (kit QIAGEN Multiplex) finalizando com 1, 2 ou 3 µL do DNA alvo, conforme o índice bacilosκόpio de cada amostra. Para cada combinação de “primers” foram adicionados controles positivos com DNA da cepa referência NHPD63 e negativos só com a máster mix e “primers”, para checar a qualidade da PCR, em um termociclador T-Gradient Thermoblock (Biometra). Os produtos das reações foram analisados em gel de agarose 3%.

5.2.4 Fragment Length Analysis (FLA): Após a amplificação, 1µl do produto amplificado da PCR foi diluído na concentração de 1:80. A seguir, 1 µl do produto diluído foi adicionado em 12 µl de formamida Hi-Di e 0,3 µl do marcador GeneScan LIZ-500. As amostras foram então desnaturadas a 94º C por 5 minutos em um termociclador termociclador T-Gradient Thermoblock (Biometra), submetidas à eletroforese de capilar e posteriormente injetadas nos capilares (36 cm, polímero POP-7) em voltagem de 1kV por 22s. A eletroforese capilar foi realizada em voltagem de 15 kV a 60ºC por 45min. Após a separação, os eletroferogramas foram visualizados e analisados no software Peak Scanner (Applied Biosystems), conforme figura 03, segundo Kimura 2009.

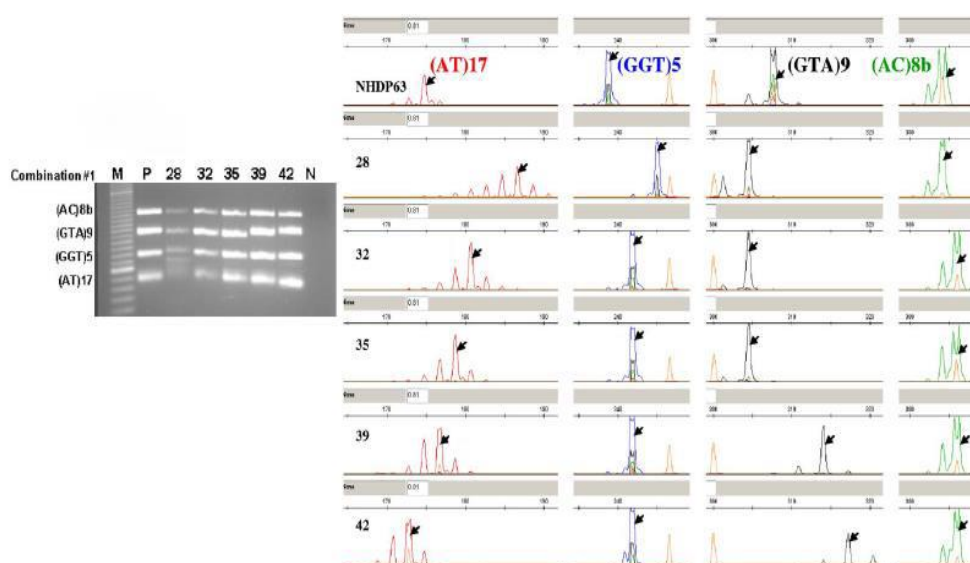


Figura 3: Combinação 01 dos loci VNTRs, analisada no software Peak Scanner. (Kimura, 2009).

5.2.5 Genotipagem dos SNPs: Para a definição dos genótipos, segundo os SNPs, foi utilizada a técnica de PCR-RFLP segundo Sakamuri e colaboradores em 2009. A amplificação das amostras foi realizada utilizando o kit QIAGEN Multiplex sendo que cada reação teve um volume final de 20 μ L: 10 μ L de Master Mix QIAGEN Multiplex na concentração (2X), 10 μ m do “primer forward”, 10 μ m do “primer reverse”, 2,0 μ L de Q-solution (5X), 4,0 μ L de Água RNase free e 3 μ L do DNA alvo, conforme quadro 02 em anexo 03. A PCR foi realizada nas seguintes condições de temperatura: temperatura de desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, seguidos de 45 ciclos de 94°C por um minuto, 55°C por um minuto e 72°C por 2 minutos, finalizando com a temperatura de extensão de 72°C por 10 minutos.

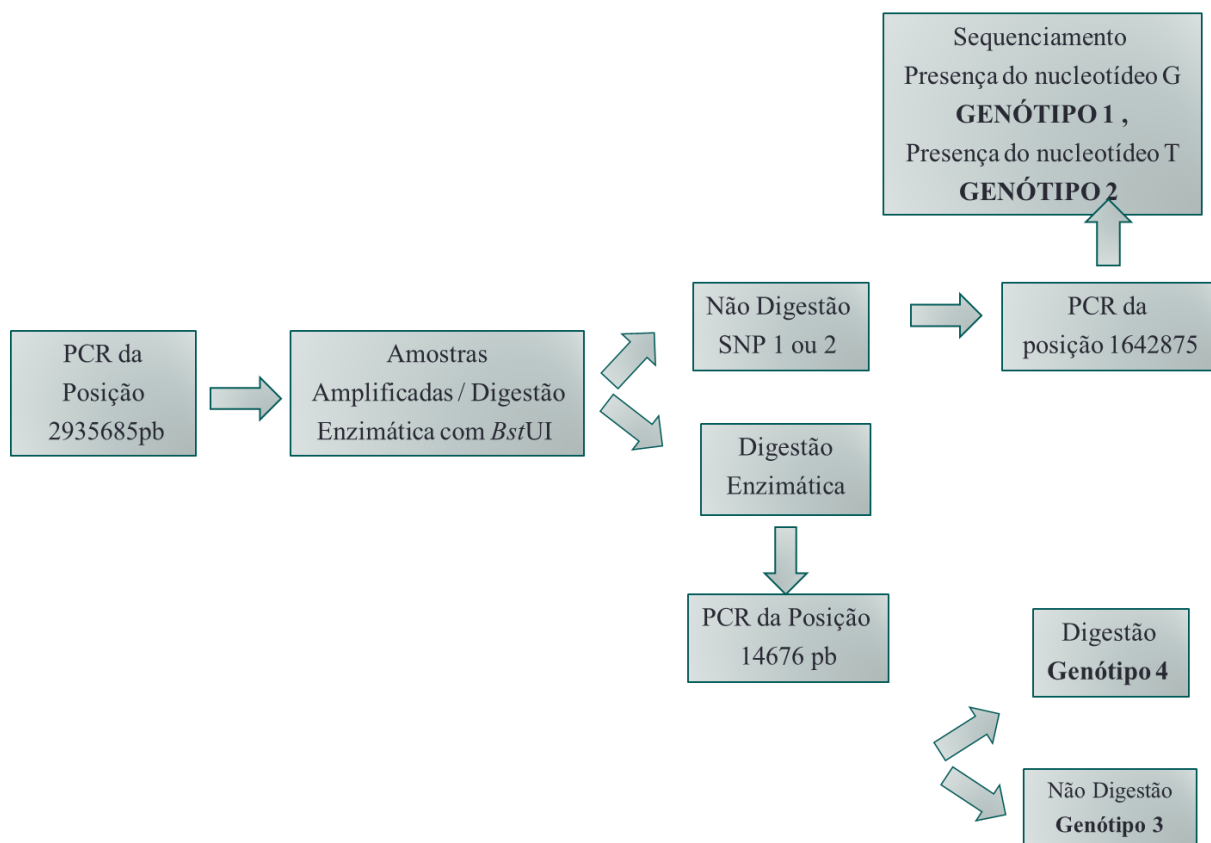


Figura 4: Esquema da amplificação por PCR e da digestão utilizando enzimas de restrição para diferenciação dos 4 genótipos de SNP de *M. leprae*.

5.2.6 Análise de resultados de Multiple loci VNTR analysis (MLVA): O número de repetições encontrado em cada locus foi tabelado em formato de tabela excel e importado no Software Bionumerics versão 7.5 (Applied Mathematics, Bélgica) por meio de um protocolo chamado de “*Open Database Connectivity*” (OBDC). Posteriormente, foram criados matrizes de similaridade, dendogramas e árvores filogenéticas utilizando índice de similaridade calculado pelo coeficiente categórico e os algoritmos “*Unweighted Pair Group Arithmetic Averages*” (UPGMA) e “*Minimum Spanning Tree*”.

5.2.7 Geoprocessamento: Os dados geográficos (endereço completo, CEP ou cidade) de cada paciente dos municípios abrangentes foram importados no software ArcMap 10.2 para a confecção dos mapas

coropléticos. Também foram realizados mapas para visualização espacial de casos, por meio do software Earth, versão 7.1.5.1557.

5.2.8 PCR para amplificação das regiões gênicas de interesse determinantes de resistência a drogas (DRDR): A reação de PCR foi preparada usando tampão 5x, MgCl₂ 25 mM fornecidos no mesmo kit da enzima Hot Start Plus Taq DNA Polimerase (Qiagen), dNTP (Invitrogen) 0,4 mM, 20 pmol de cada “primer”, 0,5 U da enzima Hot Start Plus Taq DNA Polimerase (Qiagen) e o 1,0 µl do DNA alvo. A PCR foi realizada nas seguintes condições de temperatura: desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, seguidos de 30 ciclos de 98°C por 60 segundos, 60°C por 30 segundos e 68°C por 30 segundos, finalizando com a temperatura de extensão de 68°C por 3 minutos em termociclador BioRad T100 Thermal Cycler. Como controle positivo e otimização da reação de PCR foi utilizada a cepas referência Thai-53 na concentração de 10 ng/µL. Para controle negativo foi utilizado somente a mix da reação. O produto amplificado foi visualizado em gel de agarose a 1,5%.

5.2.9 Sequenciamento dos fragmentos: Os fragmentos amplificados por PCR foram purificados utilizando o MiniElute Gel Extract Kit (Qiagen). O produto purificado foi então, submetido à reação de PCR para sequenciamento nas seguintes condições de temperatura: desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, seguidos de 30 ciclos de 98°C por 60 segundos, 60°C por 30 segundos e 68°C por 30 segundos, finalizando com a temperatura de extensão de 68°C por 3 minutos, utilizando a química Big Dye Terminator v3.3 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems). As amostras foram então purificadas por precipitação com etanol-EDTA 125 mM e sequenciadas no equipamento 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Os fragmentos sequenciados foram alinhados e analisados contra sequências referências retiradas do GeneBank, utilizando o programa Seqscape v2.6 (Applied

Biosystems) para identificação de mutações associadas à resistência.

5.3 Cálculo da Diversidade Alélica

O cálculo da diversidade alélica (h) de cada locus de MLVA-VNTR foi realizado segundo Selander e colaboradores (1986), utilizando-se a fórmula:

$$h = 1 - \sum x_i^2 [(n/n - 1)],$$

Equação 1: Cálculo da diversidade alélica onde x_i é a frequência do alelo i no locus, e n é o número de isolados.

A diversidade alélica (h) é um bom índice indireto de heterogeneidade/polimorfismo das amostras e também um bom índice de poder discriminatório fornecido pelos loci em estudo. Com base neste índice, a amostra é considerada altamente discriminatória/ polimórfica se $h \geq 0,6$; moderadamente discriminatória se $0,3 \geq h \geq 0,6$ e fracamente discriminatória se $h \leq 0,3$.

6.0 Resultados

6.1 População Estudada

O estado de São Paulo está dividido em 17 Departamentos Regionais de Saúde (DRS), que compreendem 645 municípios (figura 05).



Figura 5: Mapa da divisão dos Departamentos Regionais de Saúde do Estado de São Paulo (DRS). (Secretaria de Estado da Saúde, 2012).

Os 128 pacientes avaliados neste estudo estão distribuídos em 15 DRS, que abrangem 78 municípios (tabela 01).

Tabela 1: Distribuição dos casos de hanseníase avaliados por número de municípios segundo as DRS.

Nº da DRS	DRS	Nº de Municípios	Nº de Casos
II	Araçatuba	07	09
III	Araraquara	09	17
IV	Baixada Santista	02	02
V	Barretos	03	05
VI	Bauru	22	41
VII	Campinas	01	01
IX	Marília	07	13
X	Piracicaba	04	10
XI	Presidente Prudente	04	06
XIII	Ribeirão Preto	02	03
XIV	São João da Boa Vista	06	06
XV	São José do Rio Preto	01	01
XVI	Sorocaba	07	10
I	São Paulo	01	01
XVII	Taubaté	02	03

DRS: Departamento Regional de Saúde.

Na figura 06, podemos observar a distribuição espacial dos 128 pacientes segundo frequência de casos em cada cidade.

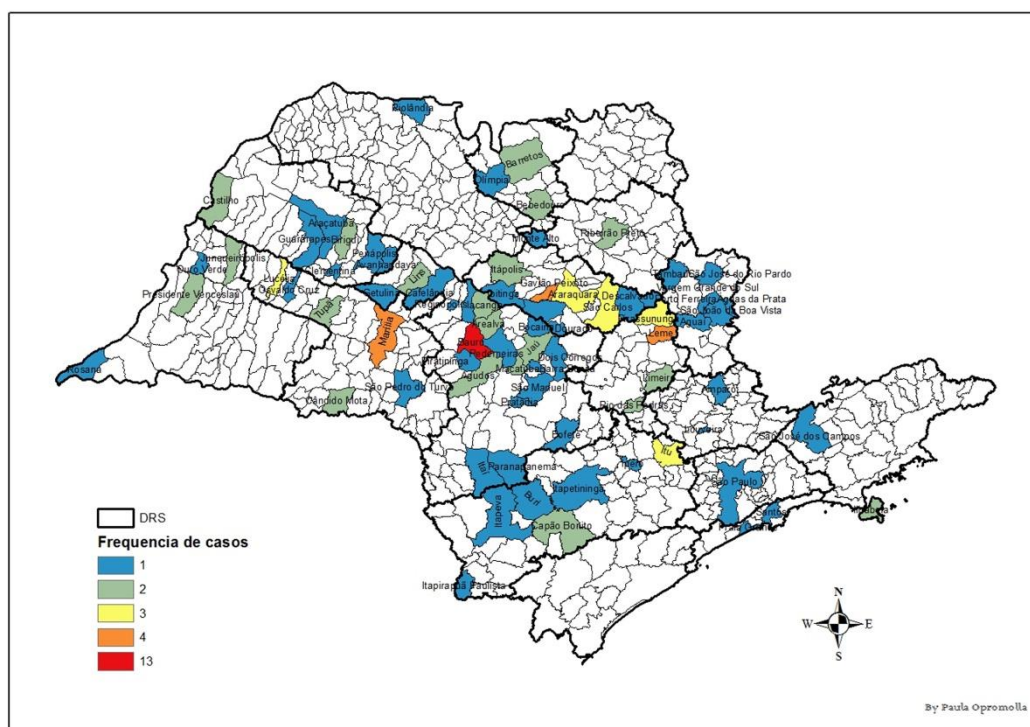


Figura 6: Mapa da distribuição espacial dos 128 casos de hanseníase do estado de São Paulo, segundo análise realizada pelo software ArcMap.

Um total de 74,2% dos pacientes são do sexo masculino e 25,8% do sexo feminino. A idade da população avaliada foi de 23 a 78 anos, com média de 51,4 anos.

Em relação à forma clínica da hanseníase nos paciente (tabela 02), a forma LL foi predominante com 49,21%, BL 28%, BB 13%, BT 4%, TT 1,5%. Em um total de 4,29% não foi possível obter a forma clínica.

Tabela 2: Número de casos e forma clínica dos pacientes de hanseníase diagnosticados no período de 2001 a 2013.

Classificação	Período de coleta (2001-2013)
LL	63
BL	36
BB	17
BT	06
TT	02
ND	04

Classificação Ridley & Jopling 1966. LL (lepromatoso-lepromatoso); BL (borderline-lepromatoso); BB (borderlineborderline); BT (borderline-tuberculóide), TT (tuberculóide-tuberculóide); ND (não determinado).

A distribuição espacial dos casos de hanseníase segundo a forma clínica da doença pode ser observada nos mapas 01, 02, 03, 04 e 05 nos anexos.

6.2 Diversidade genética do *M. leprae* no estado de São Paulo.

Dos 128 isolados de DNA de *M. leprae* submetidos à genotipagem, pela técnica de MLVA, obtivemos 95 isolados com perfil completo para 16 *VNTRs*.

Em um total de 33 isolados não foram obtidos resultados na *PCR* multiplex e/ ou sequenciamento para 1 ou mais *STRs*, sendo que 15 amostras para 1 locus, 6 amostras para 2 loci, 4 amostras para 3 loci e para 8 amostras 4 ou mais loci. O marcador com número maior de amostras sem sinal no *PCR* multiplex e/ou sequenciamento foi o locus (AT)15, portanto o mesmo foi retirado da análise.

Todos os isolados com loci incompletos foram testados em diferentes concentrações de DNA e primer, no entanto, não apresentaram sucesso na amplificação e/ou sequenciamento.

Na análise para os 16 loci *VNTRs*, observamos que 13 eram polimórficos, enquanto os loci 6-3a (1 alelo), 21-3 (1 alelo) e 23-3 (1 alelo) foram invariáveis.

O poder discriminatório dos 16 VNTRs foi determinado por “*Simpson’s Discriminatory Index*” pode ser observado na tabela abaixo.

Tabela 3: Frequência e diversidade alélica dos isolados de *M. leprae* do estado de São Paulo.

Nº de repetições	AC8B	GTA9	GGT5	AT17	63A	213	AC9	AC8A	27 5	6 7	TA18	TTC21	TA10	233	125	188
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	128	0	0	0	0	0	0	0	128	0	0
3	0	0	1	0	128	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	51
4	0	0	115	0	0	0	0	0	112	0	0	0	0	0	13	7
5	0	0	11	0	0	0	0	0	13	10	0	0	0	0	106	1
6	34	1	0	0	0	0	5	0	0	87	0	0	2	0	5	1
7	87	2	0	0	0	0	81	4	0	21	0	0	7	0	1	4
8	4	15	0	0	0	0	38	29	0	1	0	0	10	0	0	49
9	0	23	0	3	0	0	1	70	0	0	4	5	22	0	0	4
10	0	57	0	16	0	0	0	13	0	0	1	53	43	0	0	0
11	0	9	0	25	0	0	0	2	0	0	1	31	24	0	0	0
12	0	13	0	28	0	0	0	0	0	0	8	21	8	0	0	0
13	0	3	0	26	0	0	0	0	0	0	15	5	1	0	0	0
14	0	0	0	15	0	0	0	0	0	0	20	4	0	0	0	0
15	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	18	5	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	23	0	0	0	0	0
17	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	11	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Nº de amostras	125	123	127	120	128	128	125	118	126	119	120	124	117	128	126	117
Diversidade Alélica	0,44	0,72	0,17	0,82	0,00	0,00	0,49	0,57	0,20	0,43	1,02	0,72	0,77	0,00	0,28	0,44

Baseado nas DRS do estado, os marcadores que apresentaram perfis predominantes em cada região com predomínio de repetições com mais de 50%, podem ser visualizados na tabela 04.

Tabela 4: Número de repetições predominantes por VNTR, segundo as DRS

DRS	Nº de repetições predominantes											
	(Ac)8	(GTA)9	(GGT)5	(AC)9	(Ac)8a	27-5	6-6	(TA)18	(TTC)21	(TA)10	12-5	18-8
Araçatuba	7	10	4	7	7	4	6		10		5	3
Araraquara	7		4	7		4	6			9	5	8
Baixada Santista												
Barretos	7	10	4	7	7	4	6		11		5	3
Bauru	7		4	7	9	4	6		10	5		
Campinas												
Marília	7		4	7		4					5	3
Piracicaba	7	10	4	7		9	6				5	3
Presidente Prudente	7	10		9	9	4				10	5	
Ribeirão Preto	7	10		9	9	4	6	18		9	5	3
São João da Boa Vista	7	10	4	5	9	4	6		10		5	3
São José do Rio Preto												
Sorocaba	7		4	7	9	4	6		10		5	8
São Paulo												
Taubaté	7	9	4	8	7	4	6			8		8

DRS- Departamento Regional de Saúde

6.3 Análise da distribuição espacial dos genótipos de *M. leprae*

A partir da definição da frequência alélica dos 128 isolados nos observamos algumas características para os loci 12-5. (Fig 07) e 18-8 (Fig. 09).

O locus 12-5 apresentou 5 isolados com 6 repetições, sendo 1 isolado na cidade de Ouro verde (DRS Presidente Prudente), 2 isolados em Castilho (DRS Araçatuba) e 1 isolados em Leme (DRS Piracicaba); 1 isolado apresentou 7 repetições em Boa Esperança do Sul (DRS Araraquara) e 1 isolado com perfil duplo de 5-7 repetições em Capão Bonito (DRS Sorocaba)

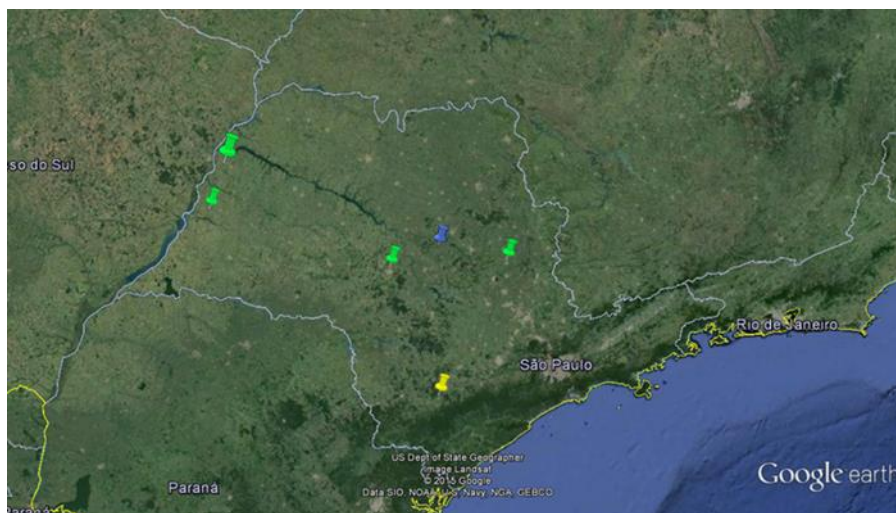


Figura 7: Mapa da distribuição espacial dos isolados de *M. leprae* com repetição 6, 7 e 5-7 para o VNTR 12-5, distribuídos pelas cidades de Castilho, Ouro Verde, Bauru, Boa esperança do Sul, Leme e Capão Bonito.

Repetição 6 ● Repetição 7 ● Repetição 5-7 ●

Destacamos que os perfis com 6 cópias pertencem aos isolados de *M. leprae* de 2 pacientes residentes na cidade de Castilho, cuja distância entre as casas é de 600 metros. Os dados podem ser observados em detalhes na tabela 05 e no mapa abaixo (Figura 08).

Figura 8: Distribuição espacial dos genótipos com 6 repetições para 12-5 na cidade de Castilho-SP.



Tabela 5: Perfil genético dos isolados de *M. leprae* com repetições 6, 7 e 5-7 para o STR 12-5.

ID	(AC)8b	(GTA)9	(GGT)5	(AT)17	6-3a	21-3	(AC)9	(AC)8a	27-5	6-7	(TA)18	(TTC)21	(TA)10	23-3	12-5	18-8	PROCEDÊNCIA	R&J
SP52	6	10	4	12	3	2	7	9	4		15	11	9	2	5-7	8	CAPÃO BONITO	LL
SP54	7	10	4	11	3	2	7	9	4	7	13	12	10	2	7	8	BOA ESPERANÇA DO SUL	BB
SP56	6	10	4	11	3	2	7	8	4	6	15	10	12	2	6	3	LEME	BL
SP79	7	12	4	12	3	2	7	10	4	6	15	10	10	2	6	7	OURO VERDE	LL
SP88	7	10	4	13	3	2	7	9	4	6	14	13	10	2	6		CASTILHO	BB
SP106	6	10	4	11	3	2	8		4					2	6		CASTILHO	TT
SP103	6	11	4		3	2	7	10	4	6	16	10	10	2	6	3	BAURU	LL

Relação dos pacientes que apresentaram repetições 5-7, 6 e 7 cópias para o STR 12-5; ID-identificação da amostra.

Outra observação neste estudo foi para o loci 18-8 com 4 isolados de 9 repetições. Dois destes isolados (SP 108 e 122) são procedentes da cidade de Itu (DRS Sorocaba), diagnosticados no ano de 2006 e residentes no Hospital Dr. Francisco Ribeiro Arantes. O paciente SP122 foi diagnosticado pela primeira vez no ano de 1987 (tabela 06).

Os outros 2 pacientes (SP120 e SP109) são residentes das cidades de Bauru e Itápolis, que tem 106 km de distância uma da outra. Ambos os pacientes foram diagnosticados no ano de 2006 e apresentam variação genética em 3 loci mais polimórficos. O perfil genético desses isolados e a distribuição espacial podem ser observados na tabela e imagem abaixo (tabela 06) e (figura 09).

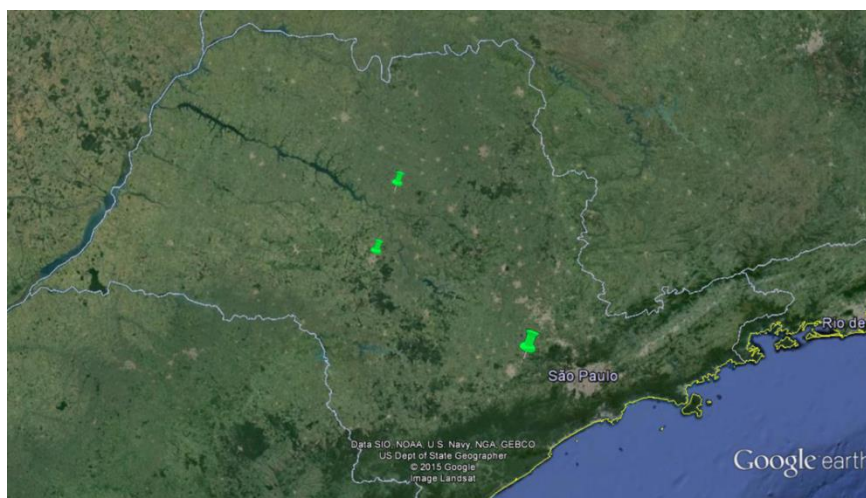


Figura 9: mapa da distribuição espacial dos isolados com 9 cópias para 18-8. O marcador maior indica 2 casos.

Tabela 06: Perfil genético dos isolados de *M. leprae* com 9 cópias para o locus18-8.

ID	(AC)8b	(GTA)9	(GGT)5	(AT)17	6-3a	21-3	(AC)9	(AC)8a	27-5	6-7	(TA)18	(TTC)21	(TA)10	23-3	12-5	18-8	DRS
SP120	7	9	4	10	3	2	8	9	4	6	21	14	7	2	5	9	BAURU
SP108	7	9	4	10	3	2	8	9	4	6	21	11	7	2	5	9	SOROCABA
SP122	7	10	4	9	3	2	8	9	4	6	14	12	12	2	5	9	SOROCABA
SP109	7	9	4	10	3	2	8	9	4	6	15	11	10	2	5	9	ARARAQUARA

DRS- Departamento Regional de Saúde; ID- identificação da amostra .

Outro ponto observado, foi para a cidade de Gavião Peixoto (DRS Araraquara) que apresentou 4 casos, (SP50, SP61, SP86 e SP95), sendo que 2 casos (SP61 e SP95) residem a 30 metros de distância um do outro e os outros 2 casos (SP50 e SP86), residem a 600 metros. Apesar de serem observadas diferenças de 3 a 4 repetições nos loci mais variáveis (AC8A,AT17, TA18, TTC21 e TA10), os outros marcadores apresentaram nenhuma ou pequenas variações de 1 repetição (tabela 07). A distribuição espacial desses isolados pode ser observada na figura abaixo (figura 10).

Tabela 07: Perfil genético dos isolados de *M. leprae* de Gavião Peixoto.

ID	R&J	(AC)8b	(GTA)9	(GGT)5	(AT)17	6-3a	21-3	(AC)9	(AC)8a	27-5	6-7	(TA)18	(TTC)21	(TA)10	23-3	12-5	18-8	DRS
SP50	LL	6	8	4	11	3	2	7	8	4	7	13	10	9	2	5	8	ARARAQUARA
SP61	LL	7	8	4	15	3	2	7	7	4	6	12	12	11	2	5	8	ARARAQUARA
SP86	BL	7	12	4	13	3	2	7	10	4	6	22	11		2	5	3	ARARAQUARA
SP95	BT	6	8	4	11	3	2	7	9	4	6		10	8	2	5	3	ARARAQUARA

DRS- Departamento Regional de Saúde; ID- identificação da amostra.



Figura 10: Distribuição espacial dos isolados de *Mycobacterium leprae* na cidade de Gavião Peixoto.

6.4 Multicasos Familiar.

Nesse estudo, observamos e analisamos 2 possíveis famílias multicasos, que chamamos família 1 e família 2 (tabela 08 e 09).

Os pacientes da família 1 (SP19, SP116 e SP123) são formados por pai, mãe e filha. Os dados de prontuário estão relatados que os pais são residentes da cidade de São Carlos (DRS Araraquara) e a filha reside em Jaú (DRS Bauru).

Os dados de prontuário relatam que o pai finalizou o tratamento com PQT-MB pela primeira vez em 1997 e em 2004 foi novamente diagnosticado, iniciando um segundo tratamento com PQT-MB. A mãe foi diagnosticada também no ano de 2004 e a filha em 2006. Na tabela abaixo (tabela 08) podemos observar o perfil genético da família, sendo o SP19: pai, SP116: mãe e SP123: filha.

Tabela 08: Perfil genético dos isolados de *M. leprae* da família 01

ID	AC)8I	(GTA)9	(GGT)5	(AT)17	6-3a	21-3	(AC)9	(AC)8a	27-5	6-7	TA)11	(TTC)21	(TA)10	23-3	12-5	18-8	DRS
SP19	7	9	4	14	3	2	7	9	4	6	14	10	11	2	5	8	ARARAQUARA
SP116	7	9	4	14	3	2	8	9	4	6	14	10	11	2	5	8	ARARAQUARA
SP123	7	9	4	13	3	2	8	9	4	6	13	10	11	2	5	8	BAURU

DRS- Departamento Regional de Saúde; ID- identificação da amostra.

Quando observamos a tabela 08 encontramos alta similaridade entre os genótipos da família 1 e identificamos repetições idênticas para a maioria dos loci. Diferenças alélicas de 1 repetição foram verificadas somente nos loci AT17, (AC)9 e TA18, sendo que os ATs e TAs foram extremamente variáveis nessa população.

A família 2 (SP50 E SP95) é formada por pacientes residentes na cidade de Gavião Peixoto e é composta por 2 irmãos diagnosticados nos anos de 2009 e 2012. Estes pacientes residem em casas diferentes, sendo a distância entre elas de 400 metros. Os isolados destes pacientes apresentaram perfis genéticos com 80% de similaridade, apresentando diferenças em 4 VNTRS, Ac8a 6-7,TA10 e 18-8, não conseguimos amplificação e/ ou sequenciamento para o VNTR TA18.

Tabela 09: Perfil genético dos isolados de *M. leprae* da família 2.

ID	R&J	(AC)8b	(GTA)9	(GGT)5	(AT)17	6-3a	21-3	(AC)9	(AC)8a	27-5	6-7	(TA)18	(TTC)21	(TA)10	23-3	12-5	18-8	DRS
SP50	LL	6	8	4	11	3	2	7	8	4	7	13	10	9	2	5	8	ARARAQUARA
SP95	BT	6	8	4	11	3	2	7	9	4	6		10	8	2	5	3	ARARAQUARA

DRS- Departamento Regional de Saúde; ID- identificação da amostra; RJ – Escala Ridley & Jopling

6.5 Análise de SNP

Todos os isolados foram submetidos à metodologia de PCR-RFLP para diferenciação dos 4 tipos de SNP.

Quando analisamos os genótipos de SNP dos 128 isolados de *M. leprae* nesta população, observamos em 112 (97%) isolados o predomínio do genótipo

3 e em 4 (3%) o genótipo 2. Em 12 isolados das 128 amostras analisadas não obtivemos sucesso na amplificação, portanto, não foi possível determinar os genótipos.

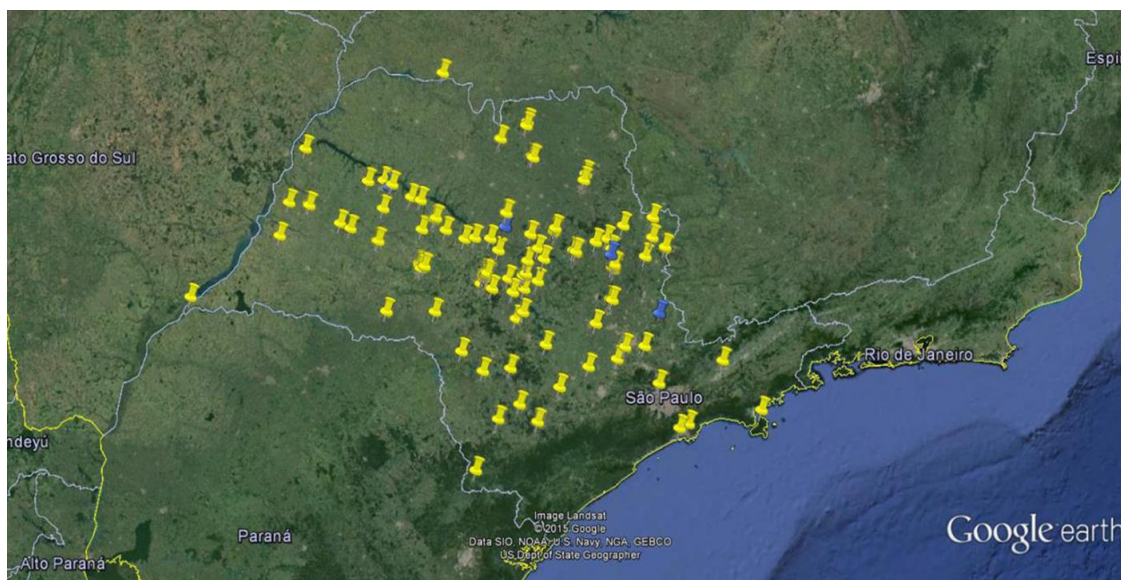


Figura 11: Distribuição espacial dos 116 isolados de *M. leprae* no estado de São Paulo, segundo o genótipo de SNP.

Foram observados ainda, que um total de 21% (n= 24) dos casos são de pacientes naturais de outros estados como: Minas Gerais (n=9), Paraná (n=8), Rio de Janeiro (n=2), Goiás (n=1), Alagoas (=1) Ceará (=1), Pará (n=1) e Mato Grosso do Sul (n=1).

Quando realizamos a PCR para amplificação dos SNPs de resistência a drogas, verificamos que 4 (3.91%) apresentaram resistência a dapsona e 1 (0.78%) foi multidroga resistente para dapsona e rifampicina. Esses dados podem ser observados na tabela abaixo.

Tabela 10: Isolados de *M. leprae* que apresentaram resistência a drogas na população estudada.

Isolado	Mutação	
	<i>FolP</i>	<i>rpoB</i>
	Codon 55	Codon 456
SP11	CCC-C <u>G</u> C (Pro-Arg)	
<u>SP15</u>	<u>CCC-CGC (Pro-Arg)</u>	<u>TCG-TTG (Ser-Leu)</u>
SP30	CCC-C <u>G</u> C (Pro-Arg)	
SP84	CCC-C <u>T</u> C (Pro-Leu)	
SP107	CCC-C <u>T</u> C (Pro-Leu)	

Pro (prolina); Arg (arginina); Leu (leucina); Ser (serina).

Este grupo de isolados que apresentaram perfil de resistência a drogas também foi avaliado para os 16 *VNTRs* e *SNP* de origem geográfica, e pode ser observado na tabela 11. Apesar de terem muito loci em comum, nenhuma ligação epidemiológica foi observada. No entanto, 2 destes isolados (SP15 e SP30) pertencem a cidade de Pirajuí e Macatuba (ambas da DRS Bauru) e os outros 3 isolados são das cidades de Itapirapuã Paulista (DRS Sorocaba), Monte Alto (DRS Ribeirão Preto) e São Paulo (DRS São Paulo).

Tabela 11: Perfil genético para 16 VNTRs dos isolados de *M.leprae* com resistência a drogas.

ID	(AC)8b	(GTA)9	(GGT)5	(AT)17	6-3a	21-3	(AC)9	(AC)8a	27-5	6-7	(TA)18	(TTC)21	(TA)10	23-3	12-5	18-8	SNP	DRS
SP11	8	10	4	13	3	2	8	9	4	6	9	10	9	2	4	3	3	SOROCABA
SP15	6	12	4		3	2	8		4	6	12	10	9	2	5		NI	BAURU
SP30	7	10	4	13	3	2	7	8	4	5	12	9	11	2	5		3	BAURU
SP84	7	9			3	2	7	8	5	6	18		9	2		3	NI	RIBEIRÃO PRETO
SP107	8	10	4	15	3	2	6	8	4	6	9	14	8	2	4	3	3	SÃO PAULO

DRS- Departamento Regional de Saúde; ID- identificação da amostra.

6.6 Estrutura Populacional e filogenia

As análises de estrutura populacional e filogenia deste estudo foram construídas com base nos 128 isolados avaliados para os 16 *VNTRs*. Usamos como critério de análise os Departamentos Regionais de Saúde (DRS) da divisão administrativa da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Assim, a distribuição dos genótipos obtidos a partir dos isolados de *M. leprae*, foi avaliada mediante a região de origem de cada paciente.

Inicialmente foi gerado um dendograma com base em 16 *VNTRs*, mas em virtude do alto de polimorfismo dos locis AT17 e TA18, observamos um distanciamento entre os isolados de um mesmo grupo. Assim, optamos pela exclusão desses dois loci e mantivemos os demais que ainda forneciam uma análise fiel da população estudada.

Nessa nova análise com 14 *VNTRs*, a árvore baseada no UPGMA demonstrou a existência de 2 grandes grupos e esta separação observada parece ser conduzida principalmente pelo VNTR 18-8, apresentando a segunda população com 6-9 repetições.

A análise excluindo os *VNTRs* AT17 e TA18, resultou na formação de 07 *clusters* formados por 2 ou mais isolados, que estão distribuídos nos 2 grupos mencionados, que chamaremos de população 1 e 2.

A população 1 tem 66 isolados e é composta por 02 *clusters* de 2

isolados, enquanto que a população 2 esta formada por 62 isolados com 5 *clusters* com 2 a 04 isolados. A taxa de agrupamento observada foi de 0,7. Observamos abaixo o dendograma identificando as 2 populações.

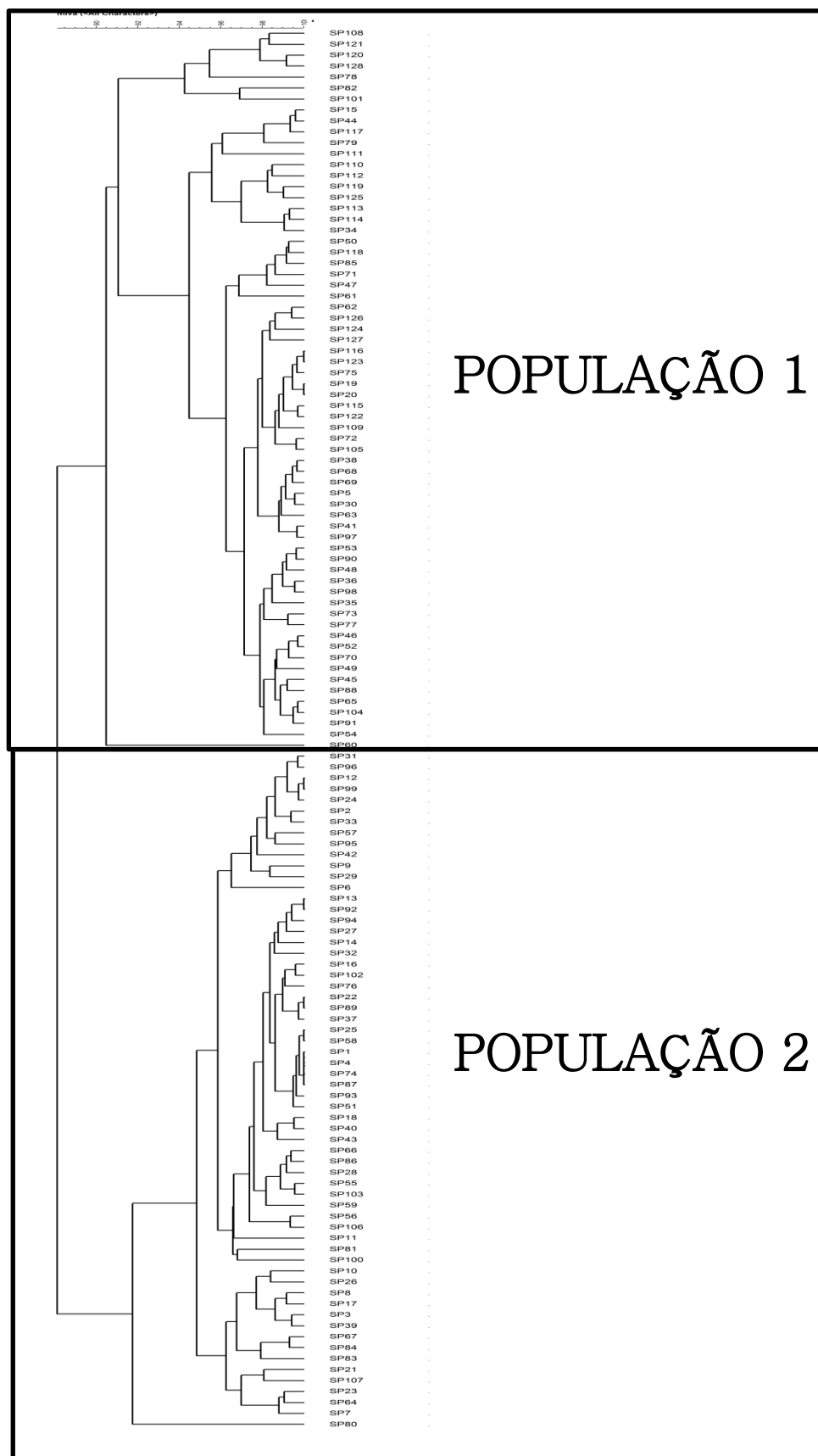


Figura 12: UPGMA gerado por 14 VNTRS para os 128 isolados de *M. leprae* do estado de São Paulo.

A seguir realizamos as análises para definição das relações genéticas de similaridade e ancestralidade entre os isolados, com 95 perfis completos e 128 perfis incompletos para os 16 *VNTRs*. Essa análise foi realizada por meio do algoritmo “*Minimum Spanning Tree*” (*MST*).

A estrutura populacional não apresentou diferença quando comparamos os resultados para os grupos de isolados com perfis completos e incompletos, então optamos em seguir as análises com o painel de 128 isolados.

Na análise realizada com 16 *VNTRs* notamos a formação de 2 grupos mostrando que os isolados das DRS de Bauru e Araraquara estão estreitamente relacionados com as demais DRS. A *MST* pode ser visualizada na figura 13 abaixo.

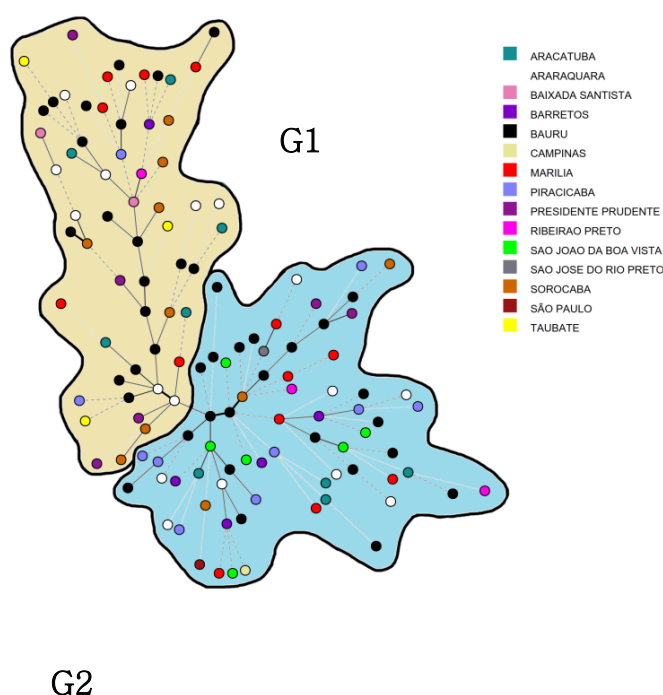


Figura 13: Árvore de Minimum Spanning Tree utilizando 16STRs com base em 128 perfis completos e incompletos de *M. leprae* distribuídos pelas 15 DRS do Estado de São Paulo.

Para melhor entender esta relação, optamos por realizar outra análise excluindo os *locis* AT17 e o TA18, que foram os dois marcadores mais polimórficos nesse painel.

Nesta análise, descrevemos a seguir a formação de 3 grupos que pode ser visto na Figura 14.

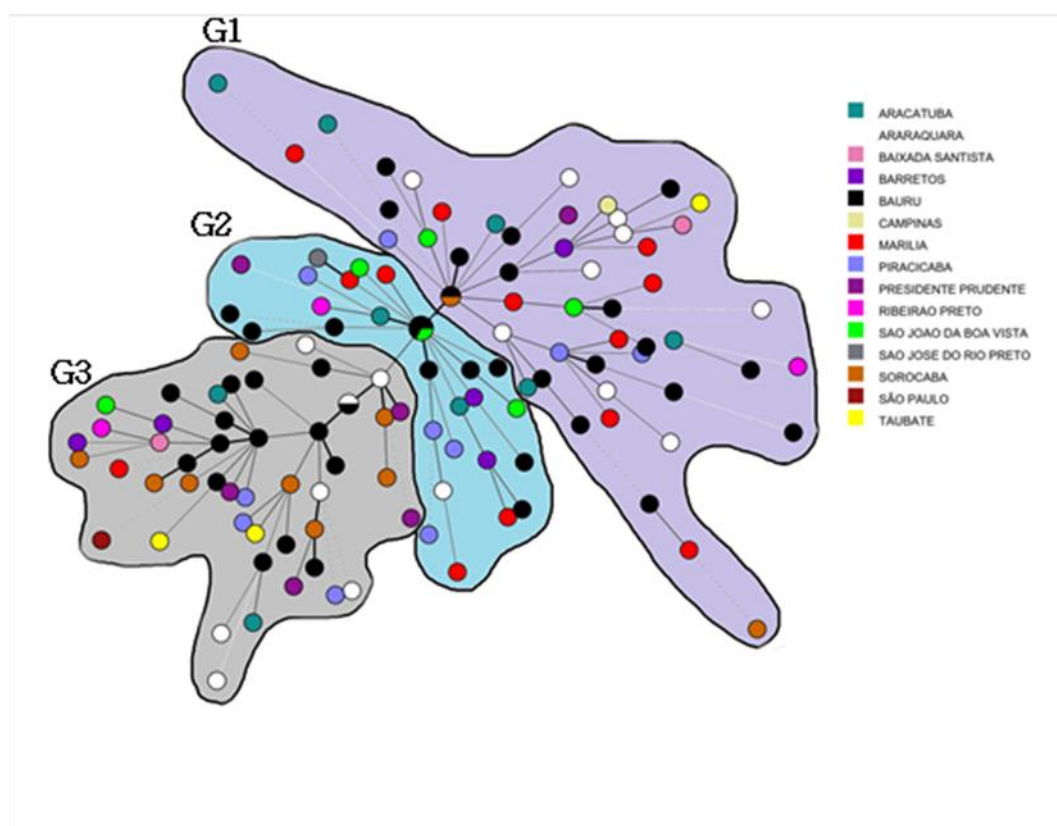


Figura 14: Árvore de Minimum Spanning Tree utilizando 14STRs (excluídos AT17 e TA18), com base em 128 perfis completos e incompletos de *M. leprae* distribuídos pelas 15 DRS do Estado de São Paulo.

Consideramos o grupo 1 a partir de um *cluster* formado por dois isolados de Capão Bonito (DRS Sorocaba) e de Pederneiras (DRS Bauru), que foram diagnosticados em 2007 e 2009 respectivamente. Esse *cluster*

apresenta uma forte conexão com outros isolados da DRS de Bauru, Marília, Araraquara, apresentando também estreita relação com o *cluster* do grupo 2.

O grupo 2 é formado por um *cluster* com 3 isolados, sendo Cafelândia e São Manuel (DRS Bauru), o outro isolado pertence a cidade de São José do Rio Pardo (DRS São João da Boa Vista). Os municípios de São José do Rio Pardo e São Manuel estão a 351 km de distância e 158 km entre São Manuel e Cafelândia. Importante destacar que isolados de outras DRS estão de certa forma ligados a esse *cluster*. Nenhuma ligação epidemiológica pode ser recuperada das informações de prontuários.

Quanto ao grupo 3, evidenciamos também a presença de um único *cluster* que é formado por 2 isolados, um de São Carlos (DRS Araraquara) e um de Jaú (DRS Bauru). O isolado de Bauru foi diagnosticado no ano de 2006 e o de Araraquara em 2004. Esses isolados pertencem a um multicaso familiar, estes isolados deste cluster estão altamente conectados com outro isolado de São Carlos (DRS Araraquara).

Este grupo também apresentou 2 subgrupos de isolados com conexão forte. O primeiro subgrupo que está demarcado com um círculo vermelho, pertence aos isolados (SP 108, 109 e 120) que apresentam 9 cópias para o *locus* 18-8. O Segundo subgrupo é formado por 5 isolados pertencentes as DRS Sorocaba e Bauru, sendo um dos isolados de Sorocaba, residente do Hospital Dr. Francisco Ribeiro Arantes (antigo asilo colônia), e está marcado em azul. A *MST* pode ser vista abaixo na figura 15.

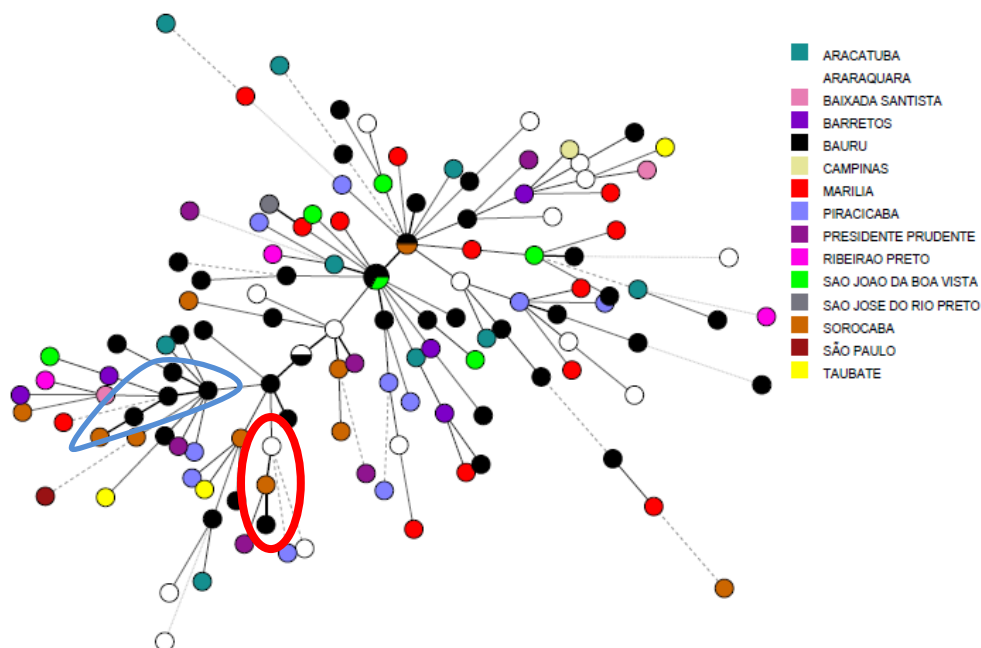


Figura 15: Árvore de Minimum Spanning Tree utilizando 14STRs (excluídos AT17 e TA18) com base em 128 perfis completos e incompletos de *M. leprae* distribuídos pelas 15 DRS do Estado de São Paulo.

Finalmente realizamos duas análises a fim de comparar os genótipos desse painel com os isolados das populações de São Paulo, do município de Rondonópolis (MT), Pernambuco, Rondônia, Ceará e Rio de Janeiro.

Geramos um MST com 414 genótipos com perfis completos para 15 *VNTRs*, nessa análise foram excluídos os *VNTRs* 6-3a e AT15.

Observamos uma estrutura formada por 3 populações, sendo que a maior população é composta por amostras apenas de cidades do estado de São Paulo e do município de Rondonópolis, com a formação de um pequeno cluster. A segunda população é prioritariamente formada por genótipos do Rio de

Janeiro, Ceará, Pernambuco e Rondônia. E a terceira população esta composta principalmente por São Paulo, Rio de Janeiro e Rondônia. Nesta análise notamos que as amostras de Rondonópolis (MT) apresentam estreita relação com as amostras de São Paulo, assim como as amostras de Ceará estão agrupadas em uma única população. A MST pode ser vista na figura 16 abaixo.

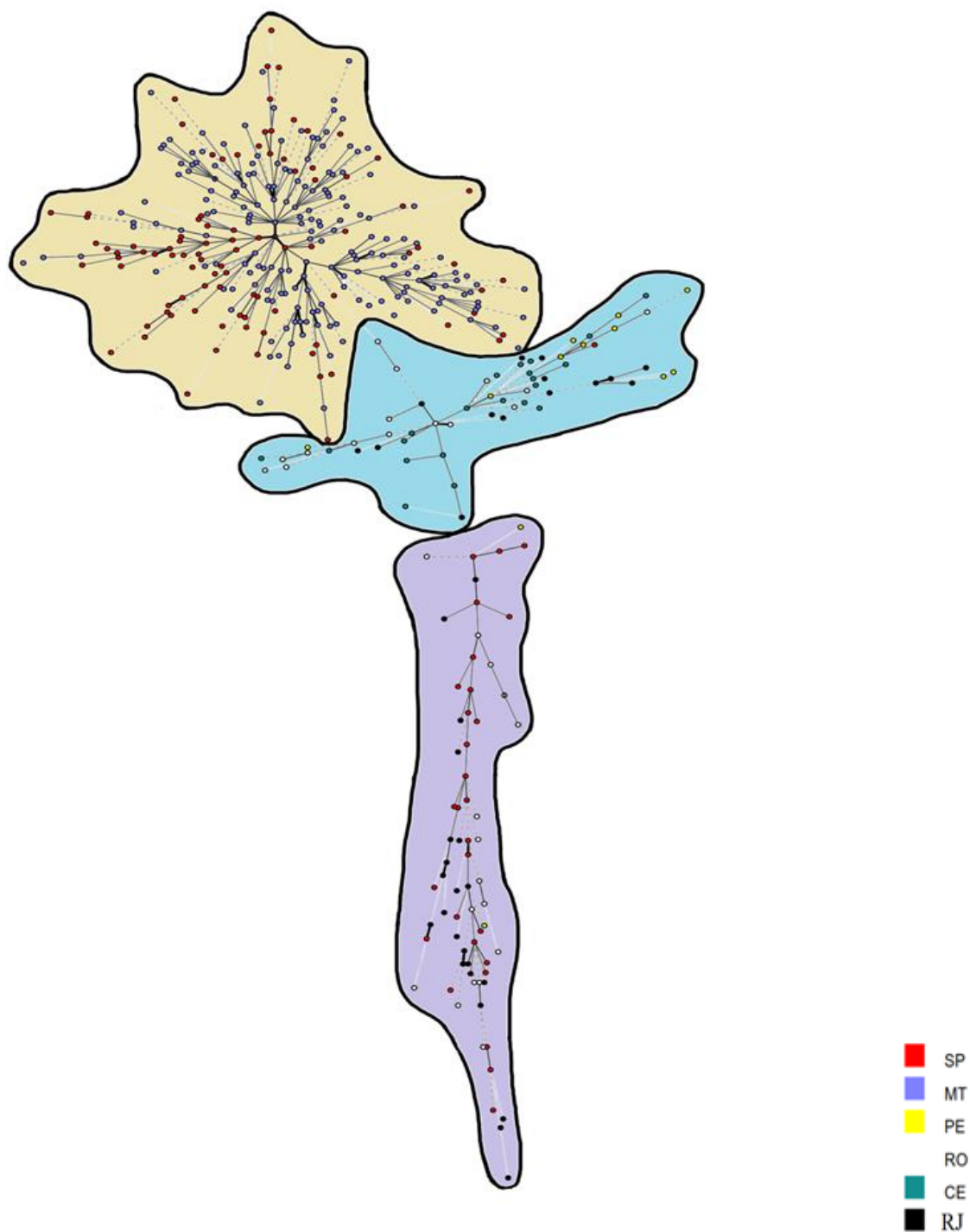


Figura 16: Árvore de Minimum Spanning Tree utilizando 14STRs (excluídos AT15 e 6-3a) com base em 414 perfis completos de *M. leprae* do Estado de São Paulo, Mato Grosso, Pernambuco, Rondônia, Ceará e Rio de Janeiro.

7.0 Discussão

Discussão

O Estado de São Paulo atingiu em janeiro de 2005 a meta de eliminação da hanseníase proposta pela OMS, ou seja, menos de um caso por grupo de 10 mil habitantes. Naquele ano foram registrados no Estado 3.196 casos, o equivalente ao coeficiente de prevalência de 0,78/10.000hab. No nível regional vários Departamentos Regionais de Saúde (DRS) ainda mantêm coeficientes de prevalência acima da meta ⁸¹.

Com a implantação da Poliquimioterapia (PQT/OMS) em 1991, as taxas de detecção no estado começaram a diminuir mais nitidamente a partir de 2001, e em 2010 a detecção foi considerada de média intensidade com 1.754 casos ⁸¹.

A descentralização do diagnóstico e o manejo de complicações, incluindo o tratamento e a reabilitação de incapacidades constituem atualmente os eixos norteadores no enfrentamento e controle da doença. No entanto, um número considerável de municípios em São Paulo mantém a cadeia de transmissão da doença. Em 2007, foram detectados 2.044 casos novos de hanseníase, com um coeficiente de detecção de 0,49 por 10.000 habitantes, sendo 83 casos em menores de 15 anos (0,8 por 10.000 habitantes) ²⁰.

A média de idade (51,4 anos) encontrada nesse estudo condiz com os relatos da literatura e com relação ao sexo a hanseníase incidiu em maior proporção em homens. Embora nos últimos anos a diferença entre sexos tenha diminuído como relatado em vários estudos realizados no Brasil, as mulheres têm sido diagnosticadas em plena fase de reprodução e ativas para o trabalho. ⁸².

Com referência as formas clínicas, houve um predomínio das formas multibacilares e com um enfoque epidemiológico segundo Oliveira (1990), isto pode estar relacionado a um indicativo de estabilização da endemia ou tendendo a uma situação de baixa prevalência. No entanto, isso

poderia ser um sinal de que o diagnóstico teria ocorrido tardiamente, mantendo a cadeia de transmissão da doença, já que estas são consideradas as principais fontes de infecção da hanseníase ⁸³.

O estado de São Paulo está dividido em 17 Departamentos Regionais de Saúde (DRS), que compreendem 645 municípios. Este estudo incluiu casos de 15 DRS, exceto das DRS de Registro e Franca, sendo que as DRS de Araraquara, Bauru, Marília, Piracicaba e Sorocaba correspondem a 71% dos casos avaliados neste estudo. Os outros 29% representam Araçatuba, Presidente Prudente, São João da Boa Vista, Barretos, Taubaté, Ribeirão Preto, Baixada Santista, São José do Rio Preto, Campinas e São Paulo.

As regiões que apresentaram maior número de casos neste estudo apresentam alguns dados históricos que corroboram com a história da disseminação da hanseníase no estado de São Paulo que ocorreu a partir do final do século XVIII, como relatado a seguir ^{59,60}.

A região de Bauru nas primeiras décadas do século XX recebeu imigrantes de toda parte, especialmente, italianos, espanhóis, portugueses e japoneses. Por volta de 1910, Bauru sediava um dos mais importantes entroncamentos ferroviários do país. Assim na primeira metade do século XX, essa região tornou-se um dos principais polos econômico do estado ⁸⁴.

Araraquara e Piracicaba avançaram durante a cultura do café, que se intensificou a partir de 1850. Esse evento resultou na migração de fazendeiros da região de Piracicaba, Itu, Porto Feliz e Minas Gerais para essas regiões. A região de Marília teve sua fundação no decorrer do desenvolvimento da estrada de ferro, também teve sua economia inicial baseada no café e atualmente apresenta-se como um forte polo econômico na indústria alimentícia ^{85,86}.

Quanto à região de Sorocaba, os primeiros migrantes a chegarem a esta região foram os bandeirantes. A estrada de ferro Sorocabana foi um importante fator no desenvolvimento industrial da região, sendo que na época,

essa região foi o eixo econômico entre as regiões norte e sul do Brasil. Essas informações quanto à formação econômica das principais DRS envolvidas no estudo nos mostra e permite estipular a influência das migrações, na disseminação e trajeto da hanseníase no estado de São Paulo⁸⁷.

Em decorrência do longo período de incubação da hanseníase, até hoje existe uma dificuldade no entendimento da dinâmica de sua transmissão. Neste estudo observamos que um total de 21% dos casos são natural de outros estados como: Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro Goiás, Alagoas Ceará, Pará e Mato Grosso do Sul, chamando a atenção para uma possível migração de pacientes em estado subclínico da doença ou até mesmo doentes para o estado São Paulo. Monot et. al 2005¹⁵ demonstraram que os fluxos migratórios foram responsáveis por disseminar a doença pelo mundo. No entanto, não temos informação do período de residência destes pacientes para confirmação.

A impossibilidade de cultivo de *M. leprae* em meio de cultura *axênico* dificulta a obtenção do DNA, ocasionando maiores obstáculos com relação aos estudos que buscam as fontes de infecção e a relação dos genótipos identificados definidos por um painel de *VNTRs*^{75,76,77}.

Submetemos um painel de isolados de *M. leprae* à amplificação em um conjunto de *VNTRs* e subsequente sequenciamento de fragmentos, cujo potencial para genotipagem, foram demonstrados em outros estudos. Aliados aos dados epidemiológicos fornecem evidências para a discriminação de genótipos predominantes e sua distribuição, para a identificação de *cluster* e entendimento da dinâmica de transmissão da doença^{75,76,81,82}.

Nesse estudo, avaliamos a variabilidade genética de isolados de *M. leprae* na população do estado de São Paulo, utilizando microssatélites e minissatélites.

Em relação ao índice de discriminação alélica (*HGDI*) de cada *VNTR*, observamos que a maioria apresentou alta taxa de diversidade alélica, sendo 5

locis com a taxas de diversidade alélica média e 5 com pouca ou nenhuma. Estes valores são similares aos encontrados por Fontes et al 2009, em um estudo também conduzido no Brasil ⁷⁷.

O primeiro VNTR com potencial para diferenciar isolados de *M. leprae* foi descrito por Matsuoka e Col., e trata-se de uma sequência repetitiva de 6 pares de base(6-3a) localizada em região intergênica do genoma. Os isolados do Japão, Brasil, Peru e Paraguai apresentaram 3 repetições, enquanto isolados da principal ilha do Japão (Okinawa), Coreia e México apresentaram 4 repetições ⁶⁶. Os isolados analisados para este marcador na população de São Paulo, foi de 3 repetições corroborando os achados já publicados ^{66,77}. A pouca variabilidade desta sequência, favorece seu uso como um marcador filogenético, sendo assim capaz de avaliar mudanças mais lentas de genótipo e acompanhar a possível propagação mundial da hanseníase ^{16,72}.

A sequência TTC, foi o segundo VNTR a ser descrito isoladamente. Localizado em pseudogenes, trata-se de um marcador altamente polimórfico que apresentou variação de 8 a 29 repetições nos isolados avaliados ⁶⁷. Nesse estudo, a repetição TTC apresentou uma diversidade alélica de 0,72 e uma variação de 9 a 15 cópias, com predominância do perfil de 10 e 11 cópias.

O desenvolvimento de uma *PCR Multiplex* com *primers* marcados com fluorescência para amplificar 17 VNTRs em 4 combinações, tem permitido que isolados de áreas com alta e baixa prevalência da hanseníase sejam diferenciados ⁷³.

Em nosso estudo utilizamos 16 VNTRs para caracterização dos perfis genéticos de isolados de *M. leprae*, pois optamos pela exclusão do locus AT15 da análise em razão da dificuldade de amplificação na *PCR*. A mesma dificuldade foi descrita por Monot et. Al 2008, que mesmo clonando algumas amostras antes do sequenciamento, não conseguiram estabelecer o número exato de repetições. Especula-se que isso aconteça com amostras com mais de 25 repetições ⁸⁸.

Os *locis* 6-3a, 21-3 e 23-3 foram invariáveis nessa população, apresentando 3, 2 e 2 cópias respectivamente. O *locus* 21-3 apresentou 2 repetições para outras populações brasileiras, como Rio de Janeiro, São Paulo, Ceará e Pernambuco e o *locus* 23-3 na maioria dos isolados brasileiros, e também na população de Cebu, Filipinas, Colômbia, Índia e China também apresentou 2 repetições^{17,18,75,77,79,80}.

Neste estudo os *locis* GGT5 e 27-5 apresentaram 4 repetições, concordando com os dados já descritos para Colômbia e China que também demonstraram esse mesmo alelo. Quando olhamos as associações dos marcadores, GGT5 e 21-3 notamos que 89% dos isolados deste estudo apresentaram repetições 4-2. Também observamos a relação de 4-5 repetições para os *locus* 27-5 e 12-5 em 75% dos isolados.

Para o *locus* 12-5 observamos o predomínio do perfil 5 (106/82%) seguido de 4, 6 e 7 repetições respectivamente. Isolados com 6 repetições também foram encontrados em estudos conduzidos na Colômbia e Cebu.^{17, 77} Destacamos nesse estudo o encontro de alelos duplos (repetições 5 e 7) para o *locus* 12-5 em 0.07% % das amostras analisadas. Essas amostras foram repetidas, utilizando alíquotas diferentes de DNA e o perfil foi confirmado. Sugerimos a possibilidade de infecção mista ou de um evento de duplicação que vem ocorrendo há longo tempo e isso que deverá ser confirmado em sequenciamento total do genoma destas amostras.

A caracterização dos isolados de *M.leprae* nesse painel nos forneceram algumas evidências para a realização de uma análise da distribuição espacial dos genótipos no estado de São Paulo, particularmente para os *loci* 12-5 e 18-8.

Com relação ao *loci* 12-5, dentre os 5 isolados com perfil de 6 repetições, destacamos que 2 destes são de pacientes natural do estado de Minas Gerais, residentes na cidade de Castilho e as residências tem distância de 600 metros uma da outra. Não foi possível pela análise dos prontuários

determinarmos algum tipo de relação epidemiológica, porém mesmo com o perfil genético incompleto para 6 dos 16 VNTRs, esse dado pode ser sugestivo de cadeia de transmissão recente da doença, uma vez que o paciente SP88 adoeceu em 2012 e o SP106 em 2013. . Somente em 1 isolado não foi possível caracterizar o perfil genético para 6 *loci*, fato que pode estar relacionado a forma paucibacilar da amostra, dificultando a amplificação de alguns VNTRs.

Em relação aos isolados que apresentaram perfil duplo de 5-7 repetições e 7 repetições, nenhuma relação epidemiológica entre eles foi encontrada. O isolado com perfil duplo é residente e natural da cidade de Capão Bonito e adoeceu em 2009 e o paciente que possui o perfil de 7 repetições é residente de Boa Esperança do Sul, com adoecimento também em 2009.

Em relação ao *locus* 18-8, nosso painel apresentou um equilíbrio entre as repetições 3 e 8. Na população brasileira, a repetição 3 foi descrita nos estados de Rondônia e Ceará⁸⁹ e em amostras do estado de São Paulo⁷⁶ Pernambuco, mostrou-se diferente do restante da população brasileira, com predomínio de 4 repetições⁸⁹ e o perfil com 8 repetições observado na população do Rio de Janeiro⁷⁶ Nas populações da Colômbia⁷⁷ Filipinas^{18,19} China^{79,80} e Tailândia⁶⁵ foram encontradas um predomínio de 7 ou 8 repetições para este locus.

Ainda para o *locus* 18-8, encontramos 4 isolados com 9 repetições. Esse perfil foi também observado em 11 isolados em um painel analisado por Fontes et.al Col.(2009)⁷⁶, sendo também identificado em 1 isolado da Índia e 1 da Colômbia. Esse marcador foi considerado por Gillis e Col.,⁶⁴ como difícil de analisar quando testados em concentrações mais elevadas de bactérias devido à presença de bandas múltiplas de *stutter*. Nosso painel de isolados mostrou que para a população de São Paulo o *locus* 18-8 exigiu maior concentração de DNA para conseguirmos sucesso na amplificação e sequenciamento dos

fragmentos do *locus* 18-8.

Observando os dados epidemiológicos destes isolados com 9 repetições, notamos que 2 pacientes são residentes do “Hospital Dr. Francisco Ribeiro Arantes”, no município de Itú (ex-asilo colônia do estado de São Paulo) e eram naturais das cidade de São Simão e Monte Sião – SP, cuja distância é de 203 km uma da outra. No perfil genético desses casos, notamos que a diferença entre eles está em 5 *locis* mais polimórficos do estudo, (GTA9, AT17, TA18, TTC21, e TA10). Do ponto de vista do perfil genético, os marcadores com alto polimorfismo AT17 e TA18, geram as maiores diferenças entre os isolados, no entanto eles estão distribuídos dentro do mesmo agrupamento, porém em ramos diferentes. Esse fato pode estar relacionado à diferença de 1, 1 e 5 repetições para os loci GTA9, TTC21 e TA10.

O mesmo foi observado para os outros 2 pacientes com esse perfil são procedentes da cidade de Itápolis (DRS Araraquara) e Bauru (DRS Bauru), sendo a distancia entre elas de 102 km. São naturais das cidades de CIANORTE-PR e São Sebastião da Grama-SP. Estes isolados apresentam diferenças em 3 *loci* mais polimórficos, TA18, TTC21 e TA10.

Quando analisamos os 4 casos que apresentaram 9 repetições para o *locus* 18-8 notamos que existe uma grande similaridade entre esses isolados. A análise filogenética mostrou que esses isolados pertencem ao grupo 3 e que estão conectados no mesmo ramo, assim mostrando a similaridade genética.

Apesar da falha na informação, para entendermos a transmissão entre pacientes das cidades de Itu/ Bauru/ Itápolis (com distância de 250 e 106 Km), ambos os pacientes foram diagnosticados em 2006, considerando que o tempo de adoecimento da hanseníase é de 5 a 7 anos, sugerimos que ambos entraram em contato com o bacilo em um período próximo.

Ainda nesse mesmo contexto, foram avaliados 4 casos de hanseníase, da pequena cidade de Gavião Peixoto pertencente à DRS Araraquara, que

segundo o IBGE tem uma população de 4.419 habitantes e possui 4 unidades básicas de saúde. Dois destes pacientes apresentam perfil genético com alta similaridade (80%) e os dados obtidos dos prontuários revelaram que estes pacientes (SP 50 e SP95) são irmãos por parte de pai. Quando checamos os dados destes pacientes, observamos que estes não residem na mesma casa, assim a análise espacial revelou que a distância entre as residências é de 400 metros.

Quanto aos outros dois casos desta cidade, SP61 e SP86, nossas análises mostraram que o paciente SP61 reside a 30 metros de distância de um dos pacientes do grupo multicaso familiar (SP95), e esses dois isolados compartilham de 70% de similaridade genética e tiveram o diagnóstico da hanseníase com diferença de 3 anos. Sugerimos que foi o mesmo isolado circulante envolvido na transmissão.

Os *SNPs* têm proporcionado evidências importantes na formulação de hipóteses sobre as rotas de disseminação da hanseníase pelo mundo e tem favorecido a análise de isolados de várias partes do globo, e em várias regiões do Brasil.

Nesse estudo, verificamos o predomínio do *SNP* tipo 3, também observado em outros estudos na população Brasileira, como o esperado para as Américas ⁽¹²⁾. Estudos realizados na Colômbia e Brasil, correlacionaram os *locis* 27-5 e 12-5 com 4-5 repetições com o genótipo tipo 3 e isso foi observado em 70 % isolados por nós analisados.

Identificamos também 3% de isolados com perfil tipo 2 que estão relacionados a isolados oriundos da Etiópia, Malawi, Nepal, norte da Índia e Nova Caledônia ^{15,16}. Estes pacientes pertencem a cidades de Ibitinga, Birigui, Amparo e Pirassununga. Exceto por Birigui e Amparo com importante colonização Asiática, para as demais cidades não encontramos uma ligação para a presença do perfil tipo 2.

Outra análise importante neste estudo foi à detecção de genes de

resistência com mutação para dapsona e rifampicina, com 5 isolados apresentando resistência para os códons já descritos na literatura⁶⁶.

Somente em 02 isolados dos com resistência a drogas, obtivemos o perfil completo para os 16 *VNTRS*. Esses pacientes adoeceram em 2007 e 2006 respectivamente e são residentes de São Paulo e Sorocaba, cidades com 100km de distância uma da outra. O paciente de São Paulo é multirresistente, no entanto não tivemos informações sobre recidiva, então sugerimos esse caso como resistência primária. Com relação ao paciente de Sorocaba, informações do prontuário revelam que sua filha e cunhado também foram diagnosticados com hanseníase, mas não informa o ano.

A partir da caracterização dos isolados por *MLVA-VNTR* para os 16 *VNTRs* e *SNPs*, realizamos algumas análises filogenéticas por *MST* e *UPGMA* com a finalidade de definir similaridade e ancestralidade entre os genótipos do estado de São Paulo, objetivando uma melhor compreensão da distribuição e da relação entre os genótipos com sua origem geográfica.

As análises geradas nos revelaram que os isolados com ausência de 1 ou mais *VNTRs*, não alteraram a estrutura e sua distribuição na população. Essas mesmas análises nos mostraram que os *VNTRS* mais polimórficos distanciavam e de certa forma ocultavam a definição de *clusters*, dificultando o entendimento da dinâmica de transmissão nessa população. Por isso optamos, por realizar todas as análises a partir da exclusão desses marcadores (AT 17 e TA18).

Na análise por *UPGMA*, verificamos a formação de 2 grupos distintos, com a formação de 5 *clusters* em um grupo e 2 *clusters* no outro. Observamos também, que a formação de duas populações distintas está relacionada ao *locus* 18-8, que segregou os genótipos em duas populações baseado nos perfis 3, 4 e 5 em uma população e os isolados com genótipo 6, 7 e 8 e 9 em outra população.

A análise por *MST* com 128 isolados para 14 *VNTRs* verificou a

importância da DRS Bauru, seguida da DRS de Araraquara na disseminação de genótipos para outras regiões do estado.

Estudos com famílias multicaso sugerem que estas podem representar focos epidêmicos e fontes de transmissão do *M. leprae* nos ambientes em que vivem^{17,18,79}.

Quando visualizamos os isolados de multicaso na análise por *MST*, notamos que os isolados da família F2 estão segregados, porém pertencem ao mesmo grupo (G3), isso ocorre devido à diferença em 2 *VNTRS*.

Os isolados de São Paulo quando comparados com os demais já caracterizados no Brasil, um total de 414 genótipos com perfis completos para 15 *VNTRS*, permitiu que observássemos um grande agrupamento com alta similaridade com isolados de São Paulo e Rondonópolis e atribuímos esse fato a questões dos fluxos migratórios com finalidade econômica entre São Paulo e MT em áreas de agronegócio e indústria.

Nosso estudo apresentou limitações, como por exemplo, (i) o formato de busca das informações clínica-epidemiológica por meio de prontuários, fato este, que dificulta na fidelidade dos dados obtidos; (ii) outra limitação é o “n” amostral limitado, em virtude de recebermos os casos por demanda espontânea e principalmente por sermos um Centro de Referência onde os pacientes são enviado somente nas situações de dificuldade no diagnóstico. No entanto, o conjunto de informações apresentadas aqui evidenciou e nos permite sugerir que temos importantes focos de transmissão continuada da hanseníase em São Paulo.

Entendemos que é precoce afirmarmos a existência de núcleos de endemia oculta da hanseníase no estado de São Paulo. Porém o compartilhamento de genótipos com alta similaridade em diferentes DRS, o diagnóstico de casos multifamiliares, e a presença da hanseníase em vizinhos, pode ser um indicativo da transmissão continuada e da possibilidade de casos não detectados da doença, sugerindo a existência de falha nos programas de

controle da hanseníase no estado de São Paulo.

8.0 Conclusões

Conclusões

Há mais de uma década, a hanseníase foi eliminada como problema de saúde pública no Estado de São Paulo, no entanto, algumas regiões ainda vêm apresentando taxas de detecção de novos casos que contribuem para a manutenção na cadeia de transmissão da doença.

Os resultados obtidos nesse estudo, por meio da genotipagem dos isolados de *M. leprae*, demonstraram possíveis links na cadeia de transmissão da doença no estado, mas a falta de informações clínico-epidemiológicas que poderiam contribuir na formulação de hipóteses quanto aos padrões dessa transmissão não foi suficiente para sugerirmos a presença de focos de prevalência oculta da doença.

Portanto, esses dados confirmam a importância dos programas de vigilância da hanseníase, por meio do diagnóstico precoce, da busca ativa por novos casos e o do acompanhamento de seus contatos.

9.0 Referências Bibliográficas

1. WHO. Study Group. Chemotherapy of Leprosy for Control Programs. World Health Organ Tech Rep Ser, 1982; 675.
2. WHO .Multidrug Therapy against leprosy: development and implementation over the past 25 years. Geneva. 2004.
3. Pereira EV, Nogueira LT, Machado HAS, Lima LAN, Ramos CHM. Epidemiologic profile of the leprosy of the city of Teresina, in the period of 2001–2008. An. Bras. Dermatol 2011; 86:235–240
4. Ebenezer GJ, Norman G, Joseph GA, Daniel S, Job ck, et al. Drug resistant Mycobacterium leprae – results of mouse footpad studies from a laboratory in South India. Indian J Lepr 2002; 74: 301–312.
5. Cambau E, Perani E, Guillemain I, Jamet P, Baohong J. Multidrug resistance to dapsone, rifampicin, and ofloxacin in Mycobacterium leprae. Lancet 1997; 349: 103–104.
6. Maeda S, Matsuoka M, Nakata N, kai M, Maeda Y, Hashimoto k. et al. Multidrug resistant Mycobacterium leprae from patients with leprosy. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 3635–3639.
7. Matsuoka M, Yoshiko K, Masako N. A Mycobacterium leprae isolate resistant to dapsone, rifampin, ofloxacin and sparfloxacin. International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases, 2000; 68: 452–455.
8. Cambau E, Bonnafous P, Perani E, Sougakoff W, Baohong J, Vincente J. Molecular detection of rifampicin and ofloxacin resistance for patients who experience relapse of multibacillary leprosy. Clin Infect Dis, 2001; 34: 39–45.
9. Matsuoka M, Kashiwabara Y, Zhang L, Masamichi G, Shin-ichi K. A second case of multidrug resistant Mycobacterium leprae isolated from a Japanese patient with relapsed lepromatous leprosy. Int J Lepr 2003; 71: 240– 243.
10. Cambau E, Carthagena L, Chauffour A. B Ji. Jarlie V. Dihydropteroate synthase mutations in the folP1 gene predict dapsone resistance in relapsed cases of leprosy. Clin Infect Dis 2006; 42: 238–241.

11. Marzliak, MLC. Situação Epidemiológica Atual da Hanseníase Estado de São Paulo. Reunião de avaliação das ações de controle da Hanseníase – 2015in: www.cve.saude.sp.gov.br. 13-14 de maio de 2015.
12. Salgado CG, Barreto JG. Leprosy Transmission: Still a Challenge Journal Compilation 2012. *Acta Dermato-Venereologica*.2012;92:336-336.
13. Groathouse NA, Rivoire B, Kim H, Lee H, Cho SN, et.al. Multiple polymorphic loci for molecular typing of strains of *Mycobacterium leprae*. *J. Clin. Microbiol* 2004; 42: 1666-1672.
14. Kimura M, Sakamuri RM, Groathouse NA, Gingrich D, Krueger-Koplin S, Cho SN, et al. Rapid Variable-Number Tandem Repeat (VNTR) genotyping for *Mycobacterium leprae* clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 1757-1766.
15. Monot M, N Honore, Garnier T, Araoz R, Coppee JY, Lacroix C, et al. On the origin of leprosy. *Science* 2005; 308:1040-1042.
16. Monot M, Honore N, Garnier T, Zidane N, Sherafi D, Paniz-Mondolfi, et al Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. *Nature* 2009 ;41:1282-1289.
17. Sakamuri R M, Harrison J, Gelber R, Saunderson P, Brennan PJ, Balagon. Continuation: study and characterisation of *Mycobacterium leprae* short tandem repeat genotypes and transmission of leprosy in Cebu, Philippines. *Lepr. Rev* 2009; 80:272-279.
18. Sakamuri RM, Kimura M, Li W, Kim, HC, Lee H, Kiran MD, et al Population-based molecular epidemiology of leprosy in Cebu, Philippines. *J. Clin. Microbiol* 2009; 47:2844-2854.
19. Weng X, J Vander Heiden, Y Xing, J Liu, V Vissa. Transmission of leprosy in Qiubei County, Yunnan, China: insights from an 8-year molecular epidemiology investigation. *Infect. Genet. Evol* 2011; 11:363-374.
20. Opromolla PA, Laurenti R. Controle da hanseníase no Sudeste do Brasil. *Rev Saúde Pública* 2011; 45: 195-203.

21. Andrade VLG. "Evolução da Hanseníase no Brasil e Perspectivas Para Sua Eliminação Como um Problema de Saúde Pública. Rio de Janeiro. Tese. Doutorado em Saúde pública. Escola Nacional de Saúde Pública da Fundação Oswaldo Cruz.1996
22. Eidt M. Breve história da hanseníase: sua expansão do mundo para as Américas, o Brasil e o Rio Grande do Sul e sua trajetória na saúde pública brasileira. Saúde e Sociedade 2004 ;13:76-88.
23. OPROMOLLA, D. V. A. Noções de hansenologia. Bauru: Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato, 1981.
24. A Grzybowski, Sak J, Pawlikowski J, Iwanowicz-Palus G.Gerhard Henrik Armauer Hansen (1841-1912) — The 100th anniversary of the death of the discoverer of *Mycobacterium leprae*. Clinics in Dermatology 2013; 31: 653: 655.
25. Opromolla DVA, ed. Noções de Hansenologia. Bauru: Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato; 2000.
26. Souza CS. Hanseníase: formas clínicas e diagnóstico Diferencial. Medicina Ribeirão Preto 1997; 30: 325:334.
27. Woods AS, Cole ST. A Rapid Method for the Detection of Potentially Viable of *Mycobacterium leprae* in Human Biopsie: A Novel Apliccation of PCR. Fems Microbial Lett 1989; 53 (3): 305-309.
28. Sartori BGC. "Determinação Molecular da Viabilidade do *Mycobacterium leprae*: Uma Comparação com Outras Abordagens Metodológicas".Botucatu. Dissertação de Mestrado em Doenças Tropicais. Faculdade de Medicina de Botucatu. UNESP; 2015.
29. Teixeira AC, Cruvinel DL, de Roma FR, Luppino LF, Resende LHP, Sousa T, Bühner- Sékula S, Goulart IMB. Avaliação da concordância entre exames clínicos e laboratoriais no diagnóstico da hanseníase. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 2008, 41(Suplemento II): 48-55.
30. Ridley DS, Jopling WH. Classification of Leprosy According to Immunity.

A five- group system. *Int. J. Leprosy* 1966; 34(3): 255-73.

31. WHO. CHEMOTHERAPY OF LEPROSY FOR CONTROL minimal mycobacterial gene. *Genome Biol.* 2001 2:1023.

32. Vissa VD, Brennan PJ. The genome of *Mycobacterium leprae*: a minimal mycobacterial gene. *Genome Biol* 2001; 2:1023.1: 1023.8.

33. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The Continuing Challenges of Leprosy. *Clinical Microbiology Reviews* 2006; 19: 338-381.

34. Salgado CG, Barreto JG. Leprosy Transmission: Still Challenge Journal Compilation 2012. *Acta Dermato-Venereologica*.2012;92:336-336.

35. Araújo MG. Hanseníase no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2003. 36:373-382.

36. Ridley DS, Jopling WH. Classification of Leprosy According to Immunity. A five- group system. *Int. J. Leprosy* 1966; 34(3): 255-73.

37. WHO. CHEMOTHERAPY OF LEPROSY FOR CONTROL PROGRAMMES: REPORT OF WHO STUDY GROUP. GENEVA. 1982. 36P. WHO. TECNICAL REPORT SERIES, 675.

38. Lastoria JC, Abreu MAMM. Hanseníase: Diagnóstico e Tratamento. *Diagn Tratamento* 2012; 17(4):173-79.

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

40. Yoon KH, Cho SN, Lee MK, Abalos RM, Cellona RV, Fajardo TT, et al. Evaluation of polymerase chain reaction amplification of *Mycobacterium leprae*-specific repetitive sequence in biopsy specimens from leprosy patients. *J Clin Microbiol*1993; 31 (4): 895-899.

41. Woods SA, Cole ST. A family of dispersed repeats in *Mycobacterium leprae*. *Mol. Microbiol* 1990; 4: 1745-1751.

42. Hartskeerl RA, De Wit M Y, Klatser PR. Polymerase chain reaction for

the detection of *Mycobacterium leprae*. J. Gen. Microbiol 1989; 135: 2357–2364.

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

44. De Wit MY, Faber WR, Krieg SR, Douglas JT, Lucas SB, Montreewasuwat et al. Application of a polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae* in skin tissues. J. Clin. Microbiol 1991; 29: 906–910.

45. Stefani MM, Martelli CM, Gillis TP, Krahenbuhl JL. In situ type 1 cytokine gene expression and mechanisms associated with early leprosy progression. J. Infect. Dis 2003; 188(7): 1024–1031.

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

47. Santos AR, Nery JA, Duppre NC, Gallo ME, Goes Filho JT, Suffys PN, Degraeve WM. Use of the polymerase chain reaction in the diagnosis of leprosy. J. Med. Microbiol 1997; 46: 170–172.

48. Kampirapap K, Singthan N, Klatser PR, Wiriyawipart S. DNA amplification for detection of leprosy and assessment of efficacy of leprosy chemotherapy. Int J Lepr Other Mycobact Dis 1998; 66: 16–21.

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

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

51. Woods SA, Cole ST. A rapid method for detection of potentially viable

Mycobacterium leprae in human biopsies: a novel application of PCR. FEMS Microbiol Lett 1989; 53: 305–309.

52. Martinez AN, Lahiri R, Pittman TL, Scollard D, Truman R, Moraes MO, et al. Molecular Determination of *Mycobacterium leprae* Viability by Use of Real-Time PCR J Clin Microbiol 2009; 47(7): 2124–2130

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

54. Ura S, Diório SM, Carreira BG, Trino LM, Lauris JR, Barravieira B. Estudo terapêutico comparando a associação de rifampicina, ofloxacina e minociclina com associação rifampicina, clofazimina e dapsona em pacientes com hanseníase multibacilar. Hansen Int 2007; 32(1): 57–65.

55. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Guia para controle da Hanseníase. Ministério da Saúde. 1 ed. Brasília. 2002

56. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Área Técnica de Dermatologia Sanitária. Guia para utilização de medicamentos e imunobiológicos na área de hanseníase. Brasília, 2001.

57. Who. Andrade V. Implementation of who MDT in Brazil. Multidrug Therapy against leprosy: development and implementation over the past 25 years. 2004

58. Weekly epidemiological record, No. 36, 5 SEPTEMBER 2014

59. Monteiro YN. Hanseníase: história e poder no Estado de São Paulo. Hansen Int 1987.12:1–7.

60. Nogueira W, Marzliak MLC. Prospectives for elimination of leprosy in the State of São Paulo and in Brazil. Medicina, Ribeirão Preto 1997 30: 364–370.

61. Helene LMF, Pedrazzani SE, Martins CL, Vieira CSCAV, Pereira AJ.

Organização de serviços de saúde na eliminação da Hanseníase em municípios do Estado de São Paulo. Rev Bras Enferm 2008; 61: 744-52.

62. Matsuoka M. DRUG RESISTANCE IN LEPROSY. JPN INFECT. DIS 2010;63,1-7.

63. Willians DL, Gillis TP. Drug resistance in leprosy: monitoring and current status. LEP REV 2012;83:269:281.

64. Gillis T, Vissa V, Matsuoka M, Young S, Richardus JH, Truman R, et al. Characterisation of short tandem repeats for genotyping *Mycobacterium leprae*. Lepr. Rev 2009; 80: 250-260.

65. Srisungnam S, Rudeeaneksin J, Lukebua A, Wattanapokayakit S, Pasadorn, S Mahotarn, et al. Molecular epidemiology of leprosy based on VNTR typing in Thailand. Lepr Rev 2009; 80: 280-289.

66. Matsuoka M, Maeda S, Kai M et al. *Mycobacterium leprae* typing by genomic diversity and global distribution of genotypes. Int J Leprosy 2000; 68: 121-28;

67. Matsuoka M, Maeda S, Kai M, Nakata N, Chae GT, et al. Variable numbers of TTC repeats in *Mycobacterium leprae* DNA from leprosy patients and use in strain differentiation. J Clin Microbiol 2000; 38: 4535-38;

68. Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson N R, Wheeler PR, et al. 2001a. Massive gene decay in the leprosy bacillus. Nature 2001; 409: 1007-1011.

69. Cole ST, Supply P, Honore N. et al Repetitive sequences in *Mycobacterium leprae* and their impact on genome plasticity. Lepr. Rev 2001;. 72: 449-461.

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

71. Young SK, Taylor GM, Jain S, Suneetha LM, Suneetha S, et al.

Microsatellite mapping of *Mycobacterium leprae* populations in infected humans. *J. Clin. Microbiol* 2004; 42: 4931–4936.

72. Zhang L, Budiawan T, Matsuoka M,. Diversity of potential short tandem repeats in *Mycobacterium leprae* and application for molecular typing. *J. Clin. Microbiol* 2005; 43: 5221–5229.

73. Kimura M, Sakamuri RM, Groathouse NA, Rivoire BL, Gingrich D, Krueger Koplin, et al. Rapid variable-number tandem-repeat genotyping for *Mycobacterium leprae* clinical specimens. *J. Clin. Microbiol* 2009; 47: 1757–1766.

74. Xing Y, Liu J, Sakamuri RM, Wang Z, Wen Y, Vissa, V et.al. VNTR typing studies of *Mycobacterium leprae* in China: Assessment of methods and stability of markers during treatment. *Lepr Ver* 2009; 80: 261–271.

75. Shinde V, Newton H, Sakamuri RM, Reddy V, Jain S, Joseph A, et al . VNTR typing of *Mycobacterium leprae* in South Indian leprosy patients. *Lepr. Rev* 2009; 80: 290–301

76. Fontes AN, Sakamuri RM, Baptista IM, Ura S, Moraes MO, Martinez, AN, Sarno, et al .Genetic diversity of *Mycobacterium leprae* isolates from Brazilian leprosy patients. *Lepr Rev* 2009; 80: 302–315.

77. Cardona-Castro N, Beltran-Alzate JC, Romero-Montoya IM, Melendez E, Torres F, Sakamuri RM, et al. Identification and comparison of *Mycobacterium leprae* genotypes in two geographical regions of Colombia. *Lepr. Ver* 2009. 80, 316–321.

78. Matsuoko M, Gonzalez AV, Estrada I, Carreno-Martinez C, Fafutis-Morris M,. Various genotypes of *Mycobacterium leprae* from Mexico reveal distinct geographic distribution. *Lepr. Rev* 2009; 80: 322–326.

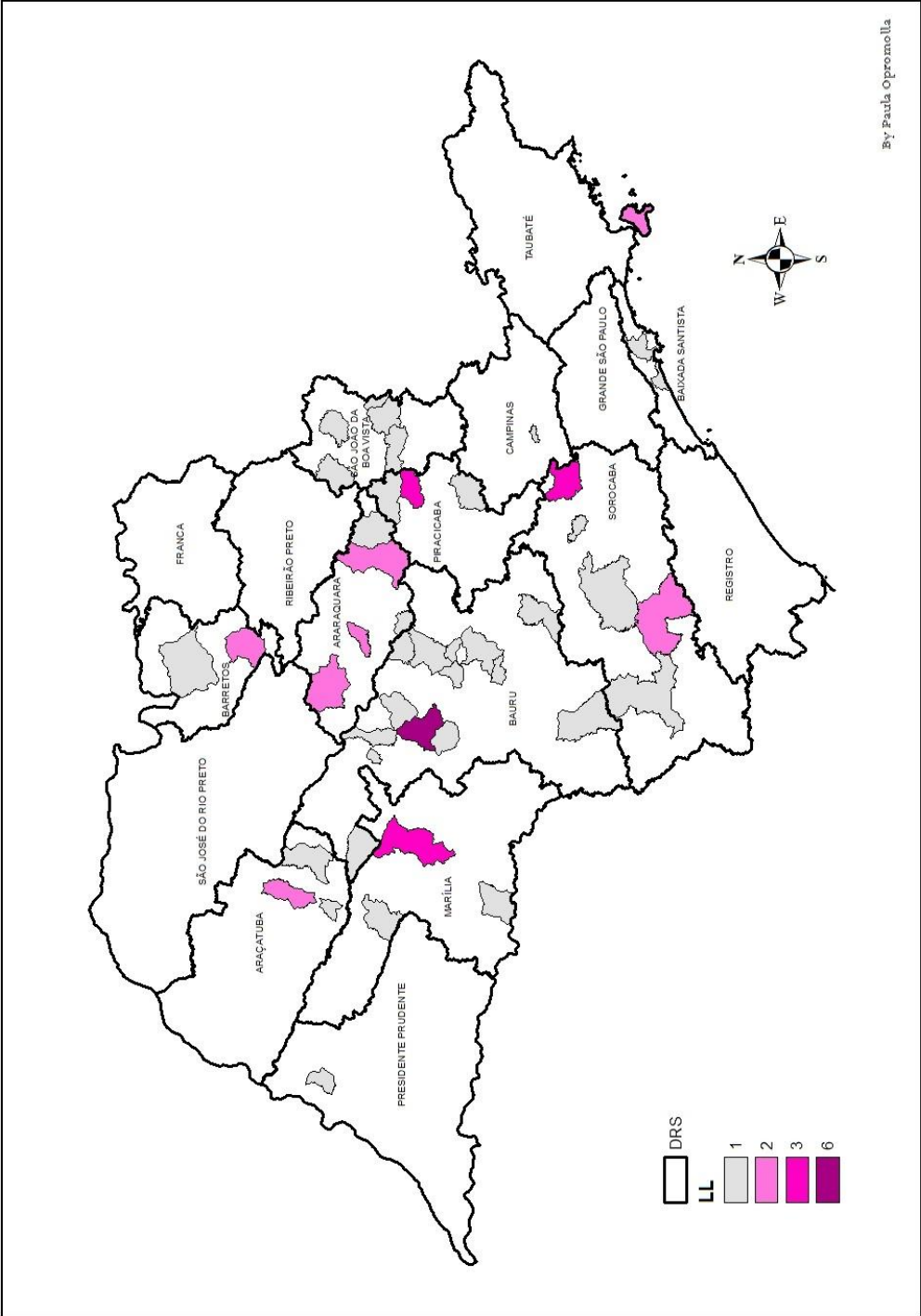
79. Weng X, Wang Z, Liu J, Kimura M, Black WC, Brennen P, et al. Identification and Distribution of *Mycobacterium leprae* genotypes in a Region of High Leprosy Prevalence in China: a 3-Years Molecular Epidemiological Study. *Journal of clinical microbiology* 2007; 1728–1734.

80. Weng X, Xing Y, Liu J, Wang Y, Ning Y, Li M, et al. Molecular, ethno-spatial epidemiology of leprosy in China: Novel insights for tracing leprosy in endemic provinces. *Infection, Genetics and Evolution* 2013; 361-368.
81. Plano Estadual de Saúde 2012-2015. em-saude/plano-estadual-de-saude-2012-2015-sessp [acessado em 03-01-2016]. Disponível em <http://www.saude.sp.gov.br/ses/perfil/gestor/documentos-de-planejamento->.
82. Lana FCF, Lanza FM, Velásquez-Meléndez G, Branco AC, Teixeira S, Malaquias LCC. Distribuição da hanseníase segundo o sexo no Município de Governador Valadares, Minas Gerais, Brasil. *Hansen. Int* 2003; 28(2): 131-137
83. Oliveira MLW, Motta CP. A hanseníase como problema de saúde pública. In: Lombardi C, organizador. *Hanseníase: epidemiologia e controle*. 1a ed. São Paulo: imprensa Oficial do Estado; 1990. p. 13-32.
84. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [homepage na internet]. Histórico de cidade. [acessado em 8-1-2016]. Disponível em <http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?codmun=350600>.
85. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [homepage na internet]. Histórico de cidade. [acessado em 8-1-2016]. Disponível em <http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?codmun=350600>
86. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [homepage na internet]. Histórico de cidade. [acessado em 8-1-2016]. Disponível em <http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?codmun=350600>
87. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [homepage na internet]. Histórico de cidade. [acessado em 8-1-2016]. Disponível em <http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?codmun=350600>
88. Monot M, Honore N, Balie C, Ji B, Sow S, Brennan PJ, et. al. Are Variable-Number Tandem Repeats Appropriate for Genotyping *Mycobacterium leprae*. *J Clin Microbiol* 2008; 46 (7): 2291-2297;
89. Brum Fontes AN, Gomes HM, Araujo MI, Albuquerque ECA, Dias

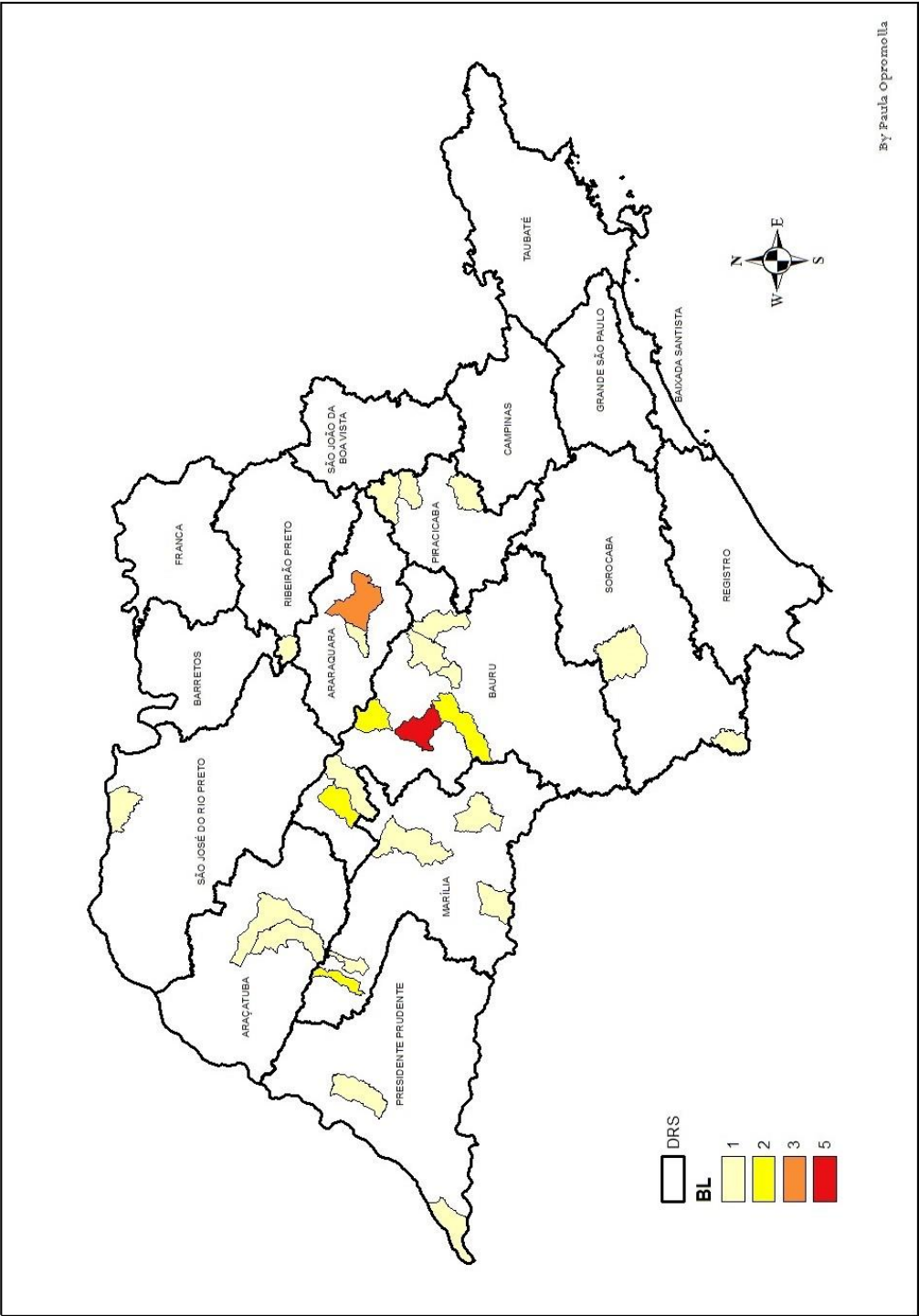
Baptista IM, Moura MMF, et al. Genotyping of Mycobacterium leprae presente on Ziehl Neelsen-stained microscopic slides and in kkin biopsy samples from leprosy patients in diferente geographic regions of Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 2012, Vol. 107(Suppl. D): 143-149;

10.0 Anexos

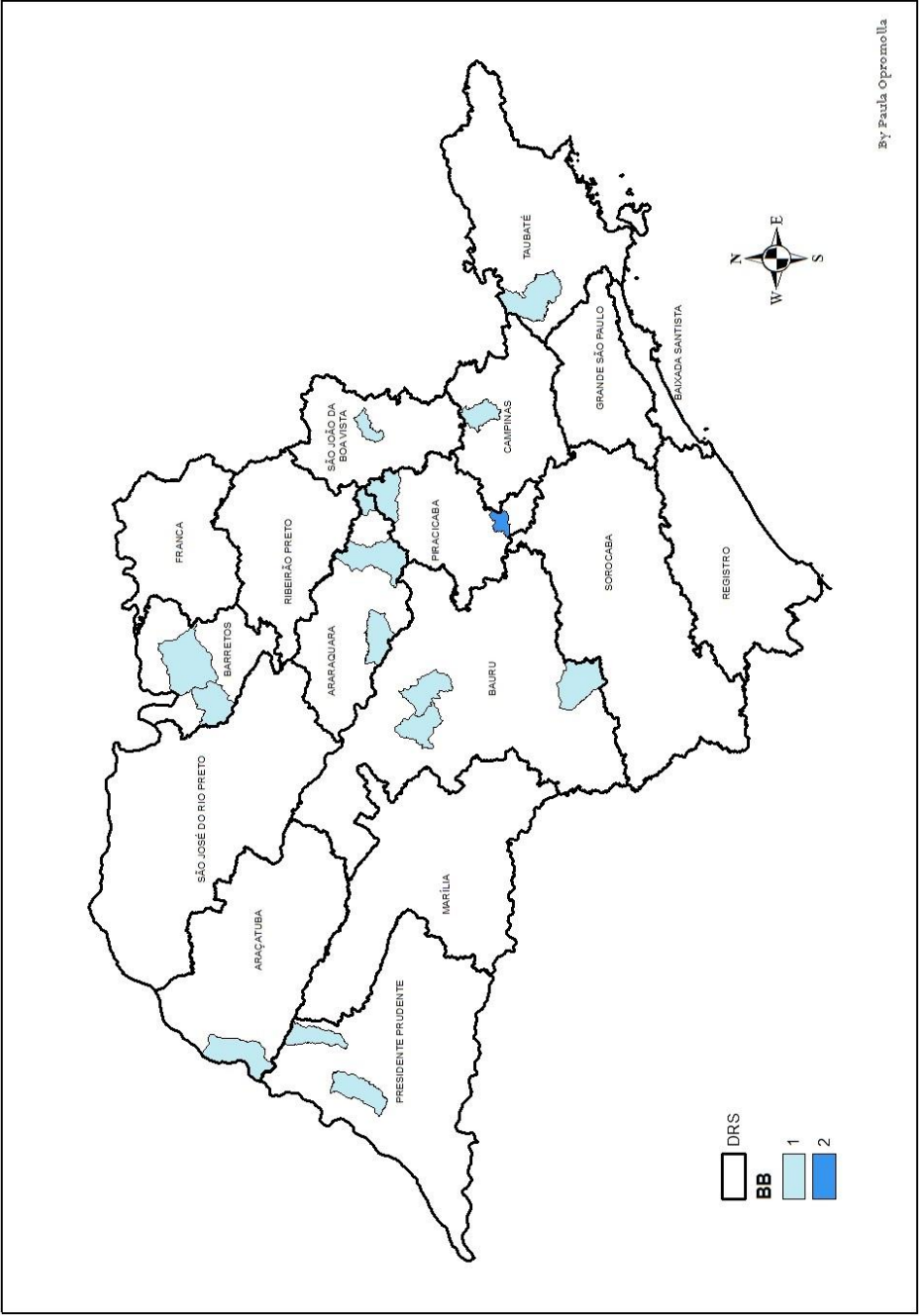
Anexo 1: Mapa da distribuição dos casos de hanseníase LL, no estado de São Paulo.



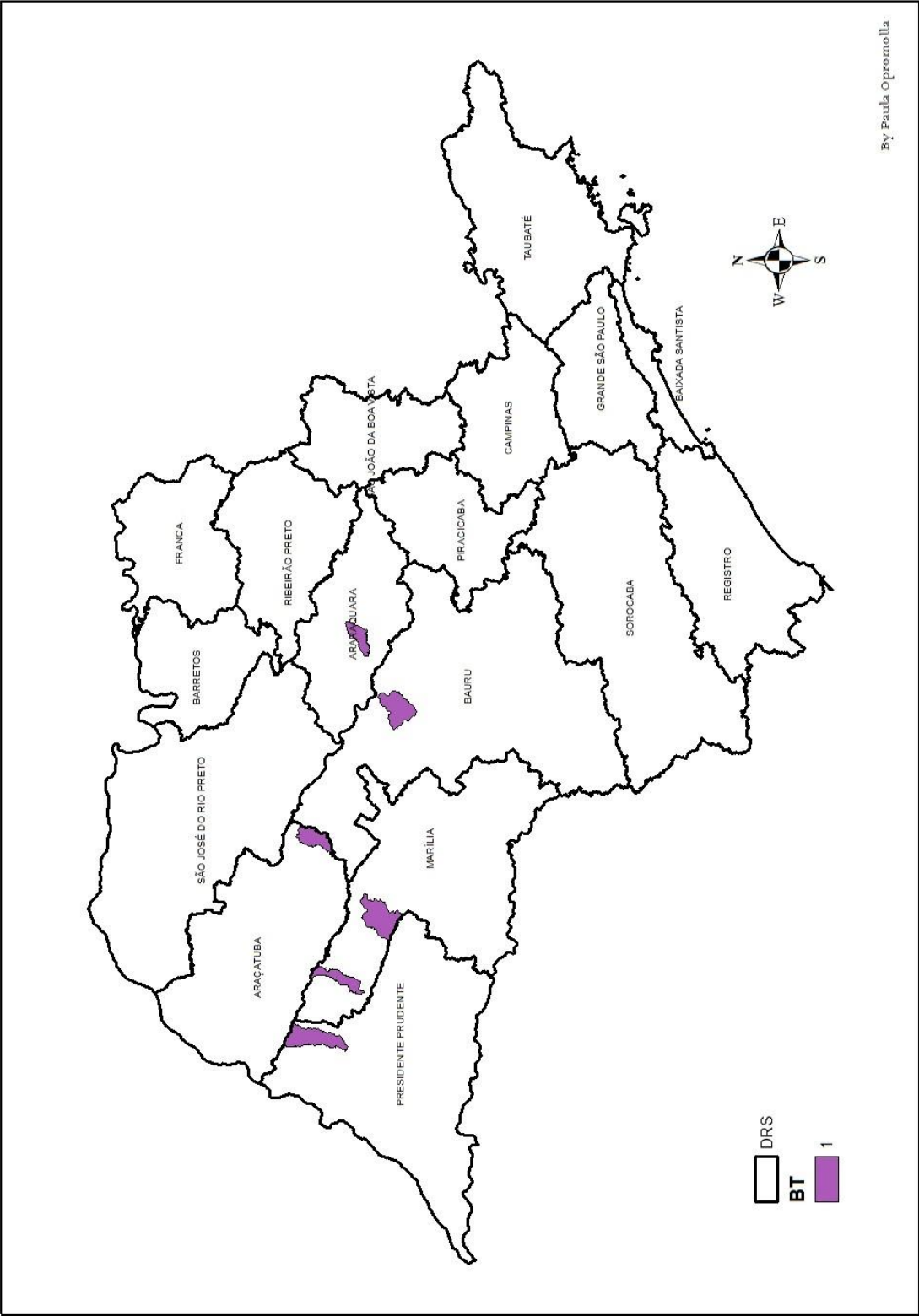
Anexo 2: Mapa da distribuição dos casos de hanseníase BL, no estado de São Paulo.



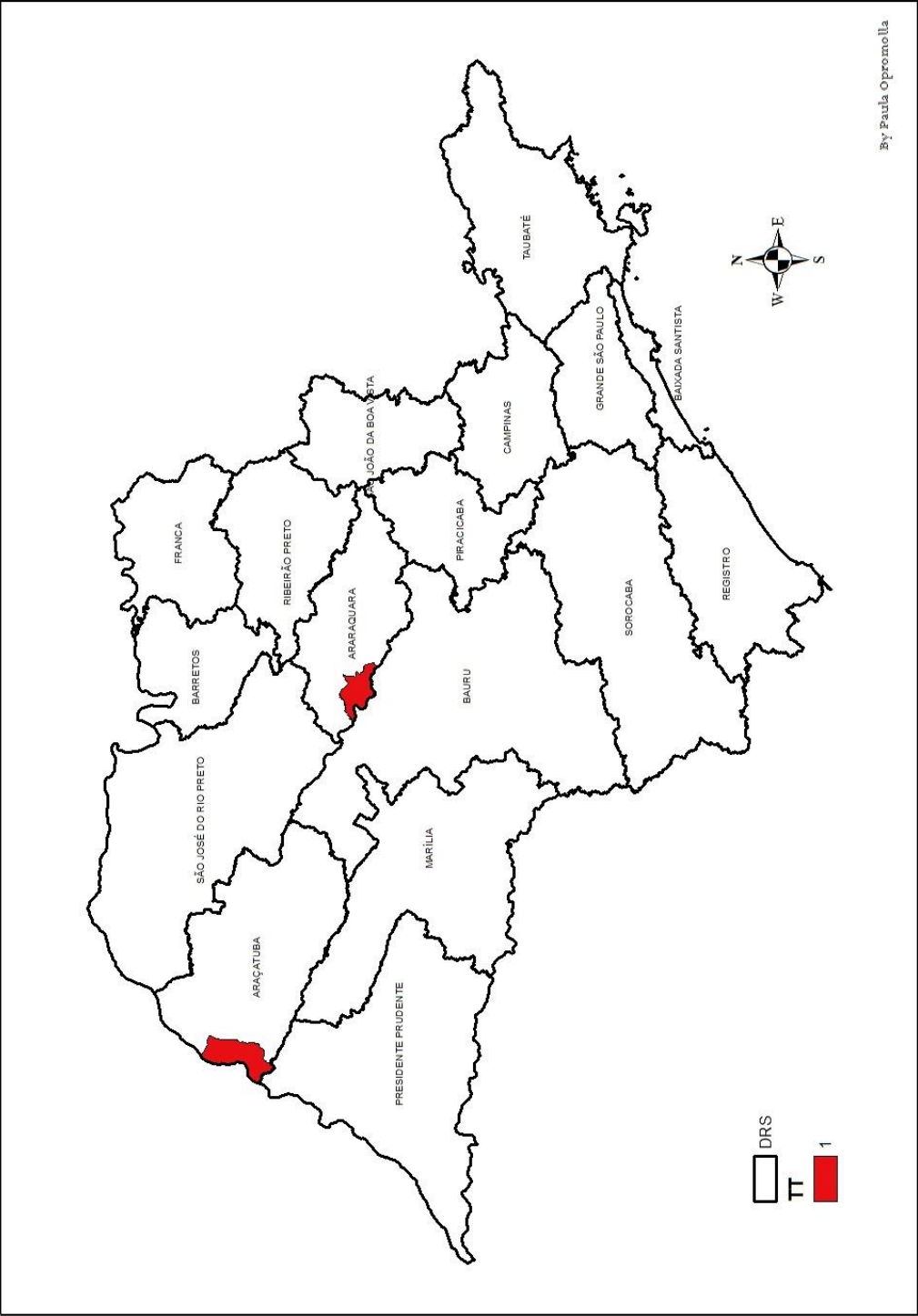
Anexo 3: Mapa da distribuição dos casos de hanseníase BB, no estado de São Paulo.



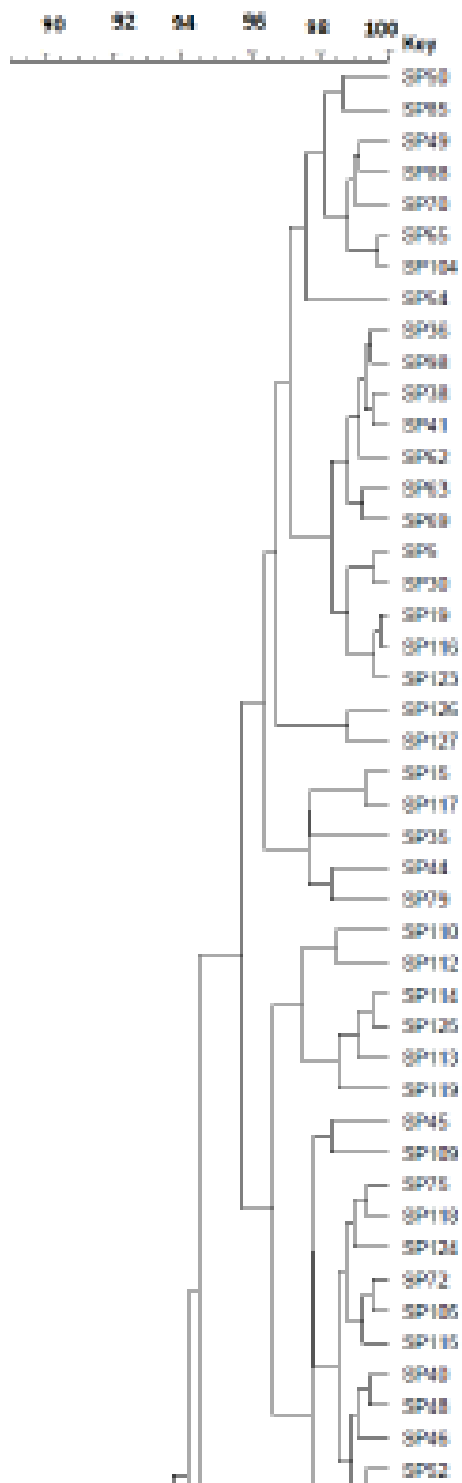
Anexo 4: Mapa da distribuição dos casos de hanseníase BT, no estado de São Paulo.

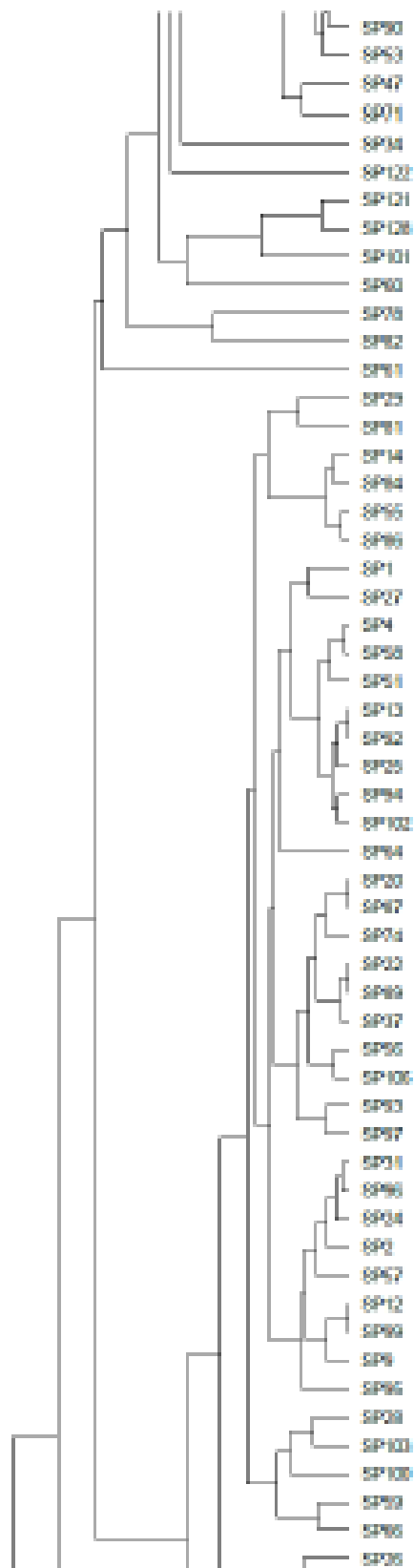


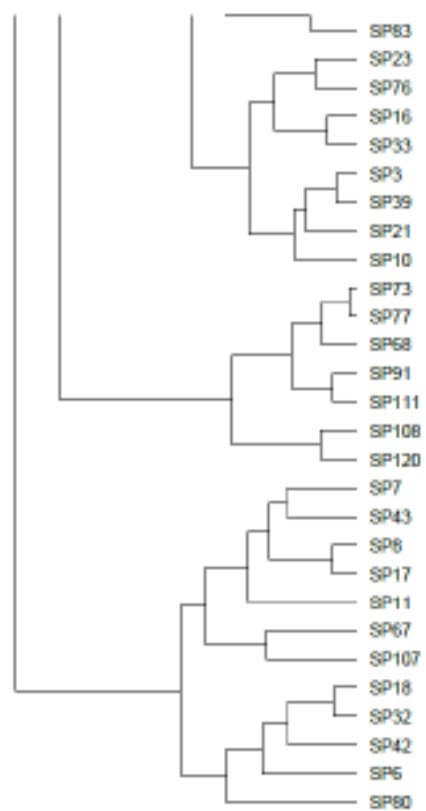
Anexo 5: Mapa da distribuição dos casos de hanseníase TT, no estado de São Paulo.



Anexo 6: UPGMA gerado com os 16 VNTRS para os 128 isolados de *Mycobacterium leprae* do Estado de São Paulo.







Anexo 7:Quadro com Conjunto de *primers* utilizados na metodologia para análise de SNP. (Ref. Monot 2005)

SNP (posição)	<i>Primers</i>
SNP2935685	(senso) 5'ATC TGG TCC GGG TAG GAA TC 3' (anti-senso) 5' ACC GGT GAG CGC ACT AAG
SNP15676	(senso) 5' AAT GGA ATG CTG GTG AGA GC 3' (anti-senso) 5' CAA TGC ATG CTA GCC TTA ATG A 3'
SNP1642875	(senso) 5' TGC TAG TTT AAC CGA GTA CTG CTA 3' (anti-senso) 5' GTA GTA GTC TTC CAA GTT GTG GTG 3'

Anexo 8 : Quadro do Conjunto de Primers” utilizados na PCR – DRDR.

(Ref. Matsuoka 2010)

Gene	Tamanho do fragmento em pb	Primer	Sequência (5’-3’)
<i>folP1</i>	312	NF2	-GCAGGTTATTGGGGTTTTGA-
		FH2	- CCACCAGACACATCGTTGAC-
<i>rpoB</i>	358	Rif-1	-CAGACGCTGATCAATATCCGT-
		RpoBR05	-CAGCGGTCAAGTATTCGATC-

Anexo 9: tabela dos perfis genético dos 128 isolados de *Mycobacterium leprae* do estado de São Paulo, analisado por 16 VNTRs e SNP filogeográfico.

ID	R&J	(AC)8b	(GTA)9	(GGT)5	(AT)17	6-3a	21-3	(AC)9	(AC)8a	27-5	6-7	(TA)18	(TTC)21	(TA)10	23-3	12-5	18-8	SNP
SP1	LL	7	10	4	13	3	2	7	9	4	6	13	10	11	2	5	3	3
SP2	BL	7	8	4	12	3	2	7	9	4	6	14	12	10	2	5	3	3
SP3	LL	7	11	4	11	3	2	7	10	4	6	13	13	9	2	5	3	3
SP4	LL	7	10	4	14	3	2	7	9	4	6	19	10	11	2	5	3	3
SP5	BL	7	10	4	13	3	2	7	8	4	6	13	9	11	2	5	8	3
SP6	LL	7	8	4	15	3	2	7	8	4	6	14	14	11	2	5	3	3
SP7	LL	7	11	4	13	3	2	7	8	5	6	12	12	9	2	4	3	3
SP8	LL	6	9	4	11	3	2	7	8	4	6	9	11	8	2	4	4	3
SP9	LL	6	8	4	13	3	2	8	9	4	6	16	11	10	2	4	4	3
SP10	LL	7	10	5	10	3	2	7	9	4	5	12	14	8	2	5	3	3
SP11	BL	8	10	4	13	3	2	8	9	4	6	9	10	9	2	4	3	3
SP12	LL	7	7	4	14	3	2		9	4		16	11	10	2	5	3	3
SP13	LL	7	10	4	13	3	2	7	7	4	6	16	10	10	2	5	3	3
SP14	BB	6	10	4	11	3	2	7	8	5		18	10		2	5	3	3
SP15	BB	6	12	4		3	2	8		4	6	12	10	9	2	5		
SP16	BL	7	10	4	9	3	2	7	10	4	7	15	12	10	2	5	3	3
SP17	BL	6	9	4	12	3	2	7	9	5	6	9	11	8	2	4	4	3
SP18	BB	7	10	4	14	3	2	7		4	6	12	10	9	2	5	4	3
SP19	LL	7	9	4	14	3	2	7	9	4	6	14	10	11	2	5	3	3
SP20	BB	7	9	4	10	3	2	7	9	4	6	17	10	11	2	5		
SP21	LL	7	12	4	12	3	2	7	8	4	6	14	15	10	2	5	3	
SP22	BB	6		4	12	3	2	7	9	4	6	16	11		2	5	3	3
SP23	LL	7	12	4	9	3	2	7	8	4	6	14	12	10	2	5	3	3
SP24	LL	7	8	4	12	3	2	8	9	4	6	14	11	11	2	5	3	3
SP25	LL	7	10	4	14	3	2	7	9	4	6	16	10	10	2	5	3	3
SP26	LL	6	9	4	12	3	2	7	9	5	5	17	12	8	2	5	3	3
SP27	BB	6	10	4	12	3	2	7	7	4			10	11	2	5	3	3
SP28	LL	6	11	4	10	3	2	7	8	4	5	16	10	9	2	5	3	3
SP29	BL	7	9	4	11	3	2	8	9	4	7	16	10	10	2	4	4	3
SP30	LL	7	10	4	13	3	2	7	8	4	5	12	9	11	2	5		3
SP31	LL	7	9	4	12	3	2	7	10	4	6	14	11	11	2	5	3	3
SP32	LL	7	10	5	15	3	2	8	8	4	6	13	11	10	2	5	3	3
SP33	BT	7	9	4	10	3	2	7	9	4	7	16	13	10	2	5	3	3
SP34	LL	6	9	4	10	3	2	8	8	4	6	10	9	8	2	5	8	3
SP35	LL	6	12	4	11	3	2	7	9	4	6	13	12	10	2	5	8	3
SP36	LL	6	10	4	12	3	2	7	9	4	6	13	10	10	2	5	8	3
SP37	NI	6	10	4	12	3	2	7	9	4	6	18	12	12	2	5	3	3
SP38	LL	7	11	4	13	3	2	7	9	4	6	15	10	11	2	5	8	3
SP39	LL	7	10	4	11	3	2	7	9	4	6	13	12	9	2	5	4	3
SP40	NI	7	10	5	11	3	2	7	9	4	6	16	10	9	2	5		3
SP41	BL	7	10	4	13	3	2	7	9	4	6	14	10	11	2	4	8	3
SP42	BL	8	8	5	14	3	2	7	9	4	7	12	11	10	2	5	3	3
SP43	LL	7	11	5	12	3	2	6	9	4	6	11	11	10	2	5	4	3
SP44	BL	6	12	4	11	3	2	7	8	4	6	15	10	9	2	5	8	3
SP45	LL	6	9	4	10	3	2	7	8	4	6	17	12	10	2	5	8	3
SP46	LL	6	10	4	12	3	2	7	9	4	6	18	12	9	2	5	8	3
SP47	BL	6	8	4	12	3	2	7	8	4	7	15	12	10	2	5	7	3
SP48	BB	6	10	4	11	3	2	7	8	4	6	16	10	9	2	5	8	3
SP49	LL	7	10	5	13	3	2	7	9	4	5	14	12	10	2	5	8	3
SP50	LL	6	8	4	11	3	2	7	8	4	7	13	10	9	2	5	8	3
SP51	LL	7	10	5	13	3	2	7	9	4	6	17	10	11	2	5	3	3
SP52	LL	6	10	4	12	3	2	7	9	4		15	11	9	2	5-7	8	3
SP53	BL	6	10	4	10	3	2	7	9	4	7	15	10	9	2	5	8	3
SP54	BB	7	10	4	11	3	2	7	9	4	7	13	12	10	2	7	8	3
SP55	BB	6	10	4	11	3	2	7	9	4		19	9	9	2	5	3	3
SP56	BL	6	10	4	11	3	2	7	8	4	6	15	10	12	2	6	3	3
SP57	BL	6	8	4	11	3	2	8	9	4	5	13	11	9	2	5	3	3
SP58	BB	7	10	4	14	3	2	7	9	4	6	19	10	10	2	5	3	3
SP59	NI	6	13	4	15	3	2	7		4	5	17	10	11	2	4	3	3
SP60	BL	7	6	4	12	3	2	7	10	4	7	14	11	10	2	5	8	3

ID	R&J	(AC)8b	(GTA)9	(GGT)5	(AT)17	6-3a	21-3	(AC)9	(AC)8a	27-5	6-7	(TA)18	(TTC)21	(TA)10	23-3	12-5	18-8	SNP
SP61	LL	7	8	4	15	3	2	7	7	4	6	12	12	11	2	5	8	3
SP62	LL	7	10	4	13	3	2	7	10	4	6	15	10	10	2	5	8	3
SP63	LL	7	12	4	13	3	2	8	10	4	5	16	10	12	2	5	8	3
SP64	LL	8	12	4	13	3	2	7	8	5	5	17	12	10	2	5	3	3
SP65	LL	7	10	4	14	3	2	7	8	4	6	13	11	10	2	5	8	3
SP66	LL	6	12	4	13	3	2	7	9	4	6	14	10	10	2	5	3	3
SP67	BL	7	9	4	14	3	2	7	8	5	6	12	15	8	2	4	3	3
SP68	BL	7	12	4	13	3	2	7	9	4	6	23	10	12	2	5	8	3
SP69	BL	7	11	4	13	3	2	7	10	4	6	17	10	12	2	5	8	3
SP70	BL	7	10	4	12	3	2	8	9	4	6	14	12	9	2	5	8	3
SP71	LL	7	8	5	11	3	2	7	9	4	7	16	11	10	2	5	8	3
SP72	BL	7	10	4	12	3	2	7	9	5	6	17	10	11	2	5	8	3
SP73	BL	7	10	4	13	3	2	6	9	4	5	23	10	9	2	5	8	3
SP74	BL	7	10	4	11	3	2	7	9	4	6	15	10	11	2	5	3	3
SP75	BL	7	9	4	12	3	2	8	9	4	6	17	10	10	2	5	8	3
SP76	LL	7	12	4	10	3	2	7	10	4	7	14	13	12	2	5	3	3
SP77	LL	7	10	4	13	3	2	6	9	4	6	23	10	10	2	5	8	3
SP78	BL	7	11	4	12	3	2	7	9	5	6	15	15	7	2	4	8	3
SP79	LL	7	12	4	12	3	2	7	10	4	6	15	10	10	2	6	7	3
SP80	BB	7	8	5	17	3	2	7	7	5	6	14	11	10	2	3	5	3
SP81	BT	6	10	5	10	3	2	8	8	3	7	16	10	11	2	4	3	3
SP82	TT		8	5	11	3	2		8	5	6	16	15	10	2	5	8	2
SP83	BB	7	9	4	12	3	2	7	10	5	7	18	15	9	2	5	3	3
SP84	BL	7	9			3	2	7	8	5	6	18		9	2		3	
SP85	BL	6	9	4	13	3	2	8	9	4	7	13	12	10	2	5	8	3
SP86	BL	7	12	4	13	3	2	7	10	4	6	22	11		2	5	3	3
SP87	BL			4	10	3	2	7	9	4	6		10		2	5	3	3
SP88	BB	7	10	4	13	3	2	7	9	4	6	14	13	10	2	6		3
SP89	BL	6	9	4		3	2	7		4	6		11		2	5	3	
SP90	LL	6	10	4	12	3	2	7	9	4	7	16	10	10	2	5		2
SP91	BB	7	10	4	10	3	2	6	8	4	6	24	11	10	2	5		2
SP92	BL	7	10	4		3	2	7		4			10	10	2	5		2
SP93	BL	7	10	4	11	3	2	7	10	4	6	13	10	11	2	5	3	
SP94	BL	7	10	4	14	3	2	7	8	4	7	16	11		2	5	3	3
SP95	BT	6	8	4	11	3	2	7	9	4	6		10	8	2	5	3	
SP96	BT	7	8	4	11	3	2			4			10		2	5	3	3
SP97	BT		11	4	12	3	2	8		4	6			13	2	4		
SP98	BL	6		4		3	2	7	9	4	6	15	11	11	2	5	8	3
SP99	BT	7		4		3	2	8				16			2	5		
SP100	LL	7	13	4	12	3	2	8	9	4	8	17	10	11	2	5	3	3
SP101	LL	7	7	4	15	3	2	8	8		6	16	11	8	2	5	8	
SP102	LL	7	10	4	13	3	2	7	9	4	7	16	11		2	5	3	3
SP103	LL	6	11	4		3	2	7	10	4	6	16	10	10	2	6	3	3
SP104	BL	7		4		3	2	7		4	6	13	12	10	2	5	8	
SP105	LL	7	10	4	14	3	2	7	9	5	6	18	11		2	5	8	3
SP106	TT	6	10	4	11	3	2	8		4					2	6		
SP107	NI	8	10	4	15	3	2	6	8	4	6	9	14	8	2	4	3	3
SP108	LL	7	9	4	10	3	2	8	9	4	6	21	11	7	2	5	9	3
SP109	LL	7	9	4	10	3	2	8	9	4	6	15	11	10	2	5	9	3
SP110	BB	7	10	4	10	3	2	8	8	4	6	15	11	6	2	5	8	3
SP111	LL	7	10	4	10	3	2	8	8	4	6	22	11	9	2	5	6	3
SP112	BB	7	12	4	12	3	2	8	9	4	6	15	11	7	2	5	8	3
SP113	LL	7	10	4	14	3	2	8	9	4	6	18	10	9	2	5	8	3
SP114	LL	7	10	4	12	3	2	8	9	4	6	16	9	8	2	5	8	3
SP115	LL	7	10	4	14	3	2	8	9	4	6	20	12	12	2	5	8	3
SP116	LL	7	9	4	14	3	2	8	9	4	6	14	10	11	2	5	8	3
SP117	LL	7	13	4	14	3	2	8	9	4	6	14	10	10	2	5	8	3
SP118	LL	7	9	4	12	3	2	8	9	4	7	16	11	10	2	5	8	3
SP119	LL	7	10	4	11	3	2	9	9	4	6	17	10	7	2	5	7	3
SP120	LL	7	9	4	10	3	2	8	9	4	6	21	14	7	2	5	9	3
SP121	LL	7	8	4	13	3	2	8	9	4	7	14	11	6	2	5	8	3
SP122	LL	7	10	4	9	3	2	8	9	4	6	14	12	12	2	5	9	3
SP123	BL	7	9	4	13	3	2	8	9	4	6	13	10	11	2	5	8	3
SP124	LL	7	10	4	11	3	2	8	9	4	6	15	10	10	2	5	7	3
SP125	BL	7	10	4	12	3	2	8	9	4	6	16	10	7	2	5	8	3
SP126	LL	7	10	4	11	3	2	8	11	4	6	14	10	10	2	5	8	3
SP127	BL	7	10	3	11	3	2	8	11	4	7	15	12	11	2	5	8	3
SP128	BB	7	9	4	13	3	2	8	9	4	7	15	13	7	2	5	8	3