

**UFRRJ**

**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
VETERINÁRIAS**

**TESE**

**Evidências sorológicas e moleculares de  
infecção natural por *Mycobacterium leprae* em  
tatus (*Euphractus sexcinctus*) no estado do  
Rio Grande do Norte, Brasil**

**JESSICA DA SILVA FERREIRA**

**2019**



**UFRRJ**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**Evidências sorológicas e moleculares de infecção natural por  
*Mycobacterium leprae* em tatus (*Euphractus sexcinctus*) no estado  
do Rio Grande do Norte, Brasil**

**JESSICA DA SILVA FERREIRA**

*Sob a Orientação do Doutor*  
**Douglas McIntosh**

*E Coorientação do Doutor*  
**Philip Noel Suffys**

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor** em Ciências no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ  
Maio de 2019

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F38311 Ferreira, Jessica da Silva , 1988-  
le Evidências sorológicas e moleculares de infecção  
natural por Mycobacterium leprae em tatus (Euphractus  
sexcinctus) no estado do Rio Grande do Norte, Brasil  
/ Jessica da Silva Ferreira. - Rio de Janeiro, 2019.  
129 f.: il.

Orientador: Douglas McIntosh.

Coorientador: Philip Noel Suffys.

Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do  
Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação em Ciências  
Veterinárias, 2019.

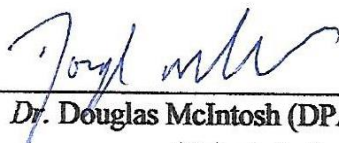
1. Mycobacterium leprae. 2. tatu. 3.  
imunodiagnóstico. 4. genotipagem. 5. zoonose. I.  
McIntosh, Douglas, 1964-, orient. II. Suffys, Philip  
Noel, 1963-, coorient. III Universidade Federal Rural  
do Rio de Janeiro. Programa de Pós-graduação em  
Ciências Veterinárias. IV. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**JESSICA DA SILVA FERREIRA**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

TESE APROVADA EM 09/05/2019.



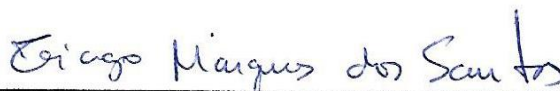
---

**Dr. Douglas McIntosh (DPA - UFRRJ)**  
(Orientador)




---

**Dr. Carlos Alexandre Rey Matias (DESP - UFRRJ)**



---

**Dr. Tiago Marques dos Santos (DESP - UFRRJ)**



---

**Dr. Maria Cristina Vidal Pessolani (IOC - FIOCRUZ)**



---

**Dr. André Luiz Rodrigues Roque (IOC - FIOCRUZ)**



---

**Dr. Harrison Magdini Gomes (IOC - FIOCRUZ)**

---

**Dr. Carlos Wilson Gomes Lopes (DPA - UFRRJ)**

*“Não fui eu que lhe ordenei? Seja forte e corajoso!  
Não se apavore, nem se desanime, pois o Senhor, o  
seu Deus, estará com você por onde você andar.”*

**(Josué 1:9 – Bíblia Sagrada)**

*“Sei que podes fazer todas as coisas; nenhum  
dos teus planos pode ser frustrado.”*

**(Jó 42:2 – Bíblia Sagrada)**

*“Em ciência não existe um erro tão grosseiro  
que, amanhã ou depois, sob alguma  
perspectiva, não pareça profético.”*

**(Jean-Jacques Rousseau)**

*“A diferença entre um homem de sucesso e  
outro orientado para o fracasso é que um está  
aprendendo a errar, enquanto o outro está  
procurando aprender com seus próprios  
erros.”*

**(Confúcio)**

*A eles, provas irrefutáveis do amor incondicional, dedico este trabalho.  
A Deus, à minha família, em especial aos meus pais, Gerson e Jandira.  
Obrigada pelas oportunidades a mim garantidas, por sonharem o meu sonho e  
neles se realizarem.*

## AGRADECIMENTOS

Desejo expressar os meus agradecimentos a todos aqueles que, de alguma forma, permitiram a execução deste trabalho.

Primeiramente, registro minha total gratidão a *Deus*, Aquele quem plantou este sonho em meu coração e me concedeu sustento, sabedoria, equilíbrio e resiliência para chegar até aqui. Obrigada pelo amor real, leal e a abundante fidelidade na concretização desta etapa.

Aos meus pais, *Gerson Ferreira e Jandira Ferreira*, pela dedicação, participação, apoio e oportunidades a mim garantidas em todas as etapas alcançadas. Obrigada por serem meus alicerces e incentivarem em mim todos os sonhos do mundo.

Aos meus familiares, em especial, à minha avó, *Lenice Santana*, ao meu tio, *Jurandir Rocha*, e aos meus padrinhos, *Sérgio Lourenço, Sandra Cardoso e Euonice* pelo encorajamento, cuidado e apoio irrestrito. À minha sobrinha *Lara Marvilla*, pelo amor, alegria e inspiração, que transformaram meus momentos de tensão em momentos mais leves e descontraídos.

Ao meu professor e orientador *Douglas McIntosh*, por ter acreditado e concedido esta oportunidade de orientação. Obrigada pelo trato respeitoso, simples, correto e científico durante todos estes anos de trabalho. Por nunca ter permitido que o esmorecimento se instalasse, ainda que o trabalho e a vida pessoal estivessem com limitações e problemas. Agradeço ainda por todo o ensinamento e por me ajudar a ultrapassar todas as dificuldades que surgiram. Eu serei sua eterna fã.

Ao meu coorientor *Philip Noel Suffys*, por ter sido o primeiro a acreditar neste projeto, por prover o recurso financeiro para sua execução e ter sido o responsável pelas inúmeras oportunidades de colaborações que surgiram ao longo desses anos.

Agradeço à minha amiga e colaborada, *Emilyn Conceição*, pela amizade demonstrada, por sua inteira disponibilidade nas análises e suporte para interpretação dos dados de genotipagem molecular. Muito obrigada pela companhia nos finais de semana de trabalho e pelo apoio espiritual nos momentos mais desafiadores durante a conclusão deste trabalho.

À *Amanda Brum* e à *Fernanda Manta*. Muito obrigada por toda ajuda na área pessoal e técnica, sobretudo por me ajudar a dar os primeiros passos neste desafio científico.

À Dr<sup>a</sup>. *Maria Cristina Pessolani*, agradeço a boa disposição e o espírito de ajuda que sempre demonstrou. Muito obrigada por todos os ensinamentos ao longo desses anos.

À *Fernanda Marques*, pela colaboração e preciosa ajuda concedida no desenvolvimento dos ensaios sorológicos realizados no trabalho.

Aos colaboradores *Ismênia Glauce, Maurício Nobre, João Marcelo, Ilanna Oliveira e Gabriela Moura*, por contribuírem com a resolução das questões burocráticas para a obtenção das amostras dos pacientes, bem como com a realização do trabalho de campo viabilizando a captura e manipulação dos animais.

Ao Drº *Richard Truman* pela constante disponibilidade, contribuição e sugestões técnicas para a execução do trabalho.

Aos meus *colegas e amigos de laboratório e equipe de apoio predial*, do Laboratório Multiusuário de Biologia Molecular, Instituto de Medicina Veterinária, UFRRJ. Agradeço o bom convívio, as boas discussões e a alegria que por vezes se instalava. Em especial, agradeço aos meus amigos *Tássia, Daniel e Maristela*. Obrigada por me receberem tão bem e me proporcionarem boas gargalhadas.

Aos meus *colegas e amigos de laboratório e equipe de apoio predial* do Pavilhão Hanseníase-Fiocruz, pelo apoio, momentos de alegria e trabalho ao longo dos anos. Em especial, agradeço ao grupo querido do LABMAM: *Andrea, Viviane, Rafaela, Ícaro, Eloah, Carolina, Cecília, Luis, Vitoria, Lia, Sidra, Harrison, Adalberto, Marcia, Augusto e Jorge*. E de maneira muito saudosa, ao Sr. *Salles (in memorian)*, que me recebia muito bem aos finais de semana de trabalho, que ouvia meus lamentos e me dava sempre um lanche antes de ir embora. Agradeço também aos meus amigos do LAMICEL, em especial, a *Márcia, Débora, Robertha, Fabrício, Sabrina, Karina, Arthur, Leonardo e ao Flávio*, pela orientação no mestrado.

Aos professores do *PPGCV*, por todos os ensinamentos transmitidos, bem como ao secretário Arthur, por toda presteza e ajuda na condução dos aspectos administrativos e acadêmicos desta jornada.

Aos meus inúmeros *amigos pessoais*, sobretudo, ao *Caio Rodrigues, Juliana Macedo, Thiago Toledo, Rychelle Clayde e João Pedro*, por serem incentivadores desta etapa e de uma vida inteira. Muito obrigada por toda ajuda ao longo desses anos e por entenderem minhas tantas ausências em nome da ciência. Agradeço também o meu *amigo e pastor, Eraldo*, por ter atuado como um apoio emocional e espiritual durante este percurso.

À *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)* pelo recurso financeiro fornecido durante os 3 anos de execução deste trabalho. O presente trabalho foi realizado com apoio da *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001*.

À minha *equipe de trabalho na UFRJ* por me receber com respeito, carinho e me apoiarem na conclusão deste trabalho. Em especial, agradeço aos meus chefes imediatos, *Marcel e Mariana*, por serem fonte de inspiração para mim e compreenderem os momentos de estafa física e mental decorrente da dupla jornada. Aos meus amigos, *Gustavo e Ellen*, por me resgatarem em muitos momentos, pelo amor, incentivo e apoio irrestrito. À *Isabel, Bárbara, Beatriz, Caroline, Priscila*, e nossa coach *Luisa Braga*, por todo incentivo, partilha de experiências e compreensão. Vocês tornaram a conclusão deste trabalho possível e serei eternamente grata.

Por fim, e com o receio de esquecer algum agradecimento, reitero minha gratidão a todos aqueles que convivi e foram importantes direta ou indiretamente para a realização deste projeto, o qual representa uma etapa difícil e ao mesmo tempo gratificante da minha vida. Muito obrigada, pois cada um que passou pela minha vida durante este processo reafirmou em mim que a fartura nasce da partilha.



## BIOGRAFIA

Jessica da Silva Ferreira, filha de Gerson de Oliveira e Jandira da Silva Ferreira, nasceu em 26 de outubro de 1988, no bairro Campo Grande, zona oeste do município do Rio de Janeiro, RJ, Brasil. No ano de 2002, concluiu o ensino fundamental no Colégio Municipal Araújo Castro e sem muitas perspectivas, deslumbrava a carreira científica como um sonho longínquo e inacessível, pois reunia o esteriótipo de alguém que estagnaria na vida acadêmica. No entanto, em 2003 ingressou no Colégio Técnico da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CTUR - UFRRJ), onde obteve a habilitação técnica em agropecuária orgânica. Durante este período, viu sua curiosidade científica aumentar, bem como o anseio em alcançar o ensino superior na mesma instituição. Assim, em setembro de 2007, ingressou no curso de Medicina Veterinária na UFRRJ e até a sua conclusão, no ano de 2013, esteve envolvida com a área científica através de estágios de iniciação científica. Nestes, desenvolveu atividades nos Setores de Bioquímica do Departamento de Química na UFRRJ. Ainda desenvolveu projetos como acadêmica bolsista no Centro de Controle de Zoonoses da Subsecretaria de Vigilância, Fiscalização Sanitária e Controle de Zoonoses do município do Rio de Janeiro. O ciclo de estágios foi encerrado no ano de 2013, quando atuou como bolsista de iniciação científica e desenvolveu um projeto na área de hanseníase no Laboratório de Microbiologia Celular, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz. Posteriormente, no mesmo ano, iniciou o curso de Mestrado acadêmico no Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da FIOCRUZ, cujo projeto de pesquisa visava avaliar a possível participação de um artrópode na transmissão de *Mycobacterium leprae*, agente etiológico da hanseníase. Desde então, sua motivação em abordar temáticas pouco exploradas na área de hanseníase aumentou, sobretudo envolvendo aspectos epidemiológicos da doença. Assim, no ano de 2015, iniciou o presente projeto no Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ, a fim de obter seu Doutorado acadêmico. No segundo ano do curso, a mesma foi aprovada em concurso público para o provimento da vaga de técnica de laboratório (biotério) na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Assim, desde setembro de 2017, conciliou a execução deste trabalho com sua atividade enquanto servidora pública federal.

## RESUMO

FERREIRA, Jessica da Silva. **Evidências sorológicas e moleculares de infecção natural por *Mycobacterium leprae* em tatus (*Euphractus sexcinctus*) no estado do Rio Grande do Norte, Brasil.** 129p. Tese (Doutorado em Ciências, Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

A hanseníase é uma doença crônica e infecciosa com alto potencial para causar incapacidade física. Até recentemente, acreditava-se que *Mycobacterium leprae* era um patógeno exclusivamente humano. No entanto, a detecção de fontes não humanas da bactéria, mais notadamente em tatus, levantou questões sobre a cadeia de transmissão da hanseníase. Os tatus da espécie *Dasypus novemcinctus* são conhecidos por estarem envolvidos na manutenção e transmissão de *M. leprae* a humanos nos Estados Unidos da América (EUA), onde a hanseníase é classificada como uma zoonose. No Brasil, tatus (principalmente *D. novemcinctus*) naturalmente infectados por *M. leprae* foram relatados em algumas regiões. Além disso, o contato via caça, manejo, reprodução e consumo de carne de tatu é considerado um fator de risco para transmissão de *M. leprae* ao homem. No entanto, em contraste com os dados conclusivos apresentados nos EUA, as evidências que sustentam a existência de hanseníase zoonótica, envolvendo tatus no Brasil, são essencialmente sugestivas. O presente estudo avaliou tatus *Euphractus sexcinctus* (n=20), coletados em localidades rurais no estado do Rio Grande do Norte (RN), Brasil, para investigar infecção por *M. leprae*. O soro foi analisado através de dois ensaios imunoenzimáticos “in-house” (ELISAs) e dois testes imunocromatográficos de fluxo lateral (LF) comercialmente disponíveis (ML flow e NDO-LID®), a fim de detectar resposta ao PGL-I e LID-1, ambos antígenos da bactéria. A presença do DNA de *M. leprae* no tecido hepático foi analisado utilizando o elemento repetitivo específico de *M. leprae* (RLEP), como alvo em ensaios de PCR convencional e nested. Dados moleculares e sorológicos (ELISA anti-PGL-1) indicaram que 20/20 (100%) dos tatus foram infectados por *M. leprae*. Os níveis de detecção correspondentes aos testes LF, foram 17/20 (85%) e 16/20 (80%), para os testes de fluxo NDO-LID® e ML, respectivamente. A genotipagem de isolados de *M. leprae* oriundos de pacientes e tatus foi conduzida utilizando sistemas baseados em marcadores moleculares como Números Variáveis de Repetições Tandem (VNTRs) e Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs), quando possível. Estes perfis genotípicos foram combinados com os resultados de outros estudos brasileiros e internacionais, incluindo os de tatus nos EUA, para gerar um banco de dados. Análises baseadas em VNTRs evidenciaram que os isolados de *M. leprae* oriundos de *E. sexcinctus* são altamente relacionadas entre si. A análise comparativa dos isolados de *M. leprae* oriundos de *E. sexcinctus* com os perfis contidos na base de dados de VNTRs, embora evidenciasse correlação, não forneceu evidências definitivas para um perfil genético comum entre pacientes e tatus brasileiros. Portanto, dadas as deficiências nos perfis genotípicos das amostras oriundas de tatu e em uma porção substancial das oriundas dos humanos, devido a dificuldades encontradas na amplificação de alguns marcadores, seria incorreto afirmar que nossos dados forneceram evidências conclusivas da existência de perfil genotípico de *M. leprae* comum entre pacientes e humanos no Brasil. Recomenda-se que, para resolver esta lacuna, as melhorias nos protocolos de genotipagem baseada em VNTRs existentes devem ser uma prioridade para futuras pesquisas sobre este importante tópico. Apesar da natureza inconclusiva dos dados de genotipagem, concluiu-se que, em comum com *D. novemcinctus*, tatus *E. sexcinctus* representam um reservatório de *M. leprae* e, como tal, seu papel em um possível ciclo zoonótico de hanseníase no Brasil merece mais investigação.

**Palavras-chave:** *Mycobacterium leprae*, tatu, imunodiagnóstico, genotipagem, zoonose.

## ABSTRACT

FERREIRA, Jessica da Silva. **Serological and molecular evidences of natural *Mycobacterium leprae* infection in armadillos (*Euphractus sexcinctus*) in the state of Rio Grande do Norte, Brazil.** 129p. Doctoral Thesis (Doctoral in Sciences, Veterinary Sciences). Veterinary Institute, Department of Animal Parasitology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019

Leprosy is a chronic and infectious disease with a high potential for causing physical disability. Until recently, it was believed that *Mycobacterium leprae* was an exclusively human pathogen. However, the detection of non-human sources of the bacterium, most notably in armadillos, raised questions about the transmission chain of leprosy. Armadillos of the species *Dasypus novemcinctus* are known to be involved in the maintenance and transmission of *M. leprae* to humans in the United States of America (USA), where leprosy is classified as a zoonotic disease. In Brazil, armadillos (principally *D. novemcinctus*) naturally infected by *M. leprae* have been reported in some regions. In addition, contact via hunting, handling, breeding and consumption of armadillo meat are considered a risk factor for transmission of *M. leprae* to humans. Yet, in contrast to the conclusive data presented by in the USA, evidence to support the existence of zoonotic leprosy, involving armadillos, in Brazil is essentially suggestive. The current study evaluated twenty specimens of the six-banded armadillo (*Euphractus sexcinctus*), collected from rural locations in the state of Rio Grande do Norte (RN), Brazil for evidence of infection with *M. leprae*. Serum was examined using two “in-house” enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) and via two commercially available (ML flow and NDO-LID<sup>®</sup>) immunochromatographic lateral flow (LF) tests, for detection of the PGL-I and/or LID-1 antigens of the bacterium. The presence of *M. leprae* DNA in liver tissue was examined using the *M. leprae*-specific repetitive element (RLEP), as target in conventional and nested PCR assays. Molecular and anti-PGL-1-ELISA data indicated that 20/20 (100%) of the armadillos were infected with *M. leprae*. The corresponding detection levels, recorded with the LF tests were 17/20 (85%) and 16/20 (80%), for the NDO-LID<sup>®</sup> and ML flow tests respectively. Genotyping of *M. leprae* strains generated from patients in Mossoró, (RN) and armadillos was conducted using systems based on Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) and Variable Numbers of Tandem Repeats (VNTRs) molecular markers. Those profiles were combined with the findings of other Brazilian and international studies, including those from armadillos in the USA, to generate a database. Analyses, based on VNTRs, of the *M. leprae* samples from *E. sexcinctus* showed them to be highly related to each other. Comparative analysis of the *E. sexcinctus* samples with the profiles contained in the VNTR database did not provide definitive evidence for a *M. leprae* genetic profile common between human and armadillo in Brazil. Therefore, given the deficiencies in the profiles of both the armadillo samples and a substantial portion of the human isolates, due to difficulties encountered in the amplification of some markers, it would be incorrect to affirm that our data provided conclusive evidence the existence of a common *M. leprae* genetic profile in Brazil. It is recommended that, to resolve this uncertainty, improvements in the existing VNTR protocols should be made a priority for future research on this important topic. Despite the inconclusive nature of the genotyping data, it was concluded that, in common with *D. novemcinctus*, six banded armadillos represent a reservoir of *M. leprae* and as such, their role in a possible zoonotic cycle of leprosy within Brazil warrants further investigation.

**Key Words:** *Mycobacterium leprae*, armadillo, imunodiagnósticos, genotipagem, zoonose.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Sequências dos iniciadores utilizados para RLEP PCR. ....	38
<b>Tabela 2</b> - Repetições (VNTRs) selecionadas para o estudo, iniciadores utilizados e tamanho dos fragmentos esperados após amplificação. ....	41
<b>Tabela 3</b> - Iniciadores utilizados para genotipagem baseada no Polimorfismo de base única (SNP). ....	43
<b>Tabela 4</b> - Identificação, sexagem e padrão de peso dos tatus da espécie <i>Euphractus sexcinctus</i> oriundos de cinco municípios do Rio Grande do Norte. ....	47
<b>Tabela 5</b> - Dados clínicos e anatomopatológicos registrados para tatus da espécie <i>E. sexcinctus</i> (n=20) obtidos em cinco municípios do Rio Grande do Norte, Brasil. ....	48
<b>Tabela 6</b> - Avaliação piloto do teste rápido NOD-LID-1 empregando soros previamente analisados de tatus <i>D. novemcinctus</i> , caracterizados como positivos ou negativos em Ensaio de Imunoadsorção Enzimática (ELISA) executadas no Sudeste dos EUA; utilizando os antígenos específicos de <i>Mycobacterium leprae</i> , PGL-1 (A) ou LID-1 (B). ....	51
<b>Tabela 7</b> - Características de desempenho do teste NOD-LID-1 para detecção sorológica de <i>Mycobacterium leprae</i> em <i>Dasypus novemcinctus</i> em comparação com Ensaio de Imunoadsorção Enzimática (ELISA), utilizando os antígenos específicos de <i>M. leprae</i> PGL-1 (A) ou LID-1 (B). ....	52
<b>Tabela 8</b> - Detalhamento dos resultados sorológicos obtidos mediante análise de soro para investigar infecção por <i>Mycobacterium leprae</i> em tatus da espécie <i>Euphractus sexcinctus</i> (n=20) capturados em cinco municípios do Rio Grande do Norte, Brasil. ....	55
<b>Tabela 9</b> - Genotipagem de isolados de tatus com base na análise molecular usando 16 VNTRs. ....	64
<b>Tabela 10</b> - Análise comparativa entre os perfis genotípicos de <i>Mycobacterium leprae</i> com base em VNTRs reportados para tatus <i>Euphractus sexcinctus</i> e <i>Dasypus novemcinctus</i> do Brasil e dos EUA. ....	66
<b>Tabela 11</b> - Diversidade alélica baseada em 16-VNTRs para isolados de <i>Mycobacterium leprae</i> de pacientes de Mossoró, Rio Grande do Norte (1A) e para isolados de <i>M. leprae</i> de pacientes dos estados Rondônia e Pará, região norte e dos estados Ceará e Pernambuco, região Nordeste do Brasil (1B). ....	68
<b>Tabela 12</b> - Diversidade alélica de 16 loci de VNTRs e conjunto de loci de VNTRs utilizados nas análises comparativas entre isolados de <i>M. leprae</i> de tatus e pacientes. ....	74
<b>Tabela 13</b> - Municípios e localidades de coletas dos tatus. ....	120
<b>Tabela 14</b> - Genotipagem de isolados de <i>Mycobacterium leprae</i> de pacientes do município de Mossoró, Rio Grande do Norte, Brasil, através de 16 VNTRs e 3 SNPs. ....	123

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Formas clínicas da hanseníase.....	4
<b>Figura 2</b> - Modelo esquemático da organização do envelope celular micobacteriano.....	6
<b>Figura 3</b> - Taxas da incidência mundial de hanseníase reportadas à OMS (2017).....	10
<b>Figura 4</b> - Taxa de incidência da hanseníase por 100.000 habitantes por estado.....	11
<b>Figura 5</b> - Genótipos de <i>Mycobacterium leprae</i> definidos por SNPs.....	18
<b>Figura 6</b> - Disseminação da hanseníase pelo mundo.....	19
<b>Figura 7</b> - Mapa de ocorrência de tatus nos Estados Unidos.....	24
<b>Figura 8</b> - Tatus como hospedeiro natural da hanseníase.....	26
<b>Figura 9</b> - Distribuição do tatu da espécie <i>D. novemcinctus</i> no continente americano.....	27
<b>Figura 10</b> - Genótipos de <i>Mycobacterium leprae</i> identificados no sul dos EUA.....	29
<b>Figura 11</b> - Mapa de distribuição dos cinco locais onde os tatus foram coletados no estado do Rio Grande do Norte, Brasil.....	34
<b>Figura 12</b> - Manipulação de tatus da espécie <i>Euphractus sexcinctus</i> .....	35
<b>Figura 13</b> - Teste rápido de fluxo lateral.....	36
<b>Figura 14</b> : Mapa do estado do Rio Grande do Norte.....	40
<b>Figura 15</b> - Esquema ilustrativo do procedimento de detecção de VNTRs usando PCR e análise de comprimento de fragmento.....	42
<b>Figura 16</b> - Esquema ilustrativo da análise do Polimorfismo de base única (SNPs), através de PCR/RFLP e/ou sequenciamento.....	44
<b>Figura 17</b> - Avaliação clínica de tatus <i>Euphractus sexcinctus</i> oriundos de municípios do Rio Grande do Norte (RN).....	49
<b>Figura 18</b> -Avaliação anatomopatológica de tatus da espécie <i>E. sexcinctus</i> oriundos de municípios do Rio Grande do Norte (RN).....	50
<b>Figura 19</b> - Dosagem de anticorpos anti-PGL-I(IgM) observados em tatus <i>Euphractus sexcinctus</i> oriundos de cinco municípios do Rio Grande do Norte (RN).....	53
<b>Figura 20</b> - Dosagem de anticorpos anti-LID1 (IgG) em soros de tatus <i>Euphractus sexcinctus</i> oriundos de cinco municípios do Rio Grande do Norte.....	54

<b>Figura 21</b> - Avaliação comparativa da intensidade de bandas (facilidade de interpretação) para três soros representativos oriundos de tatus de <i>Euphractus sexcinctus</i> e examinados usando o teste de fluxo lateral ML flow teste (A) e o teste NDO-LID (B).....	57
<b>Figura 22</b> - Teste de sensibilidade de quatro ensaios de PCR para detecção do alvo RLEP...58	
<b>Figura 23</b> - Avaliação comparativa de dois métodos de extração de DNA de tecidos de fígado de tatu, através da análise por Rlep PCR usando os primers Rlep 2-1 & Rlep 2.2, proposto por Frota et al (2012) .....	59
<b>Figura 24</b> - Amplificação por RLEP PCR dos controles positivos e negativos de extração da avaliação comparativa de dois métodos de extração de DNA de fígado de tatu.....	60
<b>Figura 25</b> - Detecção molecular de infecção por <i>M. leprae</i> em tatus <i>E. sexcinctus</i> oriundos do Rio Grande do Norte, através de RLEP PCR. ....	61
<b>Figura 26</b> - Análises pós-amplificação (PCR-RFLP) de produtos (282 pb) gerados pelos iniciadores Rlep 2.1 e Rlep 2.2, usando DNA oriundo das amostras de fígado de <i>E. sexcinctus</i> como molde .....	62
<b>Figura 27</b> - A diversidade genética de <i>M. leprae</i> representada por dendrograma baseado em VNTRs para 33 amostras de Mossoró, Rio Grande do Norte, Brasil.....	70
<b>Figura 28</b> - Diversidade genética de <i>Mycobacterium leprae</i> representada por uma “Minimum Spanning Tree” (MST) baseada na análise de repetições em série variáveis (16 VNTRs) para 368 amostras clínicas de pacientes do Norte e Nordeste do Brasil. ....	71
<b>Figura 29</b> - Diversidade genética de <i>M.leprae</i> representada por uma “Minimum Spanning Tree” (MST) baseada na análise de repetições em série variáveis (11 VNTRs) para 368 amostras clínicas humanas do Norte e Nordeste do Brasil.....	72
<b>Figura 30</b> - Diversidade genética de <i>M. leprae</i> e análise comparativa entre pacientes e animais com base em 4 VNTRs, proposto por Lima et al. 2018. ....	76
<b>Figura 31</b> - Diversidade genética de <i>M. leprae</i> e análise comparativa entre pacientes e animais com base em 10 VNTRs, proposto por Truman et al. (2018).....	77
<b>Figura 32</b> - Diversidade genética de <i>M. leprae</i> e análise comparativa entre pacientes e animais com base em 11VNTRs .....	79
<b>Figura 33</b> - Genotipagem baseadas em 16 VNTRs para amostra de tatu (A4, RN, Brasil) e paciente (A751, PA, Brasil).....	80
<b>Figura 34</b> - Mapa da área de estudo.....	81
<b>Figura 35</b> - Mapa da área de estudo e avaliação da cobertura vegetal da área.....	82
<b>Figura 36</b> - Mapa da área de estudo e avaliação da topografia da área .....	83

**Figura 37:** Fluxograma dos procedimentos e análises realizadas com os animais, bem como com seus fragmentos de tecido (fígado). ..... 121

**Figura 38 -** Fluxograma dos procedimentos de genotipagem com base em VNTRs e SNPs. .... 122

## LISTA DE SIGLAS

°C	Graus Celsius
μM	Micromolar
a.C	Antes de Cristo
BAAR	Bacilo álcool-ácido resistente
BB	Hanseníase “Borderline bordeline”
BL	Hanseníase “Borderline” lepromatoso
BT	Hanseníase “Borderline” tuberculóide
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
et al.	e outros
EUA	Estados Unidos da América
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FL	Fluxo lateral
FLA	Fragment lenght analysis
H2SO4	Ácido Sulfúrico
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
LAMICEL	Laboratório de Microbiologia Celular
LABMAM	Laboratório de Biologia Molecular Aplicado à micobactérias
LAM	Lipoarabinomana
LID-1	Leprosy infections Disease Research Institute Diagnostic-1
LM	Lipomanana
MB	Hanseníase Multibacilar
mL	Mililitro
ML flow	Lateral Flow Test to detect <i>Mycobacterium leprae</i>
MLVA-FLA	Multiple Locus Variable-number Tandem Repeat Analysis – Fragment Length Analysis
mM	Milimolar
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
MST	Minimum spanning tree
NCBI	National Center for Biotechnology Information



<b>NHP</b>	Non-Human Primate
<b>ND-O-BSA</b>	Natural disaccharide linked to bovine serum albumin via octyl
<b>ND-O-HSA</b>	Natural disaccharide linked to human serum albumin via octyl
<b>NDVI</b>	Normalized Difference Vegetation Index
<b>nM</b>	Nanomolar
<b>NT-P-BSA</b>	Natural trisaccharide linked to bovine serum albumin via phenol
<b><i>nu/nu</i></b>	Camundongo nude
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PB</b>	Hanseníase paucibacilar
<b>PBS</b>	Phosphate-Buffered Saline
<b>PBST</b>	Phosphate-Buffered Saline Tween 20
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction
<b>PDIM</b>	Ftiocerol dimicocerosato
<b>PFGE</b>	Pulsed field gel electrophoresis
<b>PGL-I</b>	Phenolic glycolipid I
<b>PIMs</b>	Phosphatidylinositol mannoside
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>PQT</b>	Tratamento poliquimioterápico
<b>RLEP</b>	<i>M. leprae</i> -specific repetitive element
<b>RT-qPCR</b>	Reverse transcriptase PCR (RT-PCR)
<b>RFLP</b>	Restriction Fragment Length Polymorphism
<b>RN</b>	Rio Grande do Norte
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RT</b>	Room temperature
<b>SINAN</b>	Sistema Nacional de Agravos e Notificações
<b>SNP</b>	Single Nucleotide Polymorphism
<b>SUS</b>	Sistema Único de Saúde
<b>TMM</b>	Trehalose6-monomycolate
<b>UFERSA</b>	Universidade Federal Rural do Semi-Árido
<b>UFRRJ</b>	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
<b>VNTR</b>	Variable Number of Tandem Repeats
<b>WGS</b>	Whole genome sequencing
<b>WHO</b>	World Health Organization

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	1
2	REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1	Hanseníase: Considerações gerais .....	3
2.1.1	Agente etiológico .....	5
2.1.1.1	Aspectos microbiológicos e biológicos .....	5
2.1.1.2	Genoma de <i>Mycobacterium leprae</i> .....	7
2.1.2	Aspectos epidemiológicos: considerações gerais .....	8
2.1.2.1	Hanseníase no Brasil e no mundo .....	9
2.1.2.2	Hanseníase no Rio Grande do Norte e no município de Mossoró.....	11
2.2	Métodos diagnósticos para investigação de infecção por <i>Mycobacterium leprae</i> .....	12
2.2.1	Ensaio sorológicos .....	12
2.2.1.1	Ensaio moleculares baseados em reação de cadeia de polimerase (PCR) ..	14
2.2.1.2	Genotipagem molecular.....	15
2.2.1.3	Epidemiologia molecular: desafios na elucidação de aspectos epidemiológicos da hanseníase.....	20
2.2.2	Transmissão .....	21
2.2.2.1	Possíveis fontes ambientais e reservatórios não- humanos de <i>Mycobacterium leprae</i> .....	22
2.3	Tatu: Aspectos Biológicos e Distribuição Geográfica dos Tatus.....	23
2.3.1	Relevância do tatu na hanseníase: modelo de cultivo e reservatório de <i>Mycobacterium leprae</i> .....	25
2.3.2	...Possibilidade de transmissão zoonótica de <i>Mycobacterium leprae</i> entre tatus e humanos.....	28
3	OBJETIVOS .....	32
3.1	Objetivo Geral .....	32
3.2	Objetivos Específicos .....	32
4	MATERIAL E MÉTODOS .....	33
4.1	Local do Estudo.....	33
4.2	Captura de Tatus da espécie <i>Euphractus sexcinctus</i> .....	33
4.3	Análise Clínica e Coleta de Tecidos de Tatus da espécie <i>Euphractus sexcinctus</i> .....	34
4.4	Ensaio Sorológicos .....	35
4.4.1	Estudo piloto do teste rápido NDO-LID® utilizando amostras de soro de espécimes de <i>Dasybus novemcinctus</i> coletadas nos EUA .....	35
4.4.2	Testes imunocromatográfico de fluxo lateral .....	36
4.4.3	Ensaio de imunoabsorção enzimática – ELISA (do inglês “Enzyme-Linked <i>Immunosorbent Assay</i> ”) .....	36
4.5	Ensaio Moleculares .....	37
4.5.1	Extração de DNA de fígado de tatu <i>Euphractus sexcinctus</i> .....	37

4.5.2. Detecção do biomarcador RLEP de <i>Mycobacterium leprae</i> em DNA extraído de fígado de <i>Euphractus sexcinctus</i> através de PCR e “Nested” PCR.....	38
4.5.3. Avaliação pos-amplificação dos produtos do PCR através de polimorfismo do comprimento de fragmento de restrição da reação em cadeia da polimerase (PCR-RFLP) .....	39
4.6. Genotipagem .....	39
4.6.1 Amostragem.....	39
4.6.2. Obtenção de DNA oriundo de amostras de pacientes.....	40
4.6.3. Banco de dados de pacientes .....	40
4.6.4. Detecção de VNTRs usando PCR e análise de comprimento de fragmentos.....	41
4.6.5. Tipagem de polimorfismo de nucleotídeo único/ “Single nucleotide polymorphism” (SNP) .....	43
4.6.6. Análise de dados genotípicos, definição de clusters e comparação de genótipos.....	45
4.6.7. Diversidade alélica.....	45
4.7. Análise Espacial .....	45
4.8. Aspectos Éticos .....	46
5. RESULTADOS.....	47
5.1. Avaliação clínica e anatomopatológica dos tatus da espécie <i>Euphractus sexcinctus</i> analisados no estudo. ....	47
5.2. Avaliação da adequação do teste NDO-LID utilizando soros de tatus da espécie <i>Dasypus novemcinctus</i> .....	50
5.3. Análise sorológica de tatus <i>Euphractus sexcinctus</i> oriundos de cinco municípios do Rio Grande do Norte .....	53
5.4. Análise Moleculares .....	58
5.4.1. .... Avaliação de sensibilidade do sistema RLEP PCR convencional/ “NESTED” PCR.....	58
5.4.2. Avaliação comparativa entre dos métodos de extração de DNA .....	58
5.4.3. Detecção molecular de infecção por <i>Mycobacterium leprae</i> em tatus <i>Euphractus sexcinctus</i> oriundos do Rio Grande do Norte através de RLEP PCR.....	60
5.4.4. Identificação de <i>M. leprae</i> utilizando PCR RFLP .....	61
5.5. Genotipagem de <i>Mycobacterium leprae</i> .....	62
5.5.1. .... Genotipagem por VNTRs de isolados de <i>Mycobacterium leprae</i> oriundos de tatus das espécies <i>Euphractus sexcinctus</i> e <i>Dasypus novemcinctus</i> .....	62
5.5.2 Comparação entre genótipos de isolados de <i>M. leprae</i> presentes em <i>Euphractus sexcinctus</i> do Brasil e <i>Dasypus novemcinctus</i> dos EUA .....	65
5.6. Genotipagem (VNTRs e SNPs) de <i>Mycobacterium leprae</i> oriundos de pacientes de Mossoró, Rio Grande do Norte .....	67
5.7. Análise comparativa entre os genótipos das estirpes de <i>Mycobacterium leprae</i> oriundos de tatus e pacientes. ....	73
5.7.1. Criação do banco de dados referentes à genótipos determinados para isolados de pacientes e animais .....	73
5.7.2. Diversidade alélica dos marcadores VNTRs na população brasileira .....	73
5.7.3. Análise genotípica comparativa com base em VNTRs .....	75
5.8. Análise espacial da área de captura dos tatus <i>Euphractus sexcinctus</i> do Rio Grande do Norte.....	81

6.	DISCUSSÃO .....	84
7.	CONCLUSÕES .....	101
8.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	102
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	104

## ANEXOS

A - Tabela de municípios e localidades de coleta dos tatus .....	120
B - Fluxograma dos procedimentos e análises realizadas com os animais, bem como com seus fragmentos de tecido (fígado).....	121
C -Fluxograma dos procedimentos de genotipagem com base em VNTRs e SNPs.....	122
D - Genotipagem de isolados de <i>M. leprae</i> de pacientes oriundos do município de Mossoró, Rio Grande do Norte, Brasil, através de 16 VNTRs e 3 SNPs .....	123
E- Aprovação no Comitê de Ética no Uso de Animais (UFRRJ).....	125
F - Autorização para atividades com finalidade científica (SISBIO).....	127

# 1 INTRODUÇÃO

A hanseníase, causada pela infecção por *Mycobacterium leprae* é uma doença infecciosa, crônica e de considerável importância para a saúde pública. Recentemente, uma patogenia rara, única e letal da doença foi atribuída à infecção por *Mycobacterium lepromatosis*, a qual está restrita à algumas regiões do México e do Caribe, sendo reportada recentemente na Índia. O Brasil é o segundo país com o maior número de casos detectados em todo o mundo e possui a maior incidência da doença nas Américas, o que indica uma transmissão ativa de *M. leprae* na população.

Os altos níveis de transmissão recente no mundo evidenciam que é necessário o acompanhamento epidemiológico para entender e frear a disseminação deste agravo. Até recentemente, existia um consenso entre os hansenologistas de que *M. leprae* era um bacilo exclusivamente humano e transmitido por contato inter-humano.

No entanto, diferentes abordagens técnicas, incluindo estudos sorológicos, moleculares e histopatológicos, indicam a existência de fontes não-humanas do bacilo. Neste contexto, englobar aspectos da saúde humana, animal e ambiental, através de uma abordagem “One Health”, poderia ser altamente aplicável para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes para a compreensão e controle da hanseníase.

Evidências ao longo da história da susceptibilidade de tatu *Dasypus novemcinctus* à infecção por *M. leprae*, atreladas à descoberta desses mamíferos naturalmente infectados nas Américas e mais recentemente, a consolidação do caráter zoonótico da hanseníase no Sul dos EUA, confere a este mamífero, destaque nas investigações relacionadas a fontes não-humanas de *M. leprae*.

No Brasil, além dos *D. novemcinctus*, evidências de infecção natural em apenas um tatu da espécie *Euphractus sexcinctus* foram reportadas. Embora seja uma prática ilegal, o contato direto através da caça e o consumo desses mamíferos são comuns em diversas áreas rurais no território brasileiro.

Considerando que a prevalência de soropositividade para *M. leprae* reflete a taxa de infecção em uma população, as ferramentas sorológicas utilizando antígenos específicos do bacilo, atreladas às ferramentas moleculares mais sensíveis e específicas, possibilitam avaliar a prevalência e determinar tendências epidemiológicas sobre tatus naturalmente infectados em uma região.

Vale ressaltar, que alguns estudos tem apontado associação epidemiológica entre a exposição, o consumo de carne de tatu e a aquisição da hanseníase, principalmente nos casos de pacientes sem o histórico clínico de contato com outras pessoas acometidas pela doença.

No entanto, é evidente que desvendar a dinâmica de uma possível ocorrência de hanseníase zoonótica em algumas regiões do Brasil, incluindo o Rio Grande do Norte (RN), pode ser mais complexo do que no sul dos EUA, devido ao caráter heterogêneo da endemicidade da doença, apresentando municípios hiperendêmicos como Mossoró, e outros limítrofes, não prioritários, além da presença de diferentes espécies de tatus no território.

Além disso, as investigações da participação do tatu no cenário epidemiológico da hanseníase não são favorecidas pelas atuais propostas de pesquisa que se baseiam em triagem sorológica, inquéritos epidemiológicos e estudos de caso-controle. Neste cenário, a genotipagem molecular para caracterização de isolados de *M. leprae* circulantes em populações de tatu e humana auxiliaria a compreensão dos mecanismos de transmissão da hanseníase.

Estudos têm demonstrado que marcadores moleculares baseados em repetições em *tandem* (VNTRs) e polimorfismos de base única (SNPs), além de proporcionar uma

compreensão sobre a diversidade genética do patógeno, podem elucidar aspectos referentes à disseminação e epidemiologia da hanseníase.

Desta forma, o objetivo deste estudo foi utilizar ferramentas sorológicas, como ELISA e ML flow, para avaliar a ocorrência de infecção natural em tatus *Euphractus sexcinctus* oriundos de área rural de diferentes municípios do Rio Grande do Norte. Além disso, avaliar o potencial de um outro teste sorológico rápido, NDO-LID®, o qual vem sendo utilizado somente em triagem sorológicas em humanos, a fim de propor a utilização do mesmo como componente de um programa integrado de vigilância para se investigar a infecção em tatus.

Além das ferramentas sorológicas, neste estudo realizou-se a detecção molecular de *M. leprae* usando o elemento repetitivo específico de *M. leprae* (RLEP), como alvo em ensaios de PCR convencional e nested. Vale ressaltar, que também se implementou a genotipagem molecular baseada em VNTRs e SNPS para investigar a existência de correlação epidemiológica entre os isolados de *M. leprae* circulantes em tatus e humanos de diferentes regiões brasileiras e mundo.

Neste contexto, o intuito do presente estudo foi identificar e caracterizar isolados de *M. leprae*, a fim de compreender os aspectos epidemiológicos relacionados à transmissão desta bactéria e assim, contribuir para o desenvolvimento de estratégias de prevenção e controle da cadeia de transmissão do bacilo e conseqüentemente, reduzir a disseminação da hanseníase no Brasil.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Hanseníase: Considerações gerais

A hanseníase é uma doença infectocontagiosa que apresenta curso crônico e evolução lenta, cujo período de incubação varia de dois a sete anos. A infecção foi atribuída ao bacilo *Mycobacterium leprae* durante muitos anos, mas recentemente uma outra bactéria, *Mycobacterium lepromatosis*, foi associada à uma evolução clínica incomum e rara do agravo. Todavia, as evidências acerca da relação deste último microrganismo com a doença ainda são questionáveis (HAN et al., 2008; VERA-CABRERA et al., 2011).

Devido à predileção de *M. leprae* pelos macrófagos da pele e pela célula de Schwann nos nervos periféricos, a patogenia cursa com sinais e sintomas dermatoneurológicos, o que pode acarretar deformidades e incapacidades físicas (SCOLLARD et al., 2006).

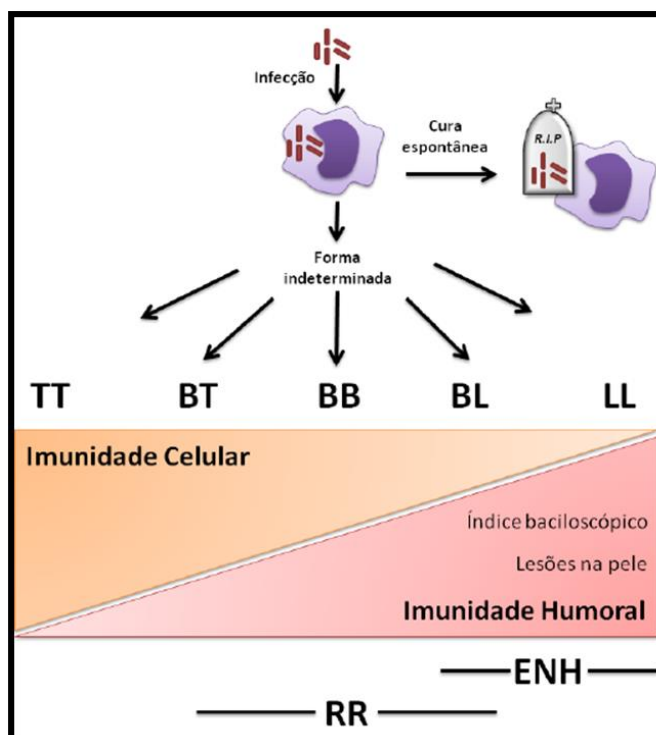
As primeiras descrições da doença foram registradas na Ásia (660 a.C.), na China (300 a.C.) e na Itália (100 a.C.), e o quadro clínico reportado ainda é semelhante ao descrito atualmente na hanseníase, como: a perda de sensibilidade, manchas brancas e avermelhadas, ulcerações, cegueira e deformações na face (ROBBINS et al., 2009; TRAUTMAN, 1984).

A palavra hanseníase, em substituição ao termo lepra, tornou-se obrigatória no território nacional em 1995, como tentativa de minimizar o estigma associado à doença (OPROMOLLA; MARTELLI, 2005). Assim, tratando-se da doença que mais produz incapacidade e deformidades físicas, além de sequelas psicológicas, dependência econômica e exclusão social, o curso patogênico deste agravo apresenta impacto econômico e social significativo (ILLARRAMENDI et al., 2012; RICHARDUS et al., 2004).

Considerando a grande diversidade no curso clínico da doença, cuja intensidade é determinada pela resposta imune do hospedeiro, a patogenia pode cursar com um número reduzido de lesões e acometimento discreto de nervos periféricos. Todavia, também podem ocorrer lesões infiltrativas e difusas na pele, nervos periféricos, mucosas do sistema respiratório superior, que podem inclusive avançar para testículos, olhos, linfonodos, baço e fígado (SALGADO et al., 2012).

A classificação da hanseníase baseada no aspecto, quantidade e agravamento das lesões, para fins operacionais e de tratamento, foi proposta pela OMS. Nesta classificação, o paciente que apresenta até cinco lesões cutâneas são considerados paucibacilares (PB) e os que apresentam mais de cinco lesões cutâneas são denominados multibacilares (MB).

Uma outra classificação bastante utilizada na pesquisa científica, proposta por Ridley & Jopling (1966), baseia-se nos aspectos clínicos evolutivos, imunológicos, baciloscópicos e histológicos. Nesta divisão, considera-se a imunidade dentro de um espectro de resistência do hospedeiro, onde são descritos dois polos opostos e três formas intermediárias. Assim, num pólo temos os casos considerados virchowianos, onde a resposta imune celular do hospedeiro é discreta ou ausente; já no outro extremo teremos os indivíduos denominados tuberculóides que apresentam maior grau de imunidade celular. Dentre as formas intermediárias temos os casos dimorfos ou borderline, os quais são subdivididos em dimorfo-tuberculóide, dimorfo-diformo e dimorfo-virchowiano (RIDLEY; JOPLING, 1966) (figura 1).



**Figura 1 - Formas clínicas da hanseníase.** Esquema demonstra o perfil espectral da doença. Representação baseada na classificação de Ridley e Jopling, 1966: TT (tuberculóide), BT (“borderline” tuberculóide), BB (“borderline borderline”), BL (“borderline” lepromatosa), LL (lepromatosa). Estão incluídos aspectos da resposta imune do paciente e os episódios reacionais, denominados RR (reação reversa) e ENH (eritema nodoso hansênico) que acometem principalmente indivíduos das formas clínicas indicadas para cada tipo de episódio reacional. Fonte: Toledo-Pinto (2013).

Durante a evolução da doença ou tratamento, os pacientes podem desenvolver surtos abruptos de complicações inflamatórias agudas, resultantes de reações imunológicas do hospedeiro. Estas podem ser denominadas de reações hansênicas do tipo 1 (reversa) e do tipo 2 (eritema nodoso), e são as principais causas de danos neurais e incapacidades físicas no curso da doença (SPENCER et al., 2012)

Esforços da comunidade científica e as estratégias da organização mundial de saúde (OMS), contribuíram para que a hanseníase se tornasse curável mediante protocolo terapêutico baseado na administração da poliquimioterapia (PQT), que consiste na utilização das drogas clofazimina, dapsona e rifampicina (WHO, 2016). Os esquemas de tratamento prescritos contemplam doses mensais com administração supervisionadas, doses diárias autoadministradas e variam de 6 (PB) a 12 (MB) meses (WHO, 2018).

O consenso de que o contato com pacientes multibacilares seja o principal fator de risco para o desenvolvimento da hanseníase, faz com que as estratégias de controle da hanseníase consistam essencialmente na busca ativa de pacientes e seus respectivos contatos (BAKKER et al., 2006).

Durante os anos subsequentes à implementação da PQT, registrou-se um significativo declínio na prevalência da hanseníase mundialmente. No entanto, no Brasil, a implementação da PQT em larga escala há mais de 27 anos como estratégia para interrupção da cadeia de transmissão, não tem alcançado efetivamente o seu objetivo. Assim, reporta-se inúmeras regiões brasileiras com taxas de incidência alarmante, evidenciando o pouco impacto desta estratégica na cadeia de transmissão (DA SILVA et al., 2018b; NOBRE et al., 2015).



As lições aprendidas com a implementação da PQT indicam claramente que novas abordagens precisam ser discutidas para enfrentar a hanseníase, já que a doença continua a se fazer presente em diversos países do mundo, sobretudo no Brasil.

Sendo assim, a manutenção da cadeia de transmissão do patógeno associado à doença, ajuda a sustentar a hipótese da participação de fontes não-humanas do bacilo, como solo, água, protozoários e/ou animais, no cenário epidemiológico da hanseníase. Assim, uma maior compreensão sobre a disseminação de *M. leprae* é uma prioridade iminente em pesquisa (BRATTSCHI et al., 2015).

## 2.1.1 Agente etiológico

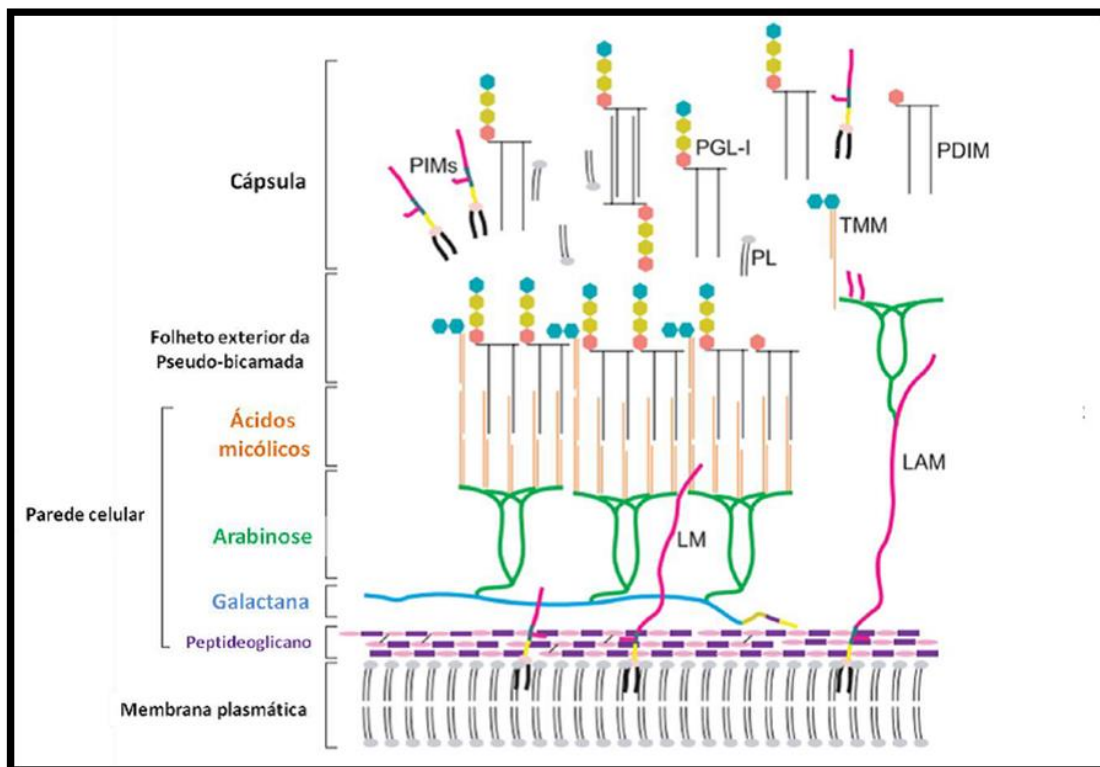
### 2.1.1.1 Aspectos microbiológicos e biológicos

*Mycobacterium leprae* foi descrito por Gerhard Armauer Hansen em 1873, sendo considerado o primeiro patógeno associado à uma doença humana (HANSEN, 1874). Apresenta-se sob a forma de bastonete ligeiramente encurvado ou reto, cujas dimensões são de 1,5 a 8 micrômetros ( $\mu\text{m}$ ), de comprimento por 0,2 a 0,5 $\mu\text{m}$  de largura; é aeróbio, imóvel e não forma endósporo, esporo ou cápsula (REES, 1985).

Trata-se de um bacilo intracelular obrigatório, que infecta com frequência dois tipos celulares do corpo humano: macrófagos de pele e células de Schwann (KAPLAN; COHN, 1986). A temperatura ótima para o seu crescimento é em torno de 30°C, o que pode justificar a presença do bacilo por áreas mais frias do corpo e ocorrência do quadro dermatoneurológico clássico da hanseníase (SHEPARD, 1965).

Uma das características marcantes das micobactérias é a membrana plasmática, formada por uma clássica bicamada de fosfolípídeos com proteínas intercaladas e outros compostos ligados não covalentemente: os fosfatidilinositolmanosídeos (PIMs) e a lipoarabinomanana (LAM). A micomembrana também é formada por uma bicamada lipídica constituída basicamente por glicolípídeos, que interagem com ácidos micólicos, estes, são covalentemente ligados aos resíduos terminais de arabinose da arabinogalactana.

Na região mais superficial da micomembrana é encontrada a camada capsular, que consiste de uma complexa matriz composta de proteínas, carboidratos e lipídeos, sendo essa estrutura variável entre as espécies. O bacilo *M. leprae* apresenta abundantemente na composição da sua cápsula um glicolípídeo específico, denominado glicolípídeo fenólico 1 (PGL-1 que possui características antigênicas significativas, sobretudo para utilização em estudos sorológicos. (HOFFMANN et al., 2008; SANI et al., 2010) (figura 2).



**Figura 2 - Modelo esquemático da organização do envelope celular micobacteriano.** Este esquema representa a organização das diferentes camadas do envelope micobacteriano. A membrana plasmática de *Mycobacterium leprae* é envolta por uma parede celular composta de peptidoglicano ligada covalentemente a arabinogalactana. Nesse arranjo podem ser encontrados componentes como lipomanana (LM) e lipoarabinomanana (LAM). Ácidos micólicos estão ligados nas porções terminais de arabinose. Na porção mais externa do envelope celular é encontrado: monomicolatotrealose (TMM), glicolípido fenólico 1 (PGL-I), monossídeo de fosfatidilinositol (PIMs), fitocérol de dimicocerosato (PDIM) e fosfolípidos (PL). Fonte: Adaptado de Vissa; Brennan (2001).

*Mycobacterium leprae* é considerado um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR), já que durante o processo de coloração descrito por Ziehl-Neelsen cora-se pela fucsina mas não é descorado por álcool e ácidos. Esta propriedade deve-se à alta concentração de lipídeos, especialmente ácido micólico, de sua parede celular. Vale ressaltar, que o bacilo não é bem corado pelo método de Gram.

O bacilo apresenta crescimento lento, com divisão binária em torno de 14 dias (COLE et al., 2001; SHEPARD, 1965). Apesar de todo o conhecimento adquirido desde a descoberta do patógeno, ainda não se conseguiu a chave para o seu crescimento em meios artificiais. Tal característica desafia os cientistas há anos e limita o avanço das pesquisas na área de hanseníase (STEFANI, 2008).

Vale ressaltar, que a impossibilidade de cultivo *in vitro*, levou a realização do cultivo deste bacilo em modelos animais. Assim, considerado o marco na pesquisa desta bactéria, o cultivo deste bacilo em camundongos imunocompetentes ou imunodeficientes (*nu/nu*) é realizado até os dias atuais, possibilitando a obtenção da bactéria viável para uso experimental (LOBATO et al., 2014; SHEPARD, 1962).

Além disso, a descorta da susceptibilidade de tatus à infecção por *M. leprae*, fez deste não só um modelo de cultivo do patógeno, mas também um modelo relevante para o estudo da patogenia da doença. Além dos humanos, tatus *Dasypus novemcinctus*, esquilos vermelhos (*Sciurus vulgaris*) e primatas não-humanos são os únicos hospedeiros naturais de *M. leprae*,

mas apenas os tatus reproduzem a patogenia da doença, como observada em humanos (AVANZI et al., 2016; HONAP et al., 2018; SHARMA et al., 2018)

Dessa forma, apesar de se pensar ao longo desses anos que todos os casos deste agravo milenar poderiam ser atribuídos apenas à infecção por *M. leprae*, recentemente uma outra bactéria, *M. lepromatosis* sp nov, foi associada à uma forma rara e única de hanseníase, e está aparentemente restrita ao México e Caribe. No entanto, em 2018, foi reportada a primeira ocorrência na Índia (AHUJA et al., 2018; HAN et al., 2008)

Reporta-se que este bacilo foi isolado a partir de dois pacientes que apresentarem um quadro com características clinico-patológicas descrito como hanseníase lepromatosa difusa (DLL) e vieram à óbito, após apresentarem esta evolução clínica incomum da doença. Além disso, foi reportada recentemente em esquilos vermelhos (*Sciurus vulgaris*) oriundos de áreas em que a hanseníase é considerada erradicada (AVANZI et al., 2016). Assim, acredita-se que esta espécie possa ser responsável por algumas das variabilidades clínicas e geográficas da hanseníase. (HAN et al., 2008, 2012).

Análises filogenéticas do gene 16S RNA ribossomal (16S rRNA), um marcador genético altamente conservado da evolução, revelaram uma divergência de 2,1% do gene 16S rRNA de *M. leprae* (HAN; JESSURUN, 2013). Além disso, reforçam que os organismos são relacionados e evoluíram de um ancestral comum. Reporta-se que *M. lepromatosis* pode ser identificada por nested PCR usando o 16S rDNA (HAN et al., 2012). No entanto, devido a identidade de 98% das sequências 16S rDNA entre as duas bactérias, tem sido sugerido explorar outras sequências mais específicas à *M. lepromatosis* (AHUJA et al., 2018; SINGH et al., 2015).

### 2.1.1.2 Genoma de *Mycobacterium leprae*

O sequenciamento do genoma completo do bacilo *M. leprae* só foi reportado no ano de 2001 (COLE et al., 2001). As análises evidenciaram a presença de uma grande quantidade de genes inativos em um genoma constituído por 3.268.203 pares de base (3,3 Mb) e com conteúdo de guanina+citosina (G+C) de 57,8%. Apenas 49,5% do genoma correspondem aos genes ativos, enquanto que 27% são constituídos de pseudogenes. No restante do genoma (23,5%) são encontradas as sequências regulatórias ou até mesmo “resquícios” de genes que sofreram mutação. Esta característica é surpreendente, quando se compara a outra micobactéria como *Mycobacterium tuberculosis*, que possui um genoma de 4,4 Mb com aproximadamente 90% de genes funcionais.

Assim, esta redução evolutiva teria resultado na eliminação de genes e várias vias metabólicas importantes, o que poderia implicar na inabilidade do bacilo de se multiplicar *in vitro*, na sua dependência de um nicho intracelular e no seu tempo de crescimento, o qual é considerado lento (AVNI et al., 2018; COLE et al., 2001; SINGH; COLE, 2011).

O genoma de *M. leprae* apresenta aproximadamente 2% de sequências repetitivas, sendo as duas principais formas de sequência de DNA repetitivas: as sequências dispersas e as sequências em tandem.

Em *M. leprae* existem apenas quatro famílias de repetições dispersas presentes no mínimo em cinco cópias: LEPRPT (5 cópias), LEPREP (8 cópias), REPLEP (15 cópias) e RLEP (37 cópias). Embora não tenha sido detectado polimorfismo no que se refere ao número de cópias de cada uma dessas repetições, dados da literatura demonstram que a sequência repetitiva RLEP localizada no gene *pol(A)* pode estar ou não presente em isolados de *M. leprae* (COLE et al., 2001; MONOT et al., 2009).

As repetições em *tandem* podem se apresentar como: i) repetições múltiplas de sequências de dois ou três nucleotídeos; ii) sequências mais complexas, como as duplicações

de segmentos cromossomais. As sequências de DNA que contém 2 a 6 pares de base (pb) e se repetem em *tandem* são classificados como microssatélites. Já as unidades repetitivas que contém de 10 a 100pb são classificadas como minissatélites

Assim, devido à sua abundância e alto grau de polimorfismo, estas sequências são consideradas bons marcadores genéticos e têm sido utilizadas na tipagem molecular deste bacilo (LAVANIA et al., 2011; SAEED; WANG; WANG, 2015; FONTES et al., 2017; LIMA et al., 2018).

Schuenemann et al., (2013) ao compararem o genoma de cinco cepas medievais com as encontradas em isolados clínicos em circulação em diferentes continentes, revelaram que em 7 séculos, o patógeno sofreu apenas 800 mutações e que se mantém praticamente idêntico (99,995%). Assim, considerando que todas as infecções decorrem de apenas um clone, a variabilidade de cepa não explicaria as diferentes evoluções e agravamentos clínicos (FOSS, 1999; SCHUENEMANN et al., 2013).

Vale ressaltar, que o estudo do genoma de *M. leprae* contribui não só para solucionar questionamos microbiológicos, mas possibilita a elucidação de componentes envolvidos nos mecanismos de interação parasita-hospedeiro. Além disso, tem favorecido o desenvolvimento e refinamento de testes diagnósticos, bem como o avanço nos estudos epidemiológicos relevantes para a compreensão da doença.

### **2.1.2 Aspectos epidemiológicos: considerações gerais**

Estudos epidemiológicos apontam que cerca de 90% da população humana apresenta resistência à hanseníase e embora tenha contato com o bacilo, não adoece. No entanto, àqueles indivíduos susceptíveis, uma vez infectados, apresentarão sintomas após um longo período de incubação, variável de três a cinco anos (TRAUTMAN, 1984).

O aparente agrupamento da hanseníase em algumas regiões podem sugerir a associação de certos ambientes, certos grupos sociais, condições de saúde ou comportamentos que predispõem a transmissão de *M. leprae* e/ou manifestação da doença clínica (BRATSCHI et al., 2015).

A despeito da implementação da PQT como estratégia para interrupção da cadeia de transmissão da hanseníase e todos os esforços para a eliminação da doença, esta até o momento, ainda configura-se um relevante agravo de saúde pública em diferentes regiões, localizadas no sudeste da Ásia, África, Pacífico Oriental, Mediterrâneo Ocidental e nas Américas, ainda concentram um grande número de casos sobretudo o Brasil.

Embora as taxas de prevalência venham apresentando um declínio, diversas regiões encontram-se com alta endemicidade, demonstrando a pouca eficiência da PQT na interrupção na cadeia de transmissão (WHO, 2018). Assim, as lições aprendidas com a implementação desta estratégia, evidenciam que novas abordagens precisam ser discutidas para enfrentar este agravo.

Ao longo dos anos, vários estudos têm mostrado uma associação entre a exposição aos tatus por meio da caça, limpeza e consumo da carne e o desenvolvimento da hanseníase (CLARK et al., 2008;; DEPS et al., 2008a; TRUMAN, 2008; KERR et al., 2015; DA SILVA et al., 2018). Estudos de caso-controle realizados em regiões brasileiras endêmicas para hanseníase, indicaram que o contato humano com tatus aumenta o risco de hanseníase no Espírito Santo e Ceará (DEPS et al., 2008; KERR et al., 2015).

No entanto, houve um estudo anterior, que verificou se o consumo de carne de tatu teria um efeito sobre a incidência de hanseníase, mas nenhuma associação foi encontrada. Vale ressaltar, que o estudo foi realizado no Sul do país, Curitiba, Paraná, e esta área

apresenta média endemidade (<1 caso novo por 10.000 habitantes), bem como não há evidências de tatus naturalmente infectados por *M. leprae* (SCHMITT et al., 2010).

As estratégias globais de eliminação da hanseníase direcionam esforços considerando somente a participação de humanos na cadeia de transmissão. Neste contexto, a observação repetida da hanseníase clínica em indivíduos sem história aparente de exposição a outros casos conhecidos, a constatação de que a doença se agrupa em áreas específicas (perto de fontes de água) e a descoberta de animais naturalmente infectados por *M. leprae* na natureza (tatus, esquilos e primatas), bem como evidências da presença do bacilo em solo e água, sugerem fortemente a presença de fontes não-humanas do bacilo em áreas endêmicas e não-endêmicas para hanseníase (DA SILVA et al., 2018; FROTA et al., 2012; HONAP et al., 2018; KERR et al., 2015; TIÓ-COMA et al., 2019).

Além disso, mais recentemente, *M. lepromatosis* foi reportado em esquilos vermelhos (AVANZI et al., 2016). Assim, aponta a necessidade de se compreender melhor o papel de fontes não-humanas no contexto epidemiológico da hanseníase, direcionando e impulsionando diferentes estudos para a elucidação de aspectos epidemiológicos ainda não esclarecidos. Neste contexto, a adoção de uma abordagem pautada no conceito “One Health”, a qual abrange aspectos da saúde humana, animal e ambiental, poderia ser altamente relevante para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes para a compreensão dos aspectos epidemiológicos deste agravo (THIRUNAVUKKARASU et al., 2017; TIÓ-COMA et al., 2019).

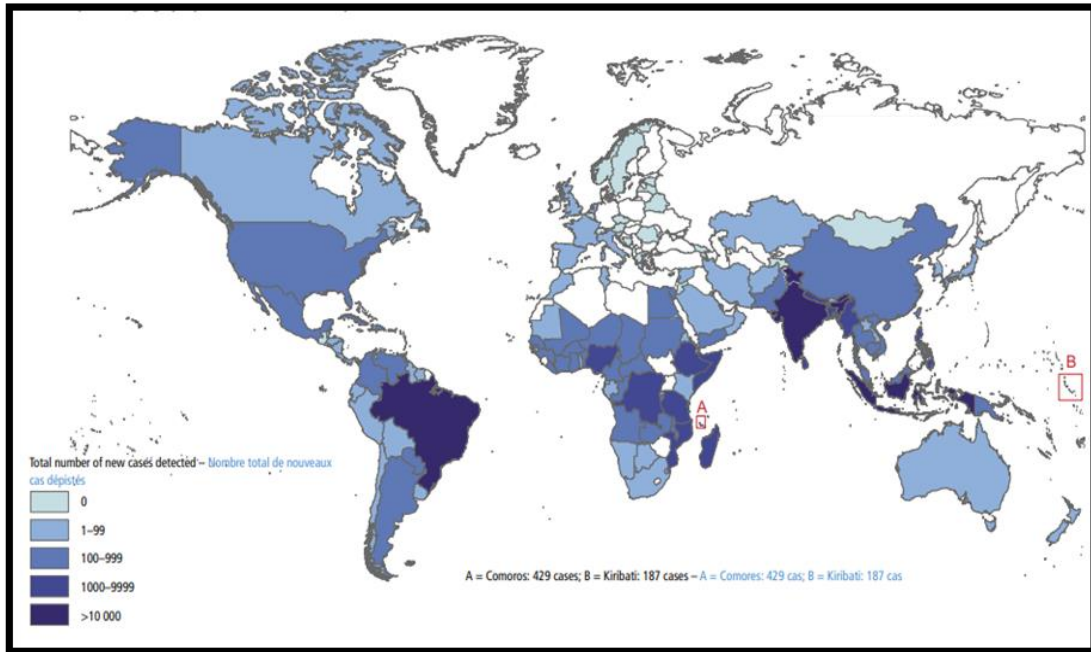
### **2.1.2.1 Hanseníase no Brasil e no mundo**

Com o uso da PQT e implementação de estratégias da OMS, embora a prevalência mundial da hanseníase tenha apresentado um decréscimo significativo, diminuindo de > 5 milhões de casos nos anos 80 para <200.000 em 2016, a doença ainda constitui um problema mundial de saúde pública (BRATSCHI et al., 2015; DA SILVA et al., 2018).

Em algumas regiões, o número de casos de hanseníase está abaixo do limiar de eliminação de um caso por 10.000 pessoas conforme definido pela Organização Mundial de Saúde (OMS). No entanto, de acordo com relatórios oficiais, a prevalência global registrada no final de 2017 foi de 192 713 casos (0,25 / 10.000 habitantes), indicando um aumento de 20.765 casos em relação a ano de 2016.

Este aumento foi observado em todas as regiões avaliadas pela OMS, sobretudo, nos continentes africano e americano, os quais reportaram 42,8% (n = 9189) e 19,5% (n= 5162) dos casos, respectivamente (WHO, 2018).

No âmbito mundial, a Índia ocupa o primeiro lugar em prevalência de hanseníase, seguida pelo Brasil (figura 3).



**Figura 3 - Taxas da incidência mundial de hanseníase reportadas à OMS (2017).** As taxas de novos casos referem-se a cada 100.000 habitantes. Fonte: Adaptado de OMS, 2017.

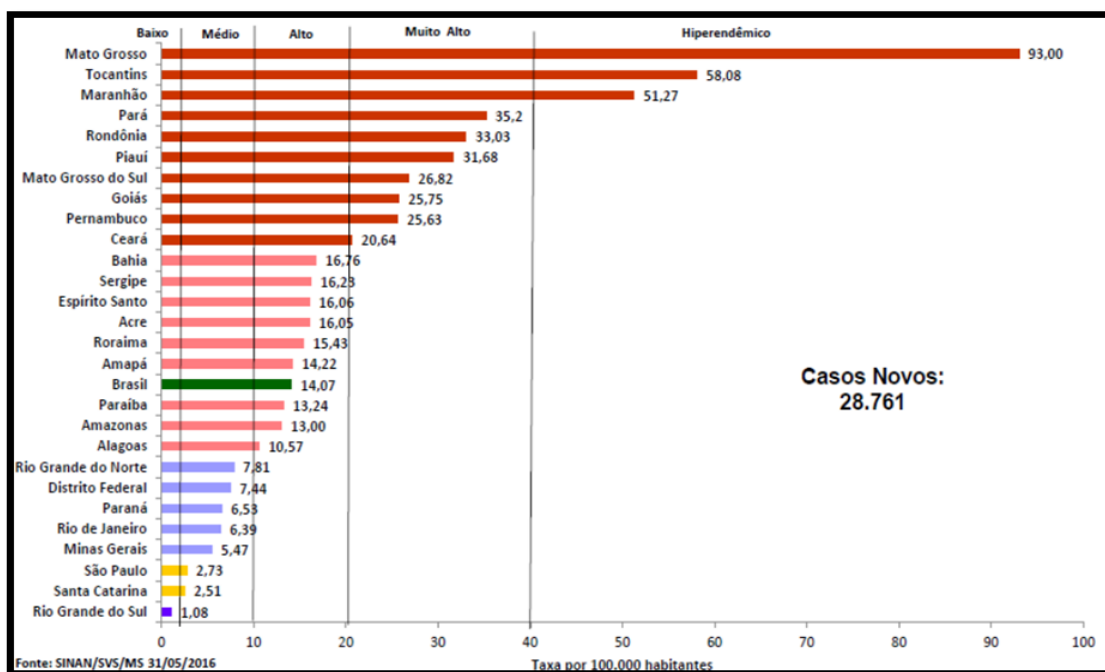
Além disso, apesar do uso quase universal da PQT, implementada com intuito de reduzir a transmissão da doença, o número anual de novos casos detectados, incluindo casos reportados em crianças, tem se mantido elevado.

Globalmente, Índia, Brasil e Indonésia representam 80,2% dos novos casos reportados no ano de 2017. Apesar de ter sido verificada uma redução geral no número de novos casos detectados em comparação com 2016, uma situação contrária foi observada em 6 países, além do Brasil (WHO, 2018).

No ano de 2017, o número total de casos novos de hanseníase registrados no Brasil foi de 26 875, dos quais 1.718 (7,5%) foram em menores de 15 anos, correspondendo a taxa de detecção de 3,72 casos por 100.000 habitantes, o que indica transmissão recente por fontes ativas. O Brasil, que apresenta a situação mais desfavorável das Américas, contribuindo com 92,3% dos novos casos de hanseníase reportados no continente (WHO, 2018).

Tais registros indicam que as medidas de controle atuais não conseguiram frear o fluxo de transmissão de *M. leprae*. Vale ressaltar, que os números apresentados provavelmente subestimam a incidência e a prevalência real da doença, já que a maioria das pessoas no Brasil afetadas pela hanseníase vivem em áreas rurais, onde o acesso aos serviços de saúde é limitado.

A doença em território brasileiro apresenta-se distribuída de forma heterogênea. Dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) reportam que em 2015 a taxa de detecção geral de casos novos de hanseníase no país foi de 14,07/100.000 habitantes, sendo as regiões Norte (29,65/100.000 hab.), Nordeste (22,72/100.000 hab.) e Centro-Oeste (44,30/100.000 hab.), aquelas com as maiores taxas (Figura 4) (DA SILVA et al., 2018; SINAN, 2016) (figura 4).



**Figura 4 - Taxa de incidência da hanseníase por 100.000 habitantes por estado. Brasil, 2015. Fonte: SINAN/SVS/MS/2016.**

Embora as estratégias para o enfrentamento global da hanseníase tenham sido estabelecidas desde 2000, o Brasil não alcançou as metas estabelecidas. Em 2016, a OMS lançou a Estratégia Global para a Hanseníase para o período de 2016 até 2020. Dentro desta nova proposta, o Brasil visa reduzir os registros de ocorrência da doença em três pilares: fortalecer o controle, a coordenação e as parcerias do governo; combater a hanseníase e suas complicações; enfrentar a discriminação e promover a inclusão.

Estes pilares abrangem a detecção precoce de casos, o tratamento imediato com esquema de poliquimioterapia (PQT), o desenvolvimento de pesquisas básicas e o enfrentamento do estigma, promovendo a mobilização e sensibilização junto à comunidade (WHO, 2016).

No entanto, é notório que se faz necessário a análise epidemiológica considerando outros aspectos, como a busca de novas fontes de infecção com o intuito de elucidar os aspectos epidemiológicos ainda não explicados. Assim, seria possível subsidiar os processos de elaboração, execução e instituição de políticas públicas para o enfrentamento deste agravo milenar e complexo de ser solucionado, sobretudo em território brasileiro.

### 2.1.2.2 Hanseníase no Rio Grande do Norte e no município de Mossoró

O Rio Grande do Norte (RN) é um estado brasileiro que registrou uma taxa de 8,21 novos casos de hanseníase por 100.000 habitantes em 2013, um valor significativamente menor do que observados nos estados nordestinos vizinhos.

Evidências históricas apontam que a doença foi introduzida tardiamente no estado, devido ao fluxo migratório de pessoas para a região Norte do país, a fim de trabalhar na região Amazônica durante o período das grandes secas e o posterior retorno para os seus respectivos locais de origem, na região Nordeste, anos mais tarde.

Na região Norte, sobretudo no Pará, a endemia já era um problema desde 1804, o início do século XIX, 60 anos antes dos primeiros casos serem reportados no Rio Grande do Norte e Ceará, estado vizinho.

Mossoró, é a segunda cidade mais populosa do Estado do Rio Grande do Norte (RN), com uma população urbana que aumentou de 192.267 no censo de 1991 para 291.937 habitantes no censo mais recente, realizado em 2016. A cidade de Mossoró, incluindo as áreas rurais, apresenta uma extensão de 2.110.207 km<sup>2</sup> (NOBRE et al., 2015).

A incidência de casos no município de Mossoró em 2013 foi de 45,4 casos / 100.000 pessoas / ano, o que representa quase metade dos casos novos no RN. Assim, de acordo com os critérios do Ministério da Saúde, o município é classificado como hiperendêmico para a hanseníase. Em 2017, foram registrados 253 novos casos no Rio Grande do Norte e Mossoró foi o município do estado com mais casos de hanseníase notificados em 2017 (DATASUS, 2018).

A hanseníase é uma doença de notificação compulsória e investigação obrigatória e um sistema estruturado é fundamental para um programa de controle e promoção da saúde. No entanto, um trabalho realizado com profissionais de saúde do Rio Grande do Norte, aponta que quando não se reporta a limitação quanto ao número de profissionais na área de saúde, àqueles treinados para detecção de casos, se desligam dos serviços configurando alta rotatividade na Atenção Básica à Saúde.

Assim, acabam desestruturando as ações que pautam a atual medida de prevenção da doença, ou seja, detecção precoce e acompanhando de casos e respectivos contatos no estado (MORENO; ENDERS; SIMPSON, 2008)

## **2.2. Métodos diagnósticos para investigação de infecção por *Mycobacterium leprae***

O diagnóstico da hanseníase em humanos é essencialmente baseado nas manifestações clínicas e exames dermatoneurológicos, correlacionados à história epidemiológica. Embora testes laboratoriais apresentem limitações na detecção de todas as formas clínicas da hanseníase, têm auxiliado o diagnóstico clínico.

Dentre eles, destacam-se a baciloscopia, os exames histopatológicos, os testes sorológicos quantitativos como o ELISA (do inglês, “Enzyme-linked Immunosorbent Assay”) e semi-quantitativos, como o teste de fluxo lateral, bem como os ensaios moleculares para a detecção do bacilo, principalmente baseados na técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) (BANG et al., 2009; BRAET et al., 2018; WHO, 2016).

Em animais, sobretudo em tatus, a investigação de infecção por *M. leprae* tem sido realizada através de análises sorológicas, moleculares, clínicas e histopatológicas (DA SILVA et al., 2018; DEPS et al., 2008b; FROTA et al., 2012).

### **2.2.1. Ensaio sorológicos**

O cultivo de *M. leprae* em tatus da espécie *Dasypus novemcinctus*, que teve início ainda na década de 1970, impulsionou os estudos em hanseníase (KIRCHHEIMER; STORRS, 1971). A possibilidade de se obter uma quantidade significativa de bacilos em modelo animal, proporcionou avanços científicos importantes, como a descoberta e identificação do antígeno PGL-1 (glicolípido fenólico 1) (BRETT et al., 1983; MOURA et al., 2008). Esta molécula espécie-específica é o principal glicolípido antigênico do bacilo.



Devido a natureza glicídica do PGL-I há um estímulo de produção predominante de anticorpos da classe IgM, principalmente no polo virchowiano (BRETT et al., 1983).

A molécula PGL-1 é composta por um trissacarídeo único, o 3,6-di-*O*-metila- $\beta$ -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-2,-3-di-*O*-metila- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-3-*O*-metila-Lramnopiranosil. No entanto, o principal determinante antigênico da molécula é a porção terminal, composta por dissacarídeo e trissacarídeo (BRETT et al., 1983)

Estudos posteriores alavancaram ainda mais a pesquisa na área da sorologia da hanseníase. Assim, foi possível a elaboração de glicoproteínas semi-sintéticas contendo os componentes dissacarídeo (ND) ou trissacarídeo (NT) sintético. Estes componentes por meio de diferentes proteínas de ligação, como os radicais *octyl* (O) ou *phenyl* (P), se apresentam conjugados à albumina de soro bovino (BSA) ou humana (HSA).

Assim, além do PGL-1 nativo, os neoglicolipídeos produzidos e disponibilizados para pesquisas atuais são: dissacarídeo natural-octil-BSA (ND-O-BSA), dissacarídeo natural-octil-HSA (ND-O-HSA), trissacarídeo natural-fenol-BSA (NT-P-BSA); bem como monossacarídeo-octil-BSA (M-O-BSA), dissacarídeo-BSA (D-BSA) (BÜHRER-SÉKULA, 2008; MOURA et al., 2008)

Através do uso do PGL-1 nativo e seus derivados semi-sintéticos foi possível desenvolver diferentes testes sorológicos para aplicações em estudos de diagnóstico clínico e epidemiológicos, tais como o teste de hemaglutinação passiva (PHA), o teste de aglutinação com partícula de gelatina (MLPA), *dipstick*, o Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (do inglês “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay” -ELISA) e o teste de fluxo lateral (FL) (BÜHRER-SÉKULA, 2008; GELUK, 2013).

Estudos mais recentes reportam a utilização do antígeno LID-1. Este trata-se de uma proteína de fusão das proteínas recombinantes ML0405 e ML2331 (DUTHIE et al., 2007). A resposta de anticorpo gerada, da classe IgG, correlaciona-se positivamente com a carga bacilar e com a forma multibacilar de infecção, assim como no teste para detecção de resposta IgM anti-PGL-1 (DUTHIE et al., 2007; DUTHIE et al., 2008; DUTHIE et al., 2011).

A detecção de anticorpos séricos contra o glicolipídeo fenólico-1 (PGL-1; mais comumente na forma do dissacarídeo natural-octil de PGL-I = ND-O) ou para o LID-1 (REECE et al., 2006), tem sido usada em ELISA e em testes imuno-cromogênicos de fluxo lateral (FL) para confirmar a exposição ao *M. leprae*. Estes testes facilitam o diagnóstico diferencial entre as formas paucibacilares e multibacilares da doença em humanos e são capazes de prever infecção em animais vivos, incluindo tatus *Dasyurus novemcinctus* nos EUA e no Brasil (DEPS; ANTUNES; TOMIMORI-YAMASHITA, 2007; DUTHIE et al., 2014; MARÇAL et al., 2018).

Neste contexto, as técnicas de ELISA são consideradas o método padrão-ouro dos ensaios sorológicos (DEPS et al., 2008b; FRADE et al., 2017). No entanto, a utilização deste método requer padronização, infraestrutura adequada para a sua execução e as amostras devem ser transportadas sob condições que mantenham a integridade do material recolhido. Assim, este método é considerado inviável em algumas aplicações e estudos, sobretudo quando se trata de triagem sorológica em estudo de campo (DUTHIE et al., 2014).

Neste contexto, o desenvolvimento e aplicação de testes imunológicos rápidos para uso em diagnóstico de hanseníase em humanos é de suma importância para abordagens integradas que visem a vigilância da doença (BÜHRER-SÉKULA et al., 2007; FRADE et al., 2017; CARDOSO et al., 2013). No Brasil, dois principais testes imuno-cromogênicos de fluxo lateral são usados atualmente: o ML Flow e o NDO-LID<sup>®</sup>.

O primeiro a ser introduzido foi o teste de fluxo ML flow, um sistema de antígeno único (NT-P = trissacarídeo-octil de PGL-1) que detecta anticorpos IgM humanos (BÜHRER-SÉKULA et al., 2007; DEPS; ANTUNES; TOMIMORI-YAMASHITA, 2007).

A utilização do teste ML flow nos programas de vigilância da hanseníase no Brasil contribuiu para a redução do número de casos tratados como multibacilares, o que ocasionou

uma redução do uso de medicamentos antimicobacterianos (GROSSI et al., 2008). A eficiência deste kit também foi avaliada com relação ao ELISA com o intuito de verificar o estado de infecção de tatus *D. novemcinctus* no estado brasileiro do Espírito Santo e evidenciou 29,7% (11/37) de positividade, comparado a 10, 6% (5/37) positivos diagnosticados através de ELISA (DEPS et al., 2007; DEPS et al., 2008b).

O segundo teste de fluxo lateral implementado foi o NDO-LID®, que combina o antígeno NDO conjugado com a proteína de fusão LID-1. Este teste é descrito como um método semi-quantitativo de IgM / IgG. Foi introduzido devido as preocupações de que testes baseados apenas na detecção de anticorpos anti-PGL-I IgM não seriam eficientes na detecção das formas paucibacilares da doença, resultando em diagnóstico tardio (CARDOSO et al., 2013; DUTHIE et al., 2014). A superioridade deste teste, comparado ao ELISA convencional usando PGL-I como antígeno, para a detecção de episódios reacionais do tipo II ou eritema nodoso hansênico foi relatada recentemente (DEVIDES et al., 2018).

Abordagens integradas e baseadas em ferramentas sorológicas podem favorecer as investigações epidemiológicas, sobretudo a busca por fontes não-humanas de infecção como os tatus. Isto é possível, devido à reatividade cruzada entre as imunoglobulinas de tatu e humanos, podendo ser detectadas pelos conjugados anti-humanos IgM ou proteína G empregados nos testes (DUTHIE et al., 2014; SCOLLARD et al., 2006; TRUMAN et al., 1991). No entanto, em contraste com o sistema de fluxo ML, até o momento o teste NDO-LID® só foi utilizado para avaliar o estado de infecção em humanos.

Estudos utilizando ferramentas sorológicas, mais tarde reforçados com a investigação histopatológica e molecular, revelaram a associação entre tatus e a manutenção da Hanseníase nas regiões Sul e Sudeste dos EUA (SHARMA et al., 2015; TRUMAN et al., 2011) e também a existência destes animais infectados naturalmente em território brasileiro (DEPS et al., 2007; DEPS et al., 2008b). No entanto, no Brasil os estudos e as aplicações de ferramentas sorológicas na busca de fontes não-humanas de infecção ainda são discretos.

### **2.2.1.1. Ensaios moleculares baseados na reação em cadeia de polimerase (PCR)**

O sequenciamento do genoma e a descoberta de sequências espécie-específicas de *M. leprae* possibilitaram maiores avanços no diagnóstico laboratorial da Hanseníase (BRAET et al., 2018; CURTISS et al., 2001). Assim, em comparação aos métodos convencionais, os testes moleculares têm um grande potencial para detecção de *M. leprae* nos tecidos, pois são mais sensíveis (CLARK-CURTISS; DOCHERTY, 1989; HAMPSON et al., 1989; KATOCH, 2004).

A identificação molecular de *M. leprae* consiste na amplificação de regiões específicas do DNA do bacilo. Diferentes genes-alvo têm sido utilizados e comparados, tais como: genes codificantes de proteínas como 36-kDa, 18-kDa, 65-kDa, Ag 85B e 16S rRNA, e sequências de repetição (ADAMS et al., 2012; KAMPIRAPAP et al., 1998; MARTINEZ et al., 2006, 2009, 2014; PLIKAYTIS; GELBER; SHINNICK, 1990)

Em 1989, foi descoberta uma sequência repetitiva e específica possibilitando a detecção do que seria equivalente a  $4 \times 10^3$  células de uma lesão através da técnica de hibridização (CLARK-CURTISS; DOCHERTY, 1989). No ano seguinte, WOODS; COLE, 1990 denominaram a sequência, como RLEP e relataram que haveria, no mínimo, 28 cópias e 12 diferentes classes. (WOODS; COLE, 1990). Após o sequenciamento do genoma completo reportaram que a sequência RLEP possuiu 37 cópias no genoma, sendo este achado consolidado até hoje (COLE et al., 2001)

Ensaios usando o RLEP como alvo tem demonstrado maior sensibilidade e especificidade na identificação do bacilo quando comparada a outros alvos de cópia única

como Ag85B, *sodA*, 16S rRNA e *rpoT* (DONOGHUE, H.D.SPIGELMAN, M.HOLTON, 2001; MARTINEZ et al., 2011; TURANKAR et al., 2015)

A fim de investigar as evidências de que o alvo RLEP não seria específico para *M. leprae*, Braet et al. (2018), verificaram a especificidade “in silico” e experimentalmente do alvo. Assim, sequências primárias, bem como sequências da sonda de qPCR RLEP foram comparadas com o banco de dados contendo 148 genomas micobacterianos sequenciados de estudos recentes, e nenhuma possibilidade de reatividade cruzada foi reportada (BRAET et al., 2018).

Além disso, não se reporta a presença de sítios idênticos de ligação para as sequências primárias e sonda para o alvo RLEP em outras micobactérias depositadas na atual base de dados do NCBI. Assim, diminui a probabilidade de que novas espécies de micobactérias com sequências homólogas de RLEP possam ocorrer.

Neste mesmo trabalho, reportam que durante as análises experimentais, nenhuma amostra de pacientes controles não-hansênicos oriundos de áreas endêmicas (n=31) e não endêmicas (n=28), bem como nenhum dos 61 isolados de diferentes espécies de micobactérias, incluindo àquelas estreitamente relacionado, evidenciou positividade na análise por qPCR do RLEP. Assim, estes dados sugerem 100% de especificidade do alvo RLEP para *M. leprae* (BRAET et al., 2018).

Portanto, esta sequência tem sido implementada por não apresentar homologia com outras micobactérias ou espécies bacterianas, conferindo especificidade adequada para análise de amostras ambientais, tornando-a mais robusta (BRAET et al., 2018; DA SILVA et al., 2018; FROTA et al., 2012).

Além disso, entre os diversos marcadores moleculares utilizados na detecção molecular de *M. leprae*, a região de repetição RLEP (37 cópias no genoma) tem apresentado elevada positividade em amostras biológicas de casos com difícil diagnóstico clínico e laboratorial (MARTINEZ et al., 2014; TURANKAR et al., 2015; YAN et al., 2014).

Martinez et al. (2011) compararam quatro diferentes ensaios quantitativos de PCR em tempo real (qPCR) para o diagnóstico da hanseníase usando amostras de biópsia de pele (SBs) de paciente (MARTINEZ et al., 2011). Através deste estudo, concluíram que o qPCR visando 36 cópias RLEP por genoma, descrito por Truman et al.(2008), foi o ensaio mais sensível, uma vez que apresentou alta sensibilidade (100%) para pacientes multibacilares (MB;> 5 lesões) e sensibilidade de 84,6% para pacientes paucibacilares (PB; <5 lesões). Assim, RLEP qPCR tem sido considerado como o teste padrão ouro para confirmação laboratorial da hanseníase, mesmo quando a sensibilidade em amostras PB ainda é imperfeita (TRUMAN et al., 2008).

Vale ressaltar que diversos estudos mostram que técnicas de PCR, e sobretudo qPCR, podem detectar quantidades muito pequenas de bacilos. Frota et al. (2012) reportaram que o limite de detecção do sistema nested RLEP PCR proposto é de 1 pg/μL (FROTA et al., 2012). Já Truman et al. (2008) mostraram um limiar de detecção de 10 fg de DNA purificado, o que equivale a aproximadamente 3 genomas de *M. leprae* (FROTA et al., 2012).

Neste contexto, a despeito da possibilidade de inibição, necessidade de padronização adequada, estrutura laboratorial e equipe treinada, a técnica de PCR utilizando RLEP como alvo, é adequada e tem sido utilizada em diversos estudos com o intuito de detecção infecção natural por *M. leprae* em tatus (DA SILVA et al., 2018; DEPS; SANTOS; YAMASHITA-TOMIMORI, 2002; FROTA et al., 2012).

### **2.2.1.2. Genotipagem molecular**

A tipagem para diferenciação de estirpes é uma ferramenta muito útil para distinguir membros da mesma espécie microbiana com base no genótipo, possibilitando assim a

identificação de fonte da infecção, elucidação de aspectos relativos à transmissão e disseminação de doenças, bem como investigação de possíveis ligações entre fontes humanas e reservatórios não-humanos (SAEED; WANG; WANG, 2016; TRUMAN et al., 2011)

Vários métodos de tipagem molecular foram empregados para distinguir as estirpes bacterianas ao longo dos anos. Inicialmente, foram utilizados os métodos de tipagem de antígenos de superfície (LANCEFIELD, 1928), “Multilocus Enzyme Electrophoresis” (MLEE) (MILKMAN, 1973) e tipagem de fagos (AHMED et al., 1987).

Somente a partir dos anos 90, que foram iniciados os métodos baseados na análise do DNA, incluindo os métodos: “Restriction Fragment Length Polymorphism” (RFLP), operons rRNA (LOW et al., 1988), “fingerprinting” por iniciação aleatória PCR (WELSH; MCCLELLAND, 1990), “Pulsed Field Gel Electrophoresis” (PFGE), “Multilocus Sequence Typing” (MLST) (MAIDEN et al., 1998), bem como “Variable Number of Tandem Repeats” (VNTR) e “Single Nucleotide Polymorphism” (SNP) (KEIM et al., 2000; KLEVYTSKA et al., 2001).

A diferenciação de estirpes de *M. leprae* representa um grande desafio para pesquisadores de todo mundo. Na maioria das bactérias, pequenas sequências de alguns genes seria suficiente para inferir relações entre as estirpes. No entanto, *M. leprae*, tem uma diversidade extremamente limitada, considerado geneticamente monomórfico. Esta menor diversidade genética deve-se ao alto conteúdo de pseudogenes e vários genes de reparo (COLE et al., 2001).

Por este motivo, a implementação das técnicas de tipagem para identificar polimorfismos utilizando diferentes abordagens como: polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) (CLARK-CURTISS; WALSH, 1989; WILLIAMS et al., 1990; VAN EMBDEN et al., 1993), análise de repetições dispersas (WOODS; COLE, 1990), e a análise da sequência das regiões variáveis (WIT; KLATSER, 1994), não obtiveram sucesso.

O desenvolvimento de ferramentas robustas capazes de permitir a realização de tipagem molecular de cepas de *M. leprae* ocorreu somente durante a última década. No ano 2000, foi relatada pela primeira vez que a sequenciamento de DNA foi capaz de distinguir dois alelos alternativos dentro do gene de *M. leprae*, uma sequência intragênica de seis pares de base no gene *rpoT* (MATSUOKA et al., 2000). No mesmo ano, um ensaio de PCR para uma trincucleotídeo (TTC), em um segmento não-codificante de *M. leprae*, evidenciou uma diferença considerável no número de cópias deste marcador, determinando assim, 15 variantes de *M. leprae* quando um painel de 34 amostras de pacientes hansenianos das Filipinas foi avaliado (SHIN et al., 2000). No entanto, com apenas dois marcadores (loci polimórficos) disponíveis, o potencial dessa ferramenta para discriminar e avaliar as diferenças entre as cepas permaneceu limitada.

Essa observação, associada à publicação do primeiro genoma completo de *M. leprae*, serviu como ponto de partida para o desenvolvimento de diferentes sistemas baseados em VNTRs e culminou no sistema amplamente aceito baseado em 15 VNTRs proposto por Kimura et al. (2009)

Portanto, após a conclusão do sequenciamento completo do genoma de *M. leprae* (cepa TN), o atual método de tipagem, baseado em VNTRs, foi iniciado (COLE et al., 2001). Assim, avaliando o genoma de *M. leprae*, os elementos repetitivos foram catalogados, revelando mais de 50 sequências VNTRs.

Tais sequências foram ao longo dos anos sendo avaliadas quanto à sua utilidade e potencial informativo dos marcadores, através de estudos epidemiológicos moleculares, desenvolvidos a partir da tipagem de linhagens. Assim, foram desenvolvidos diversos estudos a fim de validar marcadores para tipagem de cepas (GROATHOUSE et al., 2004; KIMURA et al., 2009; TRUMAN et al., 2004)

Com o objetivo de ampliar e refinar o painel de VNTRs utilizados para diferenciação de isolados de *M. leprae*, Groathouse et al. (2004) investigaram o polimorfismo genético de cinco minissatélites (6-7, 12-5, 18-8, 21-3 e 27-5) e seis microssatélites (C20, AT17, TA18, GTA9, TTC21 e CG6) através da análise de quatro amostras de DNA de *M. leprae* purificado. Do total de VNTRs avaliados, nove demonstraram-se polimórficos; assim, um conjunto de possíveis marcadores para diferenciação entre os isolados foi sugerido.

Ainda no ano de 2004, Truman et al. (2004) avaliaram o polimorfismo e a estabilidade de quatro repetições em tandem. Os resultados obtidos demonstraram que os VNTRs analisados poderiam ser efetivamente utilizados para diferenciação de isolados de *M. leprae* (TRUMAN et al., 2004).

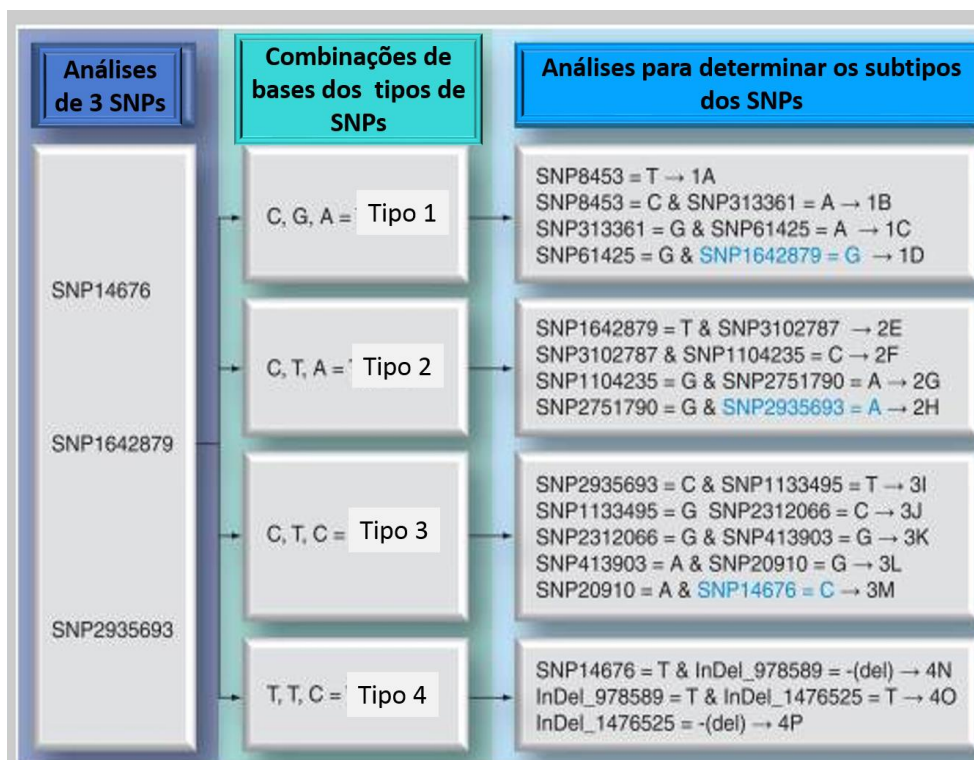
Com o objetivo de reduzir os custos e ampliar o número de VNTRs estudados, Kimura et al. (2009) propuseram uma análise baseada em PCR “multiplex”. Desta forma, a amplificação de 15 diferentes VNTRs ocorre concomitantemente. Neste sistema, os oligonucleotídeos marcados com fluorescência são utilizados para que o número de cópias de cada repetição seja determinado através da análise do comprimento dos fragmentos gerados (do inglês FLA, “Fragment Length Analysis”) usando eletroforese capilar (KIMURA et al., 2009). Este método é similar ao proposto para genotipagem de isolados de *M. tuberculosis* (SUPPLY et al., 2006)

Na área de epidemiologia molecular da hanseníase, VNTRs podem ser aplicados no rastreamento de transmissão a curto alcance, devido a variabilidade genética que confere um poder discriminatório significativo para estes marcadores. O potencial para diferenciação de isolados de *M. leprae* utilizando estes marcadores, deve-se ao fato da frequência de mutação ser significativa nestes marcadores, comparada àquela que ocorre em SNPs. Este dinamismo é responsável pelo poder discriminatório dos VNTRs (SINGH;COLE,2011).

Dessa forma, nos últimos 15 anos, foram conduzidos inúmeros estudos com o objetivo de investigar a diversidade genética de *M. leprae* em diferentes partes do mundo, incluindo Brasil (FONTES et al., 2009, 2012, 2017); China (WENG et al., 2007, 2011, 2013; XING et al., 2009), Colômbia (CARDONA-CASTRO et al., 2009, 2013), EUA (TRUMAN et al., 2011), Filipinas (SAKAMURI et al., 2009a, 2009b), Índia (LAVANIA et al., 2007, 2011, 2015; SHINDE et al., 2009; YOUNG et al., 2008), Tailândia (PHETSUKSIRI et al., 2012; SRISUNGNAM et al., 2009). Desta forma, a variabilidade genética do patógeno dentro das diferentes populações tem sido conhecida.

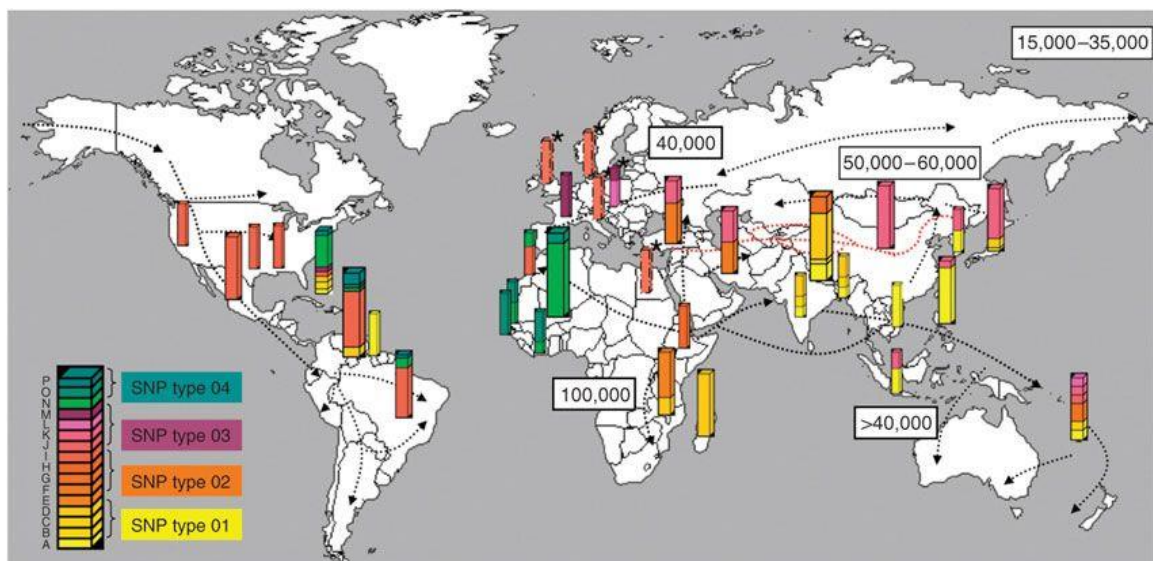
Uma outra abordagem para se estudar a variação genética observada no genoma de *M. leprae* são os polimorfismos de base única (SNP, do inglês: “Single-nucleotide polymorphism”). Um estudo conduzido por Monot et al. (2005) determinou a existência de quatro genótipos de *M. leprae* baseados em três possíveis SNPs (MONOT et al., 2005)

Com o avanço dos estudos e aplicabilidade de marcadores baseados em polimorfismos de base única (SNPs), 84 marcadores (78 SNPs e seis sequências de inserção e deleção) foram encontrados, permitindo, a classificação de cepas de *M. leprae* em 16 genótipos diferentes, subtipos dos quatro SNP (1A-4P). Através desta ferramenta é possível estabelecer uma relação entre genótipo do patógeno e a origem geográfica da amostra, o que contribuiu para o conhecimento do padrão de migração humana (MONOT et al., 2009) (figura 5).



**Figura 5 - Genótipos de *Mycobacterium leprae* definidos por SNPs.** Usando os três primeiros SNPs mostrados à esquerda, se obtém um dos quatro tipos de SNP (1–4). O genótipo 1 é definido quando o nucleotídeo G estiver presente na posição 16422879 do genoma de *M. leprae*; genótipo 2 é definido quando há a presença do nucleotídeo T; genótipo 3 é definido quando há uma mutação na posição 2935693 do genoma e resulta na substituição do nucleotídeo A por C; genótipo 4 é definido quando há uma mutação na posição 14676 e resulta na substituição do nucleotídeo C por T. Em seguida, usando três ou quatro marcadores mostrados à direita, são determinados 16 subtipos (A – P). Os SNPs mostrados em azul são os mesmos usados para digitar nos tipos 1, 2, 3 e 4 (lado esquerdo da figura). InDel: Exclusão de inserção; SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único. Fonte: Adaptado de Singh; Cole, (2011).

Estudos através da análise de SNPs apontam que a disseminação da hanseníase teve sua origem na Ásia Central ou Leste da África, por essa região apresentar os mais raros, e provavelmente o mais antigo genótipo do bacilo. Além disso, evidenciam que no Brasil, a hanseníase teria se originado proveniente da Europa e África Ocidental, devido ao movimento migratório do período da escravidão (MONOT et al., 2005) (figura 6).



**Figura 6 - Disseminação da hanseníase pelo mundo.** As barras estão localizadas no país de origem de cada amostra analisada. As cores representam os quatro principais genótipos definidos e seus subtipos. A espessura das barras corresponde ao número de amostras analisado (barras finas: 1-5 amostras; barras medianas: 6-29 amostras; barras mais amplas: mais de 30 amostras.) As setas cinza indicam as rotas humanas, com estimativa do tempo de migração em anos. Fonte: Monot et al. (2009).

Considerando que a ocorrência de SNPs é baixa no genoma de *M. leprae*, sendo inclusive, significativamente menor do que em outros patógenos humanos, torna-se um fator limitante sob o aspecto de aplicabilidade, o uso desta técnica isoladamente, a fim de estabelecer correlações epidemiológicas a curto alcance. Por este motivo, a utilização desta ferramenta limita-se à filogeográfica e mapeamento epidemiológico de longo alcance, ou seja, que envolvam áreas com distância geográfica significativa (SINGH; COLE, 2011).

Considerando as limitações e vantagens individuais de ambos os marcadores moleculares, a melhor opção para o estabelecimento de estudo na área de epidemiologia molecular em hanseníase baseia-se no uso combinado de SNP e VNTR. Esta tem sido a base dos estudos realizados com a finalidade de compreender a variabilidade genética deste microrganismo e investigar aspectos ligados à transmissão e disseminação da hanseníase pelo mundo (KURUWA; VISSA; MISTRY, 2012; SINGH; COLE, 2011).

Com o advento da era genômica, a genotipagem tem se baseado cada vez mais nos benefícios de técnicas cada vez mais robustas. O sequenciamento completo do genoma (do Inglês "Whole Genome Sequencing" – WGS) de *M. leprae* tem elucidado aspectos importantes acerca da composição genética do bacilo (TRUMAN et al., 2011). Todavia, ainda que os serviços de WGS sejam oferecidos por plataformas tecnológicas em muitos institutos de pesquisa, trata-se de uma ferramenta laboriosa, que requer infraestrutura laboratorial específica e grande capacitação técnica para a análise dos resultados gerados. Além disso, a técnica requer DNA em quantidade e qualidade, o que para um patógeno que não é cultivável *in vitro* como *M. leprae* pode ser um fator limitante. Portanto, embora o WGS seja uma ferramenta de epidemiologia molecular promissora, a tipagem molecular realizada com base em SNP e VNTR ainda é a abordagem mais viável e acessível para a maioria dos grupos de pesquisa e tem sido implementada para se avaliar a diversidade genética entre isolados de *M. leprae*, bem como monitorar a dinâmica de transmissão da hanseníase.



### 2.2.1.3. Epidemiologia molecular: desafios na elucidação de aspectos epidemiológicos da hanseníase

A hanseníase é uma das primeiras doenças humanas reportadas na história da humanidade, mas ainda possui inúmeras lacunas epidemiológicas (BRATSCHI et al., 2015). Embora *Mycobacterium leprae* seja o primeiro agente etiológico atribuído a este agravo, trata-se de um organismo incomum e que apresenta desafios únicos para àqueles que desenvolvem estudos através da epidemiologia molecular. Como consequência, muitos aspectos básicos da transmissão da doença e biologia permanecem desconhecidos (SALIPANTE; HALL, 2011a)

Compreender a causa e patogênese de uma doença infecciosa, os aspectos relacionados às diferentes manifestações, os fatores de susceptibilidade e resistência dos hospedeiros, bem como os fatores de virulência e resistência dos patógenos envolvidos, são bastante relevantes no enfrentamento da doença. Além desses aspectos, compreender como se dá a transmissão da doença, é necessário para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes de prevenção e controle (EYBPOOSH et al., 2017).

A epidemiologia molecular, é um ramo da epidemiologia desenvolvido pela fusão de estudos epidemiológicos e biologia molecular, utilizando técnicas laboratoriais de alto rendimento, aplicáveis a grandes tamanhos de amostras, populações e que permitem o desenvolvimento de estudos epidemiológicos de larga escala em níveis moleculares (EYBPOOSH et al., 2017). Desde o primeiro estudo de epidemiologia molecular, em 1979, que consistiu em elucidar e descrever a distribuição do subtipo do vírus Influenza em todo o mundo (VINEIS, 2007), o número crescente de estudos adotando esta abordagem tem sido observado em várias áreas de pesquisa, incluindo a hanseníase, no qual se utilizou a combinação de VNTRs e SNPs, e posteriormente técnica de WGS (TRUMAN et al., 2011).

No contexto da hanseníase, utilizando a diversidade genética bacteriana e ferramentas de epidemiologia molecular, foi possível traçar a disseminação da doença pelo mundo, à medida que as populações humanas migravam. As evidências indicam que a hanseníase foi introduzida no continente americano, devido a colonização européia e a rota africana de humanos escravizados. Por este motivo, as cepas responsáveis pela doença nas Américas, são SNP 3 e SNP 4, as quais são circunscritas à Europa, bem como às regiões do Norte e Oeste da África, respectivamente (MONOT et al., 2005).

Além disso, Truman et al., (2011) reportaram forte evidência de transmissão zoonótica de hanseníase de tatus para seres humanos, através de um estudo de epidemiologia molecular. Através de uma análise envolvendo VNTR e SNP loci, o genótipo (3I-2-v1) de *M. leprae* foi encontrado em tatus, bem como em pacientes hanseníacos que reportavam histórico de contato com o animal. Outro aspecto relevante, foi o fato destes pacientes nunca terem saído dos EUA, região considerada livre de transmissão autóctone para a doença.

Vale ressaltar, que o genótipo desta cepa não foi reportada em outras partes do mundo e assim, forneceu evidência significativa para o papel do tatu como um reservatório animal de *M. leprae* nos EUA (TRUMAN et al., 2011).

As árvores “Minimum Spanning Tree” (MST) trouxeram o benefício de uma ferramenta computacional que possibilita a ligação de um conjunto de indivíduos pelo caminho mais curto possível (EXCOFFIER; SMOUSE, 1994). Assim, foram aplicadas em diversas áreas, como: engenharia, economia, tecnologia da informação e ciências. No campo das pesquisas de epidemiologia molecular, as MSTs são frequentemente utilizadas para estimar relações entre cepas individuais ou isolados (SALIPANTE; HALL, 2011).

Este algoritmo assume que todos os isolados incluídos na análise são legitimamente relacionados por diferentes graus. A distância entre cada par de cepas é computadorizada e todas as cepas serão ligadas entre si e representa a evolução mais parcimoniosa de cepas ao longo do tempo.



Dessa forma, as MSTs refletem o conceito de evolução mínima, interligando os indivíduos mais próximos da população, gerando uma única árvore que representa todos os indivíduos analisados (TEIXEIRA et al., 2015). No entanto, alguns aspectos acerca dos algoritmos de MST têm sido largamente ignorados em estudos de epidemiologia molecular, embora tenha o potencial para confundir ou alterar a interpretação dos resultados dessas análises. Dentre estes, a apresentação de uma única análise, ou seja, uma única MST, selecionada arbitrariamente, a qual ilustra apenas uma das muitas soluções potencialmente igualmente ótimas (SALIPANTE; HALL, 2011)

Em relação aos aspectos epidemiológicos, os desafios no estudo da epidemiologia da hanseníase consiste, sobretudo, no fato do agravo ser de caráter crônico, apresentando um longo período de incubação (LASTÓRIA et al., 2014). Assim, limita significativamente inferir evidências robustas e seguras sobre a fonte de infecção. Outro fator limitante seria o forte estigma social, o qual desencoraja os pacientes a procurar serviços de saúde, bem como fornecer informações detalhadas sobre sua história epidemiológica.

Vale ressaltar, que os serviços precários de atenção básica à saúde em algumas regiões, bem como as dificuldades de acesso às informações epidemiológicas dos pacientes, também são fatores limitantes para os estudos de epidemiologia molecular. Além disso, dificultam a diferenciação e registros corretos dos casos de recidiva da doença, falha do tratamento ou reinfeção (SALIPANTE; HALL, 2011)

Neste contexto, fica claro que através dos estudos epidemiológicos tradicionais, como por exemplo, os estudos de caso-controle ou inquéritos epidemiológicos, seria difícil obter uma compreensão mais profunda sobre os aspectos epidemiológicos deste agravo tão complexo como a hanseníase. Assim, o uso de ferramentas de epidemiologia molecular, tem o potencial de oferecer o desenvolvimento de estratégias mais robustas para o avanço na elucidação das diferentes lacunas epidemiológicas da hanseníase.

### **2.2.2. Transmissão**

Apesar das tentativas repetidas ao longo das últimas décadas para identificar padrões de transmissão da hanseníase, o mecanismo exato ainda não está completamente elucidado. Acredita-se que o contato íntimo e prolongado com os pacientes que apresentam as formas multibacilares seja a maneira mais provável de transmissão (JOB et al., 2008).

Publicações demonstraram que o trato respiratório superior, seja a mucosa oral ou a nasal, tem um importante papel na fisiopatogenia da hanseníase, sendo considerado a porta de entrada e saída do bacilo (BEYENE et al., 2003; MARTINEZ et al., 2011; NAVES et al., 2009)

Estudos realizados com camundongos *nu/nu* apontam a ocorrência de infecção via mucosa nasal e injeção subcutânea. Em contrapartida, a via pulmonar, pele intacta e ingestão não estiveram relacionadas à infecção (CHEHL et al., 1985). Todavia, outro estudo apontou a presença de DNA bacilar em lavados de pele de pacientes hansenianos, sugerindo que a pele pudesse atuar como uma nova via de transmissão (JOB et al., 2008).

No entanto, em inúmeros novos casos de hanseníase reportados não é possível identificar um caso índice relacionado à infecção. Uma análise estatística realizada por Joseph et al. (1985) revelaram que apenas 30% dos 1309 casos de pacientes hansenianos nascidos e residentes nos EUA apresentavam histórico de contato com pessoas acometidas pelo agravo (JOSEPH; YODER; JACOBSON, 1985).

Recentemente, Truman et al. (2011) enfatizaram que dos 150 casos de hanseníase notificados a cada ano nos EUA, pelo menos 1/3 destes pacientes vivem em regiões onde se acredita que não exista transmissão autóctone, além de não relatarem deslocamento para áreas endêmicas para a doença ou contato com outros pacientes hansenianos (TRUMAN et al., 2011).

Além disso, nestas áreas foram encontrados animais naturalmente infectados. Desta forma, a evidência da ocorrência da hanseníase zoonótica nos EUA e a descoberta de DNA de *M. leprae* em fontes ambientais, confrontam o paradigma clássico de transmissão inter-humano do bacilo (BRATTSCHI et al., 2015).

As controvérsias epidemiológicas salientam que os reservatórios ambientais poderiam explicar aspectos pouco elucidados acerca da doença, como a distribuição geográfica irregular, a flutuação de risco para contatos familiares e a ausência de casos secundários entre imigrantes em países livres da hanseníase, bem como o registro de novos casos do agravo com ausência de fontes de infecção conhecidas. (KERR-PONTES et al., 2006; MARTELLI et al., 2000; TRUMAN; FINE, 2010)

Por este motivo, as características epidemiológicas da hanseníase têm sido abordada em numerosos estudos nas últimas décadas, com o intuito de elucidar os fatores que contribuem para a manutenção da endemia e assim estabelecer novas estratégias para o seu controle.

### **2.2.2.1. Possíveis fontes ambientais e reservatórios não-humanos de *M. leprae***

O bacilo *M. leprae* é considerado primariamente um patógeno de humanos. No entanto, aspectos relacionados à transmissão da hanseníase e as fontes não-humanas de *M. leprae* têm sido a temática de diversas publicações ao longo dos anos.

Assim, a hipótese da participação de diferentes reservatórios animais, bem como água, solo e protozoários de vida livre tem sido investigada ao longo dos anos (HONAP et al., 2018; TRUMAN; FINE, 2010; WHEAT et al., 2014).

Existe uma enorme resistência por parte da maioria dos hansenologistas em considerar as investigações que apontam presença de *M. leprae* em fontes ambientais. Este fato deve-se aos aspectos microbiológicos do bacilo, uma vez que é considerado um patógeno intracelular obrigatório.

No entanto, intrigando pesquisadores na época, a investigação de áreas habitadas por pacientes hanseniano evidenciou em amostras de solos (LAVANIA et al., 2006; TURANKAR et al., 2014) e águas (TURANKAR et al., 2012), a detecção de DNA bacilar por PCR.

Posteriormente, em 2016, após confirmarem viabilidade de *M. leprae* utilizando o modelo consolidado, coxim plantar de nude, bem como utilizando análise molecular do gene RNA ribossômico 16S, pesquisadores concluíram que o bacilo é capaz de permanecer vivo em solo úmido por 46 dias (TURANKAR et al., 2016) e por 21 dias em solo da Índia. Além disso, reporta-se que 25% das amostras de solo coletados de áreas de pacientes continham RNA ribossômico 16S do *M. leprae* (TURANKAR et al., 2015).

Todos estes achados tornaram-se ainda mais relevante, quando evidências de que *M. leprae* pode sobreviver dentro de cistos de protozoários de vida livre até 8 meses foram reportados em um estudo *in vitro*. Isso reforça a possibilidade dos bacilos estarem viáveis, ocupando seu nicho intracelular, ainda que em solo e água, uma vez que protozoários de vida livre podem ser encontrados em ambas fontes ambientais (LAVANIA et al., 2008).

Em um estudo recente, embora a viabilidade do bacilo não tenha sido avaliada, a análise baseada em RLEP PCR e tipagem baseada em SNPs, indicou DNA bacilar em amostras de solo de áreas habitadas por pacientes com hanseníase (Bangladesh), tatus (Suriname) e os esquilos vermelhos (Ilhas Britânicas). Nesta última região, a tipagem de SNP não foi viável. No entanto, foi detectado SNP tipo 1 em Bangladesh e SNP tipo 1 ou 2, no solo do Suriname (TIÓ-COMA et al., 2019).

A relevância destes achados se entrelaça com evidências de infecção por *M. leprae* em esquilos vermelhos das Ilhas Britânicas, causando a doença lepromatosa em vários

animais. No entanto, vale ressaltar que a área na qual se reporta infecção em esquilos, a hanseníase é considerada eliminada.

Assim, sugere-se que estes animais sejam um reservatório contemporâneo dos bacilos, visto que análises filogenéticas determinaram que a cepa de *M. leprae* nos esquilos (3I) estava relacionada à linhagem circulante na Inglaterra medieval, sugerindo os esquilos vermelhos como um potencial reservatório contemporâneo dos bacilos. (AVANZI et al., 2016).

No Brasil, uma análise realizada em 98 saguis (*Callitrix* spp.) capturados de diferentes estados, não evidenciou positividade por PCR para nenhum dos alvos testados (Ag85B e RLEP). No entanto, 14/98 foram positivos para *rpoB*, que embora seja um marcador genético micobacteriano, não é específico de *M. leprae* (HOUSMAN et al., 2015).

No entanto, apesar da prevalência da hanseníase em primatas não humanos (NHP) pareça ser bastante baixa, recentemente também foram relatadas evidências de infecções por *M. leprae* em diferentes NHP. Além disso, reporta-se que em macacos *Cynomolgus* (*Macaca fascicularis*) das Filipinas, Chimpanzé (*Patricias inchadis*) e o macaco Mangabey fuliginoso (*Cercocebus atys*), ambos da África ocidental, foram encontradas estirpes de *M. leprae* intimamente relacionadas com estirpes humanas. Assim, os dados sugeriram que a transmissão de NHPs poderia ocorrer a partir de humanos e também entre NHPs (HONAP et al., 2018).

Todavia, as investigações em animais concentram-se principalmente nos tatus, já que desde a década de 1970 existem evidências, reforçadas ao longo dos anos, que *D. novemcinctus* é o único animal a reproduzir a patogenia semelhante a que ocorre em humanos. Além disso, sendo um reservatório para o bacilo, a infecção zoonótica pelo *M. leprae* em tatus e a transmissão desses tipos específicos de cepas particulares ao homem foi estabelecida no sul dos Estados Unidos (DA SILVA et al., 2018; FROTA et al., 2012; TRUMAN et al., 2011)

Embora seja consenso de que o contato freqüente e intenso com pacientes com hanseníase multibacilar apresenta o maior risco de transmissão, após as evidências acima reportadas é concebível que, além de humanos e animais, os reservatórios ambientais podem desempenhar um papel na transmissão.

Assim, apesar de se acreditar que o risco de infecção através de água e solo seja baixo, fontes ambientais não-humanas para *M. leprae* poderia justificar a ocorrência de hanseníase em indivíduos oriundos de áreas onde não se relata a ocorrência de hanseníase humana, bem como aqueles que não reportam contato prévio com outros pacientes hansenianos (TIÓ-COMA et al., 2019).

Portanto, a investigação de fontes e reservatórios não-humanos pode ajudar a elucidar padrões de infecção da doença, bem como poderia contribuir para a determinação de estratégias que visam o controle da hanseníase.

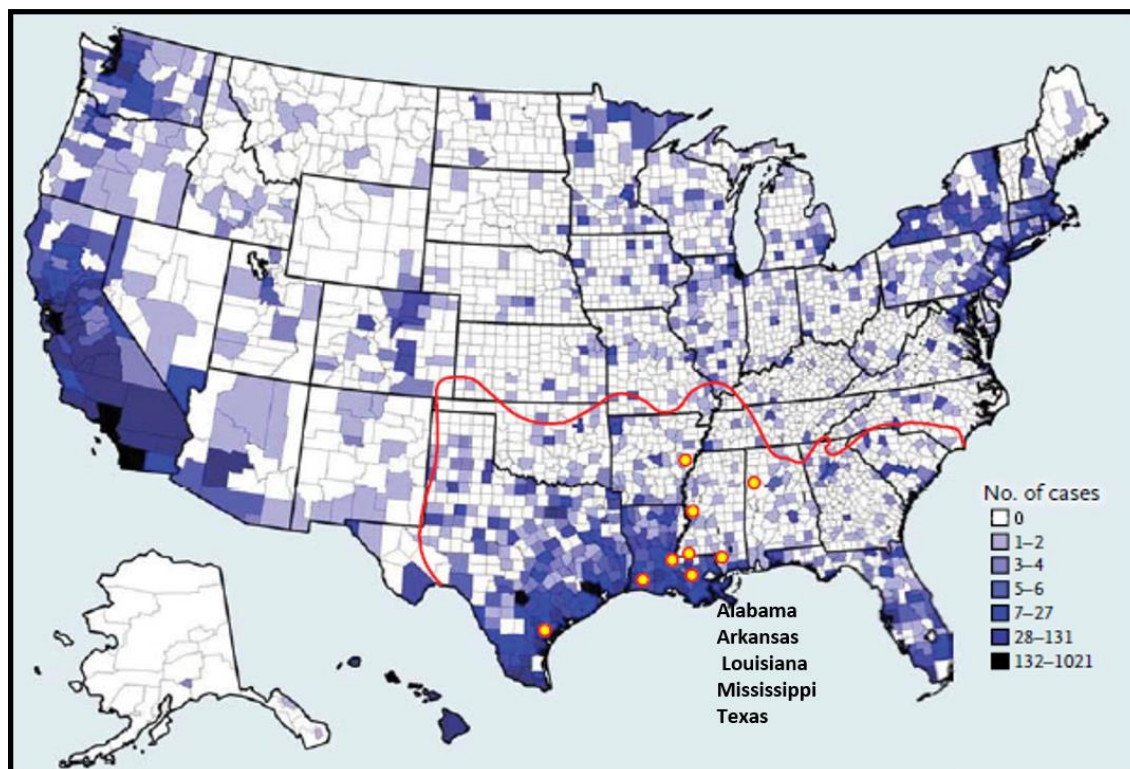
### **2.3. Tatu: Aspectos Biológicos e Distribuição Geográfica dos Tatus**

Os tatus são mamíferos primitivos da ordem Cingulata, classificados na família Dasypodidae e distribuídos em dez gêneros compostos por vinte e uma espécies diferentes na natureza, sendo no Brasil reportado o registro de 19 espécies (PEDRINI et al., 2010).

*Dasypus novemcinctus*, vulgarmente conhecido como o tatu de nove bandas nos EUA e tatu galinha ou tatu verdadeiro no Brasil, é a espécie mais conhecida sob aspecto ecológico, dada a sua ampla distribuição (MCBEE; BAKER, 1982), incluindo as Américas do Norte, Central e do Sul (SMITH et al., 1983).

Acredita-se que esta espécie de tatu tenha migrado para os Estados Unidos (EUA) no ano de 1926. Em 1995 se estabeleceu nos estados do Texas, Oklahoma, Louisiana, Arkansas,

Mississippi, Alabama e Flórida. Em 2005, foi também avistada em estados como Nebraska, Illinois e Indiana (OLI et al., 2017; TRUMAN et al., 2011) (figura 7).



**Figura 7 - Mapa de ocorrência de tatus nos Estados Unidos.** Localidades com coloração mais escura indicam um maior número total de casos de hanseníase desde 1894. A linha vermelha delimita a região aproximada de ocorrência do tatu. Os pontos amarelos com contorno vermelho indicam as localizações aproximadas onde foram encontrados tatus infectados (estados do Alabama, Arkansas, Louisiana, Mississippi e Texas), sugerindo que essas áreas sejam endêmicas para a transmissão da doença. Fonte: Balamayooran et al. (2015).

Em comparação ao *D. novemcinctus*, o tatu da espécie *Euphractus sexcinctus* possui uma distribuição consideravelmente mais restrita, do Suriname até o Nordeste da Argentina e Uruguai. Já no Brasil, grande parte da sua distribuição se encontra sobreposta à de *D. novemcinctus*, podendo ser reportada em diferentes biomas, como Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pantanal e Pampas (GARDNER, 2008; REIS et al., 2006).

*Euphractus sexcinctus*, popularmente conhecido como tatu peba, papa-defunto ou tatu peludo, tem atividade principalmente diurna, podendo apresentar também atividade noturna (BONATO et al., 2008; MEDRI, 2008). Com exceção da época reprodutiva, apresenta hábito solitário. Além disso, em situações mais esporádicas, os animais desta espécie já foram observados agrupados se alimentando de carcaça de animal morto (MEDRI, 2008).

Reporta-se como aspecto relevante de sua ecologia, o hábito alimentar generalista, incluindo vegetais (frutos de bromélias e palmeiras, tubérculos, etc.), invertebrados, animais mortos e carniça (ALVES et al., 2009; MANUEL ABBA; SUPERINA, 2010; MEDRI, 2008). Além disso, pequenos roedores silvestres *Calomys* sp foram encontrados no estômago de um espécime de tatu peba (MEDRI, 2008) (BEZERRA et al. 2001). Esta espécie de tatu, ao contrário de muitas outras espécies, reutiliza frequentemente as tocas antigas (REDFORD; WETZEL, 1985).

Os animais silvestres nativos são protegidos por lei, sendo proibida sua criação, destruição, comercialização ou caça, sem autorização do órgão ambiental competente pela fiscalização, conhecido como Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) (BRASIL, 1998).

No entanto, em diversas regiões brasileiras, sobretudo em áreas rurais e semiurbanas, os tatus, mamíferos silvestres, são submetidos à caça ilegal, comercialização, alimentação e utilização de diferentes tecidos desses animais para uso medicinal e mágico-religiosos, principalmente os tatus das espécies *Euphractus sexcinctus* e *Dasypus novemcinctus* (BATISTA et al., 2019; KERR-PONTES et al., 2006; SILVA et al., 2018).

Estes mamíferos, sobretudo *D. novemcinctus*, podem albergar um grande número de patógenos, tais como *Trypanosoma*, *Toxoplasma*, *Sarcocystis*, *Leptospirose*, *Sporothrix*, *Paracoccidioides* e Micobactérias (BAGAGLI et al., 2003; CARDONA-CASTRO et al., 2009)(DA SILVA et al., 2018). Assim, estudos com a finalidade de analisar a participação de tatus no cenário epidemilógico de diferentes doenças tem sido realizado, a fim de avaliar o potencial reservatório desses mamíferos para inúmeros patógenos, sobretudo, *M. leprae*.

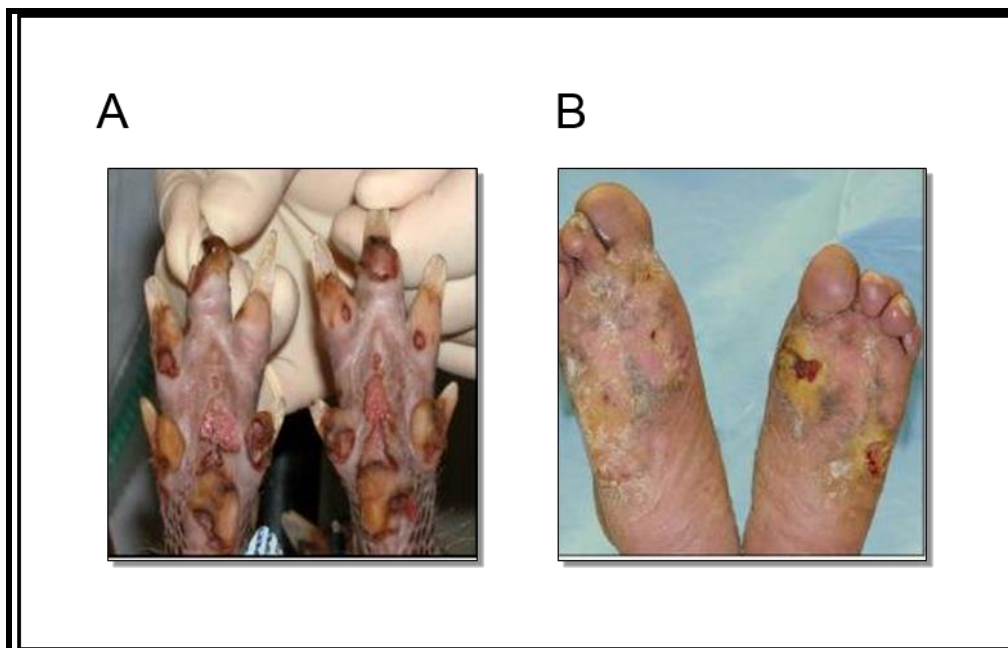
### **2.3.1. Relevância do tatu na hanseníase: modelo de cultivo e reservatório de *M. leprae***

Uma descoberta significativa na história dos estudos na área da hanseníase, foi o método estabelecido por Sheppard em 1960, que consiste no cultivo de *M. leprae* em coxim plantar de camundongos. No entanto, o camundongo Balb/c é relativamente resistente ao *M. leprae* e elimina a infecção após esta atingir certo limiar (SHEPARD, 1960; TRUMAN; KRAHENBUHL, 2001).

Sendo assim, posteriormente, observaram que camundongos timentomizados (*nu/nu*) apresentavam uma infecção generalizada quando inoculados com *M. leprae* (SHEPARD, 1962). Assim, o posterior desenvolvimento do modelo murino *nu/nu* atímico para o cultivo de *M. leprae* em coxim plantar possibilitou a aquisição de quantidades maiores do bacilo viável para uso experimental (TRUMAN et al., 2001; LAHIRI et al., 2005)

No ano de 1971, reportou-se o potencial da espécie *D. novemcinctus* como modelo para multiplicação do patógeno. Nesta espécie animal foi observado o desenvolvimento da doença de maneira disseminada (KIRCHHEIMER; STORRS, 1971).

Estes mamíferos apresentam baixa temperatura corporal (30- 35°C), o que explicaria a predileção do patógeno por esse animal. Além disso, assim como se evidencia em humanos, lesões de pele características da doença semelhantes são observadas em animais submetidos à infecção experimental (SHARMA et al. 2013) (figura 8).



**Figura 8 - Tatus como hospedeiro natural da hanseníase.** A: Lesões causadas pela hanseníase em tatus *Dasypus novemcinctus* no estágio tardio de infecção. B: Paciente humano acometido pela hanseníase apresentando lesão semelhante ao do tatu. Fonte: Sharma et al., 2013.

Além disso, em tatus infectados experimentalmente por *M. leprae* reporta-se comprometimento de linfonodos, fígado, baço, medula óssea, olhos, sistema nervoso central, testículos, ovários e pulmões. (TRUMAN et al., 1986; 2011; DEPS, 2001; FROTA et al. 2012; DEPS et al., 2003; SCHMITT et al., 2010; KIRCHHEIMER; STORRS, 1971).

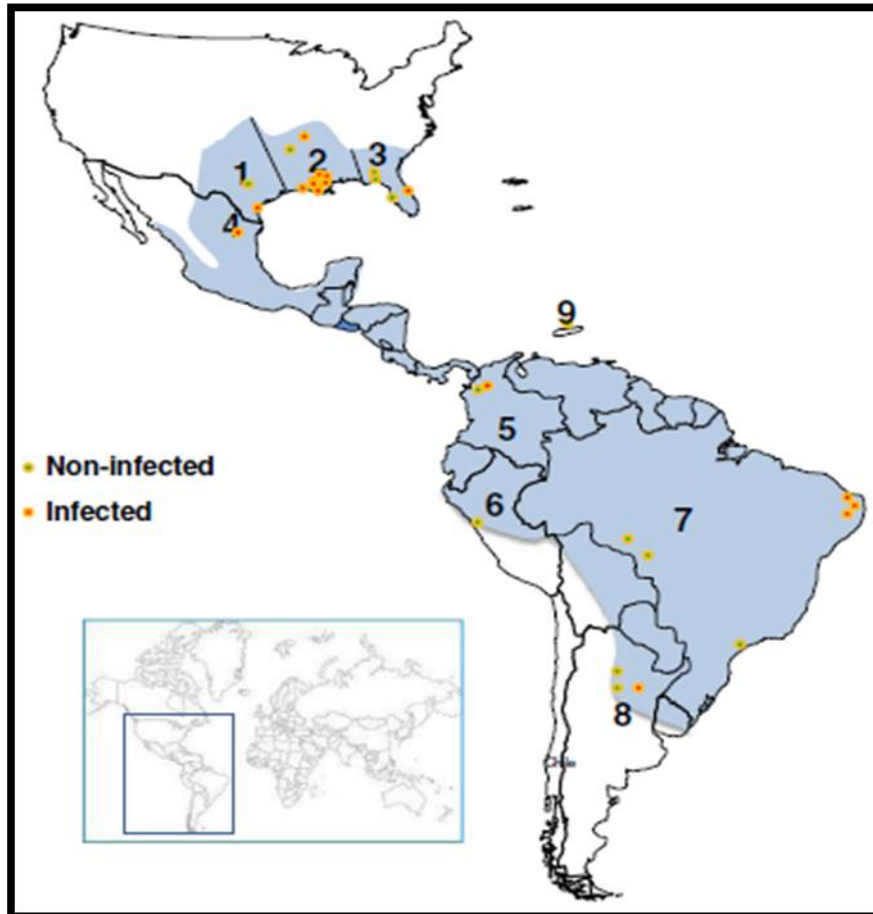
*Dasypus novemcinctus*, sendo um modelo de cultivo de *M. leprae* para a obtenção de grande quantidade de bacilos, especulações acerca da sua participação como uma fonte para a transmissão do bacilo *M. leprae* surgiram, levando a busca de tatus naturalmente infectados pelo bacilo. (KIRCHHEIMER; STORRS, 1971).

O primeiro relato de animais infectados por *M. leprae* ocorreu em 1974, no estado da Louisiana, EUA (WALSH et al., 1986). Por muito tempo acreditou-se na possibilidade dos tatus terem se tornado um reservatório após a soltura acidental de indivíduos infectados em laboratório.

Entretanto, materiais biológicos de tatus selvagens coletados entre 1960 e 1964, antes do estudo em laboratório ter iniciado, foram analisados por métodos sorológicos. Assim foi possível constatar que esses animais foram infectados antes mesmo dos primeiros ensaios laboratoriais, os quais tiveram início em 1968 (BÜHRER-SÉKULA, 2008; TRUMAN et al., 1986b).

A ocorrência de tatus naturalmente infectados por *M. leprae* tem sido reportada ao longo dos anos nas Américas do Sul e Central, incluindo Argentina (ZUMARRAGA et al., 2001), Colômbia (CARDONA-CASTRO et al., 2009c), bem como nos Estados Unidos (BALAMAYOORAN et al., 2015). No Brasil, estudos também foram realizados com animais capturados nos estados do Espírito Santo, Ceará e Pará, evidenciando infecção através de ferramentas sorológicas e/ou moleculares (DA SILVA et al., 2018; DEPS; ANTUNES; TOMIMORI-YAMASHITA, 2007; FROTA et al., 2012) (Figura 9)





**Figura 9 - Distribuição do tatu da espécie *D. novemcinctus* no continente americano.** Os países sombreados em azul claro no mapa equivalem às áreas de distribuição do *D. novemcinctus* nas Américas. Os pontos vermelhos com contorno amarelo indicam os locais em que foram reportados tatus infectados; já os pontos verdes com contorno amarelo indicam áreas em que não foram encontrados tatus infectados. Fonte: Balamayooran et al., 2015.

A despeito dos estudos realizados até o momento, tanto a origem da infecção nos tatus, como a manutenção da endemia entre os animais se mantém obscura. No entanto, evidências de infecção em tatus, por *M. leprae* SNP 3, reportado originário da Europa e norte da África, tornou-se indicativo de que os animais tenham sido infectados por fontes humanas, há 500 anos, após a chegada de colonizadores europeus e africanos escravizados. (MONOT et al., 2005)

Considerando evidências de que solo e água podem ser reservatórios, temporários ou não, de *M. leprae*, bem como aspectos biológicos dos tatus, possíveis rotas de infecção foram propostas (KERR et al., 2015)

Embora tenham hábito solitário, existem relatos de agrupamento durante o acasalamento. Assim, autores seguem que a transmissão de *M. leprae* entre tatus pode ocorrer por meio de gotículas de aerossol, contato direto durante o acasalamento ou interações agressivas (SMITH et al., 1983). Já o hábito escavatório desses mamíferos, podem possibilitar a inalação de partículas de solo contaminado (KERR et al., 2015).

Além disso, algumas espécies de tatus, quando próximos à riachos, tendem a construir tocas em solo úmido, possibilitando assim, a exposição a diferentes micro-organismo patogênicos, incluindo possivelmente *M. leprae*, como reportam estudos recentes. (LAVANIA et al., 2008; MOHANTY et al., 2016)

Embora a maioria dos estudos acerca da prevalência de *M. leprae* em tatus esteja restrito ao *D. novemcinctus*, foi descrito pela primeira vez no Brasil a infecção natural em um dos dois tatus *E. sexcinctus* analisados, oriundo do Ceará, uma área endêmica para hanseníase localizada na região nordeste do Brasil (FROTA et al., 2012).

Em contrapartida, Pedrini et al., (2010), também utilizando análise molecular, investigou tecidos de uma população maior, composta por 22 tatus *E. sexcinctus*, além de outras três espécies (*D. novemcinctus* n = 18; *Cabassous unicinctus* n = 02; *C. tatouay* n = 02), oriundos da região Sudeste e Centro-Oeste do país, nos estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul, respectivamente. No entanto, nenhuma positividade foi reportada.

No semiárido nordestino, os tatus *Euphractus sexcinctus* são comumente mantidos em cativeiro para obtenção de peso (engorda) e “limpeza” de sua carne para posterior consumo humano, uma vez que se alimenta, inclusive, de restos de outros animais em decomposição. Assim, apreciados pelos povos nativos tem estado sob constante ameaça predatória na região (ALVES et al., 2009; KERR et al., 2015).

Desta forma, é preciso considerar que a ausência de registros em outras espécies seja resultado de uma baixa investigação. Evidentemente, novos estudos são necessários para a confirmação da espécie *E. sexcinctus* como um possível reservatório de *M. leprae*.

### **2.3.2. Possibilidade de transmissão zoonótica da hanseníase entre tatus e humanos**

A descoberta de que tatus, especificamente *D. novemcinctus*, desempenham um papel indiscutível na hanseníase zoonótica nos EUA, resultou em uma mudança de paradigma em como a doença é vista e estimulou a pesquisa sobre a hanseníase zoonótica em outras regiões das Américas, incluindo Brasil (DA SILVA et al., 2018; STEFANI et al., 2019; TRUMAN et al., 2011).

Os fatores que têm reforçado a hipótese da participação de tatus na epidemiologia da hanseníase são: infecções naturais dos animais em diferentes regiões da América, a distribuição geográfica da doença em humanos e o relato de contato com os tatus em áreas onde não existe o histórico de contato do paciente com fonte humana conhecida para a doença (KERR et al., 2015).

Em regiões do Brasil caracterizadas como endêmicas para a hanseníase, o contato com o animal é considerado fator de risco para a aquisição da doença. Assim, em um dos estudos publicados em 2003, foi evidenciado que o grupo de pacientes hansenianos não havia tido contato com indivíduos acometidos pela hanseníase antes do diagnóstico, todavia, 96,1% já tinham consumido carne de tatu e apenas 3,9% não o fizeram (DEPS et al., 2003). Em outro estudo posterior, estas evidências foram confirmadas através de estudo de caso-controle que indicou que o contato humano com tatus aumentou o risco de hanseníase no Espírito Santo, Brasil (DEPS et al., 2008a).

No estado do Ceará, região nordeste do Brasil, um estudo baseado em entrevistas semi-estruturadas evidenciaram os principais contextos que propiciam interação humana da região e tatus, e como isto poderia aumentar o risco de transmissão da hanseníase (KERR et al., 2015).

Recentemente, no estado do Pará, região norte brasileira, de todos os indivíduos pesquisados, 18,5% (27/146) realizavam caça de tatus na floresta e 65,8% (96/146) manipularam ou prepararam a carne para consumo. Reportou-se que 62,3% (91/146) haviam consumido carne de tatu pelo menos uma vez durante o ano de 2017, bem como 18,5% (27/146) indivíduos comendo-os mais de uma vez por mês.

A porcentagem de indivíduos que participaram de pelo menos uma das atividades acima citadas (caça, preparo da carne para consumo ou consumo da carne) foi de 65,8% (96/146) (DA SILVA et al., 2018). Em contrapartida, um estudo anterior, realizado em Curitiba,



Paraná, região sul do país, não reportou associação ente o consumo de carne e a ocorrência da doença. No entanto, a região de estudo é considerada de média endemicidade para a doença e não há evidências de animais naturalmente infectados por *M. leprae* (SCHMITT et al., 2010).

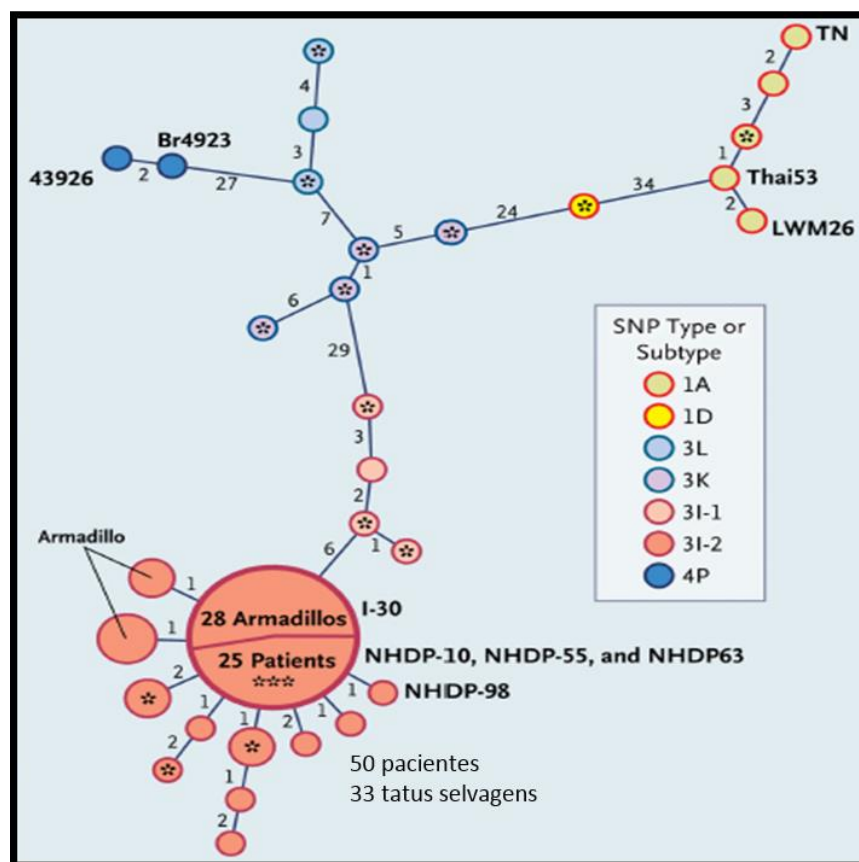
Nesse contexto, estudos epidemiológicos que visem elucidar aspectos que correlacionam a infecção entre as populações humanas e animais, são extremamente necessários.

Além disso, acredita-se que a dinâmica de uma possível hanseníase zoonótica em algumas regiões do Brasil, incluindo o Rio Grande do Norte (RN), pode se comportar de maneira mais complexa se comparada à região sul dos EUA, visto que o Brasil alberga uma maior diversidade de espécies de tatus, bem como a hanseníase se apresenta de forma endêmica e hiperendêmica em muitas regiões brasileiras.

Vale ressaltar, que a despeito das limitações em se confirmar a fonte de infecção baseado em ferramentas epidemiológicas, sobretudo devido ao caráter crônico da hanseníase, a implementação de ferramentas de epidemiologia molecular, que associa ferramentas moleculares robustas à epidemiologia, seriam mais informativas.

A genotipagem molecular de *M. leprae* para definição de cepas circulantes em diferentes populações, bem como em diferentes fontes ambientais e potenciais reservatórios não-humanos, auxilia a compreensão dos mecanismos de transmissão da hanseníase (SHARMA et al., 2015; TRUMAN et al., 2011)

Neste contexto, nos EUA, analisando microssatélites, minissatélites e SNPs, TRUMAN et al. (2011) confirmaram que a hanseníase é uma zoonose no sul dos EUA e que tatus podem estar envolvidos na transmissão de *M. leprae* para humanos (figura 10).



**Figura 10 - Genótipos de *Mycobacterium leprae* identificados no sul dos EUA.** Cada círculo representa um genótipo, sendo o tamanho do círculo proporcional ao número de isolados com genótipo idêntico. O círculo maior compreende amostras de pacientes e animais que possuem o mesmo genótipo. Fonte: Truman et al., (2011).

Neste estudo, verificou-se a ocorrência de uma única cepa de *M. leprae* (genótipo: 3I-2-v1) em 88% dos tatus *D. novemcinctus* selvagens analisados, oriundos de cinco estados do Sul dos EUA, sugerindo assim, que a transmissão de *M. leprae* entre tatus seja altamente eficiente (TRUMAN et al., 2011).

O genótipo 3I-2-v1 foi também verificado nos pacientes hansenianos da região, os quais relatam contato direto com os animais e algumas vezes o consumo de sua carne para alimentação. Uma determinação mais definitiva da associação epidemiológica entre os tatus e humanos avaliados foi mais rigorosamente confirmada pelo sequenciamento do genoma de *M. leprae* (SHARMA et al., 2015; TRUMAN et al., 2011).

A descoberta da infecção natural por *M. leprae* em tatus da espécie *D. novemcinctus* no território brasileiro, propicia questionamentos acerca de seu papel na transmissão e na manutenção da endemia da hanseníase, uma vez que o contato direto e o consumo da carne desse animal são comuns em áreas rurais e urbanas (DA SILVA et al., 2018; FROTA et al., 2012; MARTINS et al., 2015).

Como observado anteriormente, o tatu *E. sexcinctus* também pode ser infectado por *M. leprae*, e este fato é relevante para áreas em que a ocorrência desta espécie, se sobrepõe a ocorrência de *Dasyurus novemcinctus* (GARDNER, 2008; REIS et al., 2006). Os dados de um estudo realizado no Ceará, região nordeste do Brasil, utilizando métodos moleculares, reportou infecção por *M. leprae* em um dos dois animais *E. sexcinctus* analisados, fornecendo assim, evidências de que, em comum com *D. novemcinctus*, o tatu peba também desempenhar um papel na manutenção e possível transmissão zoonótica de *M. leprae*.

No entanto, um estudo anterior, também baseado em análises moleculares, realizado na região centro-oeste (MS) e sudeste (SP), mostrou que *M. leprae* não estava presente nos tecidos de uma população maior, composta por 22 tatus *E. sexcinctus* (PEDRINI et al., 2010).

Apesar da contradição destes achados, a diversidade de espécies de tatus no território brasileiro e o conhecimento da ocorrência de *E. sexcinctus* em muitas regiões brasileiras, já evidencia a relevância em se investigar a infecção por *M. leprae* nesta espécie. Trata-se de uma das espécies mais caçadas e consumidas em regiões rurais. Assim, há uma justificativa clara para o desenvolvimento de estudos adicionais para se avaliar a infecção por *M. leprae* em *E. sexcinctus* e o seu potencial como reservatório de *M. leprae*.

Vale ressaltar, que a captura e manipulação de tatus deve ser realizada em estrita conformidade com a legislação ambiental brasileira, resultando em uma série de exigências para a execução de pesquisas com esses mamíferos silvestres. (BRASIL, 1998).

Além disso, um dos principais entraves seria o fato de que a análise molecular em fragmentos de tecidos internos requer a eutanásia desses animais. Dessa forma, os testes sorológico oferecem um meio alternativo, amplamente aceito e não letal de avaliar o estado de infecção de um animal.

No entanto, o método imunológico padrão ouro é o ELISA, uma técnica que requer acesso a um laboratório centralizado, uma situação que pode não ser prática para muitos pesquisadores brasileiros. Vale ressaltar, que estudos preliminares que avaliaram o teste de fluxo lateral para detecção de infecção por *M. leprae*, indicaram o uso destes, como teste imunológico auxiliar sensível e específico uso de triagem de animais em condições de campo (DEPS; ANTUNES; TOMIMORI-YAMASHITA, 2007; DEVIDES et al., 2018; DUTHIE et al., 2014).

A disponibilidade de testes de fluxo lateral adicionais, incluindo o sistema OL (NOD-LID-1), que incorpora um antígeno adicional e que, no caso de infecções humanas, pode detectar pacientes registrados como negativos no teste de fluxo ML de antígeno único (DUTHIE et al., 2011), poderia servir para melhorar nossa capacidade de detectar animais

infectados sem recorrer à eutanásia. No entanto, ao contrário do teste ML Flow, o desempenho do teste OL (NOD-LID1) utilizando amostras de tatu ainda não foi relatado.

A detecção de anticorpos é geralmente aceita como um indicador de exposição ao patógeno, apesar de não necessariamente se correlaciona com a evidência de uma infecção existente. No entanto, a utilização da soroconversão como critério de seleção para o teste letal subsequente representaria uma melhora significativa em relação à eutanásia aleatória, como foi praticado em alguns estudos anteriores (PEDRINI et al., 2010; STEFANI et al., 2019).

Em um programa de vigilância integrada, a detecção sorológica de resposta ao bacilo poderia ser determinada “in situ” usando testes de fluxo lateral, podendo ser confirmadas pela execução posterior de análises de ELISA. Uma vez confirmado como soropositivo, as decisões de sacrificar ou não os animais, a fim de realizar análises moleculares, seriam justificadas com base em princípios científicos.

É pertinente notar que a aplicação de métodos moleculares também requer um planejamento cuidadoso. Especificamente, seleção precisa dos tecidos a serem amostrados, bem como acondicionamento e processamento destes, além do alvo molecular e método (convencional, nested ou PCR em tempo real) a ser testado.

Nos estudos brasileiros, os métodos de extração variaram entre fenol-clorofórmio e kits baseados em sais caotrópicos. Já as análises moleculares para investigação de infecção por *M. leprae* em tatus utilizaram exclusivamente o alvo multi-cópia RLEP. Essa abordagem forneceu um conjunto razoável de dados que demonstram que os tatus brasileiros podem estar infectados por *M. leprae* (FROTA et al. 2012).

No entanto, até o momento, nenhum estudo foi capaz de fornecer dados detalhados de tipagem molecular, como realizado nos EUAs, para fornecer evidência indiscutível de hanseníase zoonótica no Brasil. A disponibilização de tais evidências no país, deve ser considerada uma prioridade para estudos futuros sobre este tema.

Neste contexto, ferramentas de genotipagem molecular para diferenciação de estirpes são muito úteis para distinguir e correlacionar membros da mesma espécie microbiana, possibilitando a elucidação de aspectos relativos à transmissão e disseminação de doenças, bem como investigação de possíveis ligações entre fontes humanas e reservatórios não-humanos de *M. leprae* (TRUMAN et al., 2011).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

Verificar a ocorrência de infecção natural em tatus da espécie *Euphractus sexcinctus* do Rio Grande do Norte, através de ferramentas sorológicas e moleculares, bem como caracterizar as estirpes de *M. leprae*, a fim de verificar correlação entre aquelas circulantes em tatus e pacientes hansênicos do Brasil e do mundo.

#### 3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o potencial de aplicação do teste de fluxo lateral NDO-LID<sup>®</sup> (OL hanseniase) para realização de triagem sorológica em tatus das espécies *Dasyopus novemcinctus* e *Euphractus sexcinctus*;
- Realizar a triagem sorológica de tatus (*Euphractus sexcinctus*) através da utilização de dois testes de fluxo lateral, ML flow e NDO-LID<sup>®</sup> (OL hanseniase), bem como através de ELISA anti-PGL1 e Elisa anti-LID1;
- Identificar infecção natural por *M. leprae* em tatus *Euphractus sexcinctus* através de RLEP PCR ou “NESTED” PCR, bem como confirmar por RFLP.
- Genotipar, através de VNTRs e SNPs, isolados de *M. leprae* provenientes de pacientes hansenianos de Mossoró, RN e tatus do RN, MT e SP.
- Comparar os genótipos dos isolados de *M. leprae* oriundos de tatus brasileiros com aquelas reportados para tatus dos EUA, bem como em pacientes do Brasil e mundo, a fim de verificar a correlação entre os genótipos de *M. leprae* encontrados na população de tatus e pacientes hansenianos.
- Realizar a análise espacial da área de captura dos tatus *Euphractus sexcinctus*.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Local do Estudo

O Rio Grande do Norte é um estado brasileiro que registrou uma taxa de 8,21 novos casos de hanseníase por 100.000 habitantes em 2013, um valor significativamente menor do que em outros estados nordestinos vizinhos. No entanto, a incidência de casos novos em Mossoró, município do norte do estado, registrados em 2013 foi de 45,4 casos / 100.000 pessoas/ ano, o que representou quase metade dos casos novos no RN. Assim, a cidade foi classificada como hiperendêmica para hanseníase, de acordo com os critérios do Ministério da Saúde (NOBRE et al., 2015).

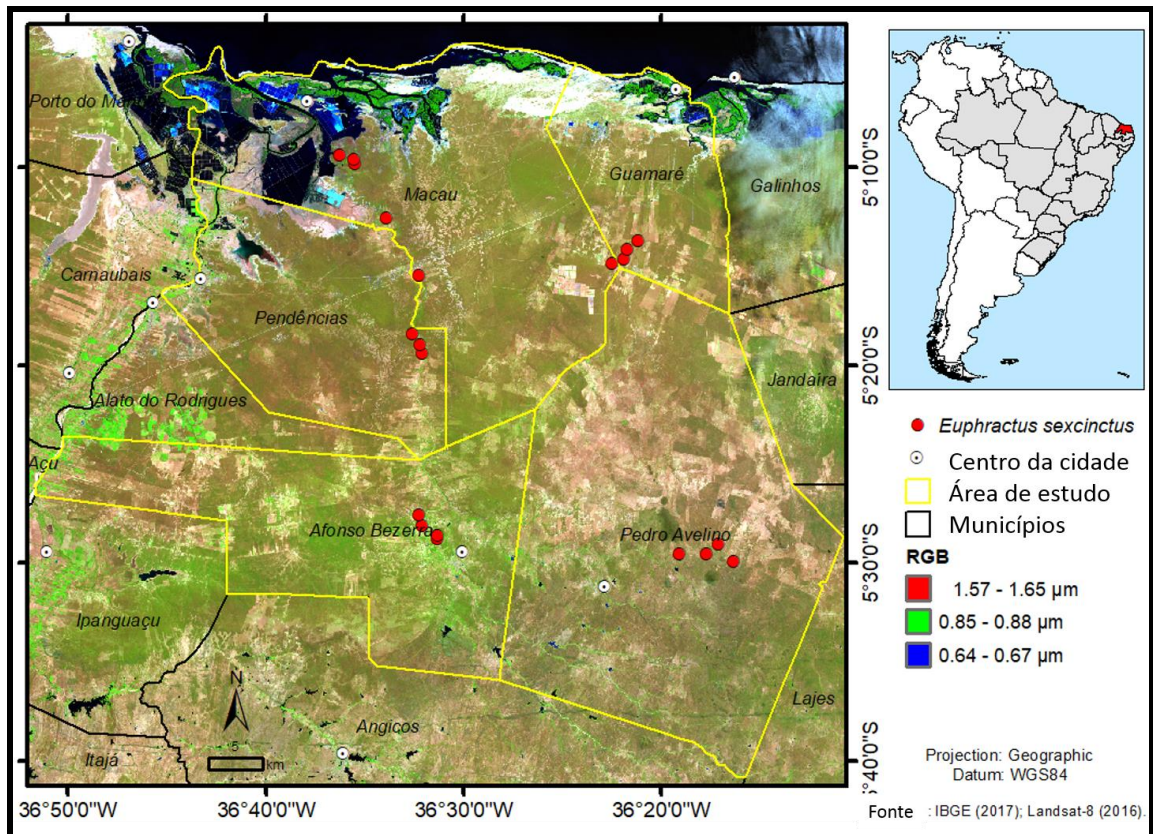
Os experimentos foram realizados nas instalações do:

- Hospital Veterinário de Animais Silvestres, localizado na Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró, Rio Grande do Norte, RN, Brasil;
- Laboratório de Biologia Molecular Aplicado a micobactérias (LABMAM) e Laboratório de Microbiologia Celular (LAMICEL), ambos do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), localizado na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro – RJ, Brasil;
- Laboratório Multiusuário de Biologia Molecular da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ)

### 4.2. Captura de Tatus da Espécie *Euphractus sexcinctus*

Um total de vinte (20) exemplares de *E. sexcinctus* foram obtidos vivos por veterinários da área silvestre em cinco municípios rurais (Pendências, Afonso Bezerra, Macau, Pedro Avelino e Guamaré) do Rio Grande do Norte. Estes municípios estão próximos ao município de Mossoró, e as expedições ocorreram em duas ocasiões durante o ano de 2016, com um intervalo de um mês entre as coletas, sendo 10 animais coletados em cada expedição. As coordenadas dos locais de obtenção dos animais são fornecidas no Anexo 1.

Os pontos de coleta foram georreferenciados usando os endereços mais próximos e o aplicativo “Google Earth” para encontrar as coordenadas de latitude e longitude. As coordenadas de latitude e longitude foram expressas em graus, minutos e segundos para a criação e manipulação no software ArcGis (figura 1).



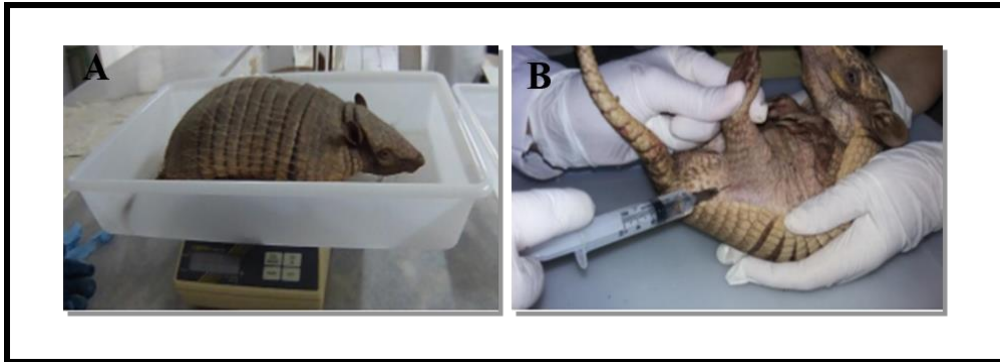
**Figura 11** - Mapa de distribuição dos cinco locais onde os tatus foram coletados no estado do Rio Grande do Norte, Brasil.

Os critérios para seleção dos locais, baseou-se no conhecimento prévio de ocorrência das práticas de caça e engorda pós-captura, e a finalidade de posterior consumo pela população residente nesses municípios, ou para feiras livres em outras locais dentro de RN. Os animais foram identificados por marcação no local de obtenção e depois transportados para uma instalação localizada no hospital de animais silvestres da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), em Mossoró, onde foram submetidos a um período de aclimação de 48h para minimizar o estresse pós-captura.

#### 4.3. Análise Clínica e Coleta de Tecidos de Tatus da espécie *Euphractus sexcinctus*

Os animais foram pesados e anestesiados através da administração intramuscular de Zoletil® 50 (Virbac, Brasil), na dose de 4 mg / kg, para permitir a inspeção visual de todo o corpo e verificar a presença de lesões indicativas de infecção por *M. leprae*, como recomendado por (MEDRI et al., 2010; SHARMA et al., 2013) e evidenciado na figura 12





**Figura 12** - Manipulação de tatus da espécie *Euphractus sexcinctus*. (A) Pesagem do animal e procedimento de indução anestésica (B). Fonte: registro da autora.

Foi realizada a coleta de 10 mL sangue por punção cardíaca usando uma agulha 22G 1/4-gauge. Uma parte do sangue foi transferida para um tubo BD Vacutainer® (3,0 × 75 mm), contendo 3,4 mg de K2EDTA (Becton Dickinson) e foi transportado para o laboratório clínico no Hospital Veterinário da UFERSA, para análises hematológicas não relacionados a este estudo.

O excedente de cada amostra foi transferida para um tubo BD Vacutainer de 16 x 100 mm, 10 mL de volume (sem aditivo) (Becton Dickinson), mantido em repouso para coagulação durante 1 hora à temperatura ambiente (25 °C), seguido de centrifugação (1.500 xg durante 15 minutos a 4 °C), para a obtenção de soro totalmente separado.

Os soros foram acondicionados em alíquotas de 100 µl em tubos Eppendorf (1,5 mL volume) e congeladas em gelo seco durante o transporte para o Laboratório de Microbiologia Celular (LAMICEL), Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro. Posteriormente, os tubos foram transferidos para um freezer (-20°C), até serem utilizados nas análises sorológicas descritas a seguir.

A fim de se obter tecidos dos animais, a eutanásia, realizada pela administração de cloreto de potássio, via veia femoral, na dose de 2,56 mEq / Kg (1mL / kg de solução a 19,1%) foi iniciada após confirmação da perda dos reflexos avaliados nos animais previamente anestesiados. Assim, amostras de fígado foram coletadas para análises moleculares durante a necropsia, colocadas em tubos de 15 mL, contendo 2mL de RNALater™ (Invitrogen™) com armazenamento a curto prazo (24h) a 4°C, antes do congelamento em gelo seco para transporte para FIOCRUZ para análises moleculares.

#### **4.4. Ensaaios Sorológicos**

##### **4.4.1. Estudo piloto do teste rápido NDO-LID® utilizando amostras de soro de espécimes de *D. novemcinctus* coletadas nos EUA**

O teste de fluxo lateral ML foi previamente avaliado e considerado como adequado como um método rápido para a detecção de anti-corpos IgM (anti-PGL-I) em soros coletados de tatus *D. novemcinctus* no estado de Espírito Santo (DEPS; ANTUNES; TOMIMORI-YAMASHITA, 2007). Em contraste, o potencial de utilidade do teste NDO-LID®, para avaliar o soro-reatividade destes animais era desconhecido.

Além disso, nenhum dos testes foi avaliado com soro oriundo de *E. sexcinctus*. Assim, para estabelecer a adequação do teste para os propósitos planejados desta pesquisa, um estudo piloto foi conduzido em colaboração com o grupo de Professor Richard Truman, no Programa Nacional de Hansen, em Baton Rouge, Louisiana, EUA.

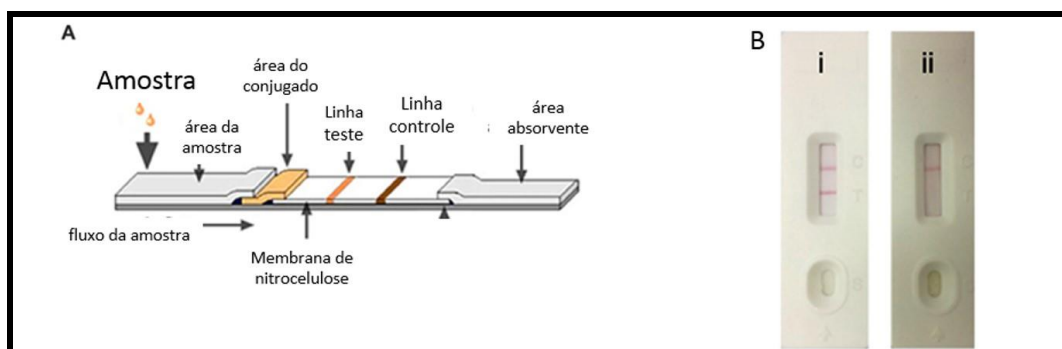
Para isto, um total de 78 soros, coletados de tatus *D. novemcintus* no sul dos EUA e previamente caracterizado, usando ELISA, sendo reativo ao PGL-I (n = 35) ou reativo ao LID-1 (n = 22), bem como soros não reativos para ambos os antígenos (n = 21), conforme relatado por Duthie et al. (2011) e Sharma et al. (2015), foram selecionados para o estudo piloto. Os soros (10 µl), foram testados no teste rápido NDO-LID® usando o protocolo recomendado pelo fabricante.

#### 4.4.2. Testes imunocromatográfico de fluxo lateral

Foram utilizados dois testes imunocromatográficos de fluxo lateral para ensaio sorológico rápido. O teste rápido NDO-LID® (Orange Life, Rio de Janeiro, Brasil), baseado na detecção cromogênica de anticorpos IgM Anti-PGL-I e IgG específico para o antígeno recombinante LID-1 e o teste ML Flow (gentilmente fornecido pela Dra. Samira Bühner-Sékula - Instituto Real Tropical, KIT Biomedical Research, Amsterdã, Holanda), baseado na detecção de anticorpos IgM anti-PGL-I (NT-P-Bovine Serum Albumina; BSA).

No presente estudo, os testes foram utilizados de acordo com os protocolos dos respectivos fabricantes, empregando 10 µl de soro não diluído de tatu.

Assim, para proceder o teste, as amostras de soro foram adicionadas ao receptáculo de amostras, seguido da adição do tampão de corrida. Havendo anticorpo específico na amostra, este se ligará ao antígeno e uma linha aparecerá na zona de teste, acompanhada do aparecimento da linha na zona controle. Os resultados dos testes foram considerados negativos quando a coloração se forma somente a linha na zona controle (figura 13).



**Figura 13 - Teste rápido de fluxo lateral.** A) Modelo esquemático. B) Interpretação dos resultados, sendo i, o resultado positivo devido ao aparecimento de duas faixas vermelhas e ii, o resultado negativo, pois somente da área da linha controle evidencia uma faixa vermelho. Fonte: Adaptado de He et al., (2016)

#### 4.4.3. Ensaio de imunoabsorção enzimática – ELISA (do inglês “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”)

O desenvolvimento dos ensaios foi baseado em uma versão ligeiramente modificada dos protocolos relatados anteriormente por DUTHIE et al, (2014). Assim, microplacas de 96 poços (Nunc) foram revestidas com 50 µl dos antígenos NDO-BSA (2ng/µL; doados pelo “Biodefense e Emerging Infections Research Resources Repository” listados em <https://www.beiresources.org/Catalog/antigen/NR-19329.aspx> ou LID-I (1ng/µL - doado pelo Dr. Malcom Duthie, do “Infectious Disease Research Institute, Seattle, WA, EUA”) em tampão carbonato/bicarbonato (pH 9,6) a 4 ° C durante 16 h.

O bloqueio foi realizado com solução salina tamponada com fosfato (PBS; pH 7,2 - 7,4), suplementado com albumina bovia (BSA a 5% (p/v) durante 1 h à temperatura ambiente.



Amostras de soro (50 µL), na diluição pré-determinada de (1:35) em PBS / Tween 20, foram adicionadas à placa e incubadas à temperatura ambiente durante 1 h. Posteriormente, a placa foi lavada três vezes com 200 µl de PBS/T.

No ensaio de Elisa para detecção de IgM anti-PGL1, foi utilizado o conjugado com peroxidase (HRP) Anti-Humano IgM -específico da cadeia µ- (anticorpo de Peroxidase produzido em cabra - Sigma-Aldrich St. Louis, MO, EUA) diluído 1:5000 em PBS/T suplementado com 1% p / v de BSA. Já no ensaio de Elisa de IgG anti-LID-I, utilizou-se Proteína Recombinante G, conjugado com Peroxidase - Pierce Appleton, Wisconsin, EUA) diluído 1: 2500 em PBS / T suplementado com 1% p / v de BSA.

Em ambos os ensaios, as placas foram incubadas por 1 h a 37 °C, para permitir a ligação dos conjugados de detecção. Posteriormente, as placas foram então lavadas como descrito acima e a reação foi desenvolvida pela adição de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB-Sigma-Aldrich, St. Luís, MO, EUA).

Assim, a reação foi interrompida pela adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,5 M (50 µL por poço) e a absorbância foi medida a 450 nm num espectrofotômetro de microplaca Eon (Biotek, Inc. Winooski Vermont, EUA).

As respostas positivas foram definidas quando valores de D.O > 0,101 (ELISA anti-PGL1) e D.O > 0,5 (ELISA anti-LID1) foram obtidos. Os resultados dos testes sorológicos foram expressos como a média de triplicatas. Duas amostras de soros humanos positivos e negativos diluídos a 1: 200 foram incluídas em triplicata como controles de desempenho do ensaio para avaliar a reprodutibilidade inter-ensaio.

Os valores de corte dos ELISA foram determinados utilizando um total de 7 amostras de soro, classificadas como negativas tanto para o PGL-1 como para o LID-1 coletadas de *D. novemcinctus* nos EUA. As amostras de soro foram absorvidas por tiras de papel Nobuto (área absorvente contendo o equivalente a 0,1 mL de soro) e enviadas em temperatura ambiente para a FIOCRUZ.

Assim, para se obter as amostras, as tiras foram colocadas em um tubo tipo Eppendorf de 1,5 mL, contendo tampão de lavagem, o qual consiste em solução salina tamponada com fosfato 1X (PBS; pH 7,2- 7,4), suplementado com 0,05% v / v Tween 20 = PBS / T. Posteriormente, foram submetidas à agitação a 4°C durante a noite para obter uma diluição de 1:35 de cada amostras prontas para utilização no ELISA.

O ponto de corte “cut- off”, foi determinado como a densidade óptica (DO) da média, mais duas vezes o desvio padrão da DO dos soros de controle. A dosagem dos níveis de IgM anti-PGL-I e IgG anti-LID-1 foram obtidas usando dois ensaios ELISA. A concordância entre os testes foi determinada pelo índice *Kappa* e os resultados analisados pelo programa BioEstat versão 5.3.

## **4.5. Ensaio Moleculares**

### **4.5.1. Extração de DNA de fígado de tatu *E. sexcinctus***

Os ácidos nucleicos (DNA) contidos em amostras de fígado de tatu (25mg), preservados em RNAlater® (Ambion Inc., EUA) foram extraídos utilizando o DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen), seguindo as orientações do fabricante.

As extrações foram realizadas em duas ocasiões separadas para confirmar a reprodutibilidade. Além dos tecidos dos tatus analisados no estudo, cada procedimento de extração incluiu controles negativos de extração em duplicata, compostos por 25 mg de fígado de bovino processados em conjunto com as amostras-teste.

Em todos os casos, o DNA foi eluído dos filtros de captura de sílica usando 100 µL de tampão AE (10 mM Tris-Cl 0,5 mM EDTA; pH 9,0). Os DNAs foram extraídos e 2µl foram submetidos à análise molecular para detecção de sequências específicas de *M. leprae*.

Vale ressaltar que previamente dois métodos de extração de DNA foram avaliados utilizando cinco fragmentos de fígados (25 mg) de tatu *E. sexcinctus* :1) DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen), seguindo as orientações do fabricante e 2) Método fenol: clorofórmio, conforme descrito por Santos et al. (1992). No entanto, neste protocolo foi realizada uma digestão prévia dos fígados (25 mg), utilizando coquetel enzimático, conforme descrito por Ferreira et al. (2018), a fim de purificar *M. leprae* de pata de *nu/nu*, Além disso, controles de processamento positivos e negativos foram incluídos nesta avaliação.

#### 4.5.2. Detecção do biomarcador RLEP de *M. leprae* em DNA extraído de fígado de *E. sexcinctus* através de PCR e “Nested” PCR.

Alíquotas dos DNAs extraídos das amostras de fígado (2µL /reação) foram submetidos à análise molecular usando ensaios de PCR convencional ou “NESTED”, utilizando os primers, master -mixes (23µL) e condições de ciclagem descritas por Frota et al., (2012), utilizando o elemento repetitivo específico de *M. leprae* (RLEP) como alvo (tabela 1).

**Tabela 1** - Sequências dos iniciadores utilizados para RLEP PCR ( FROTA et al. 2012).

		Sequência	Produto
<b>Iniciadores externos</b>	RLEP2-1	5'-ATATCGATGCAGGCGTGAG-3'	<b>282 pb</b>
	<b>RLEP2-2</b>	5'-GGATCATCGATGCACTGTTC-3'	
<b>Iniciadores internos</b>	RLEP2-3	5'-GGGTAGGGGCGTTTTAGTGT-3'	<b>238 pb.</b>
	<b>RLEP2-2</b>	5'-GGATCATCGATGCACTGTTC-3'	

pb – pares de base

Durante o preparo das reações da PCR, controles negativos, que consistiam em tubos nos quais se substituiu DNA por água, foram incluídos em cada ensaio para controle da contaminação durante a análise molecular. Além disso, DNA de *M. leprae*, foram incluídos em todos os ensaios em concentrações finais de 50 e 5 femtogramas (fg), para confirmar o inter-ensaio reprodutibilidade. Este DNA utilizado como controle positivo, foi obtido a partir de bacilos de *M. leprae* (cepa Thai53), purificados de cultivo em patas de camundongo nude (FERREIRA et al., 2018), bem como quantificado utilizando o kit de ensaio HS dsDNA HS da Qubit™ (Invitrogen).

As amostras que foram negativas na primeira reação (usando 40 ciclos), foram analisadas em conjunto com os controles negativos (água e fígado bovino) desse ensaio, em uma segunda reação (usando 25 ciclos), onde 1 µl do produto da primeira reação, foi utilizado como molde para 24 µL de master-mix empregando uma par de iniciadores internos (FROTA et al., 2012). Todos os ensaios foram repetidos pelo menos duas vezes.

Para análise da amplificação resultante, 5 µL do produto final de cada amostra foi analisado através da eletroforese em gel de agarose 1,5%, com tampão de corrida Tris-Acetato EDTA (TAE) (0,5x = 20 mM Tris base; 10 mM ácido acético; 0,5 mM EDTA – pH 8,0), em voltagem constante de 5 V/cm, durante 40 minutos.

A determinação dos tamanhos do produto foi feita através da comparação visual com marcadores de peso molecular (GeneRuler 50 bp DNA Ladder, produto # SM0371 Thermo Scientific). Os géis foram corados por submersão em solução de brometo de etídio (0,5

µg/ml), observados e digitalmente registrados em transiluminador. Alíquotas de cada reação foram estocadas a -20 °C para análises moleculares posteriores.

#### **4.5.3. Avaliação pos-amplificação dos produtos do PCR através de polimorfismo do comprimento de fragmento de restrição da reação em cadeia da polimerase (PCR-RFLP)**

Amostras que geraram produtos com os tamanhos esperados de 282 pb (utilizando iniciadores externos) ou 238 pb (utilizando iniciadores internos), foram submetidas a uma avaliação pós-amplificação baseada na caracterização de polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP).

Para esta análise, utilizou-se as enzimas *Dde* I (New England Biolabs) e *Msp* I (Promega) em reações separadas, a fim de digerir o produto de 282 pares de bases (pb) do ensaio de primeira reação e /ou o produto de 238 pb da segunda reação. As digestões foram realizadas combinando 5 µL de amplicon, 1,2 µL do tampão de reação apropriado, 1,2 unidades de endonuclease de restrição, 1,2 µL de albumina de soro bovino (0,1 mg/mL) e água de grau de biologia molecular (Sigma), até um volume final de 12 µL. Tubos foram incubadas a 37 ° C por 3 h, seguida de eletroforese em gel de agarose (2,5%) a uma voltagem constante de 5V/ cm por 90 min.

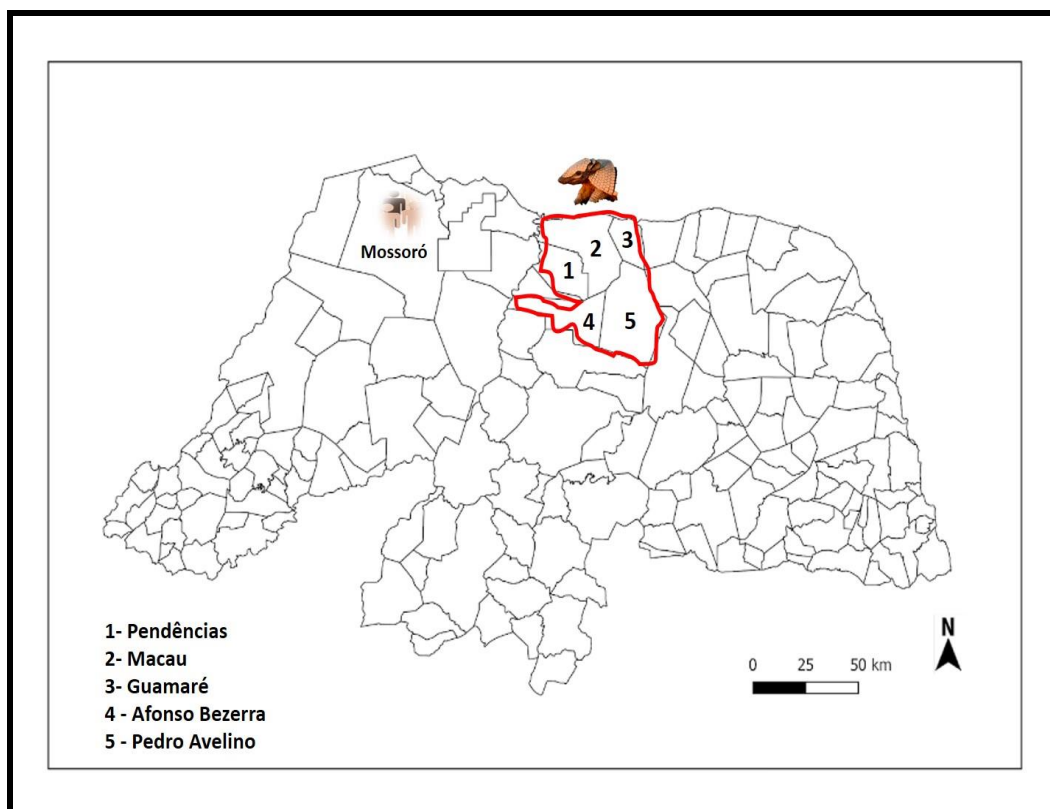
Os géis foram corados com brometo de etídio, observados e fotografados digitalmente sob iluminação ultravioleta. Os padrões de bandas foram comparados entre amostras e por comparação com um marcador de peso molecular de DNA (GeneRuler 50 bp DNA Ladder - produto # SM0371 Thermo Scientific). As imagens resultantes foram analisadas utilizando o “software” livre Gel-Analyzer, disponível em <http://www.gelanalyzer.com>, para determinar com precisão o tamanho dos fragmentos de restrição individuais.

A digestão do amplicon 282 pb, gerado a partir de DNA de *M. leprae* (reação utilizando primers Rlep 2.1 e Rlep 2.2) utilizando a enzima *Dde*I gera bandas de 214 pb e 68 pb, enquanto que a digestão com *Msp*I gera fragmentos de 208, 30 e 44 pb. Já os padrões de bandas gerados a partir do amplicon da reação nested (238pb), utilizando os primers internos Rlep 2.3 e Rlep 2.2, são 170 e 68 pb quando se utiliza *Dde*I e 164, 30 e 44 pb para *Msp*I.

## **4.6. Genotipagem**

### **4.6.1 Amostragem**

Os DNAs obtidos a partir de fígado de *E. sexcinctus* oriundos do RN, bem como de fígados de *D. novemcinctus* oriundos de SP (n=1), e MT (n=3), foram extraídos como reportado no item 4.5.1 e submetidos à análise de genotipagem descrita abaixo. Além disso, amostras clínicas de pacientes de Mossoró (n=54) também foram processadas conforme a metodologia a seguir, e incluídas nas análises de genotipagem. Dada a inexistência de dados reportados para estirpes de *M. leprae* de pacientes de Mossoró, RN, a qual é hiperendêmica pra hanseníase e encontra-se próximas aos cinco municípios do RN, nos quais se capturou-se os tatus brasileiro, foi avaliada a diversidade genética das estirpes de *M. leprae* oriundos de pacientes desta região (figura 14) (anexo C).



**Figura 14:** Mapa do estado do Rio Grande do Norte. Em destaque encontra-se o município de Mossoró, bem como os cinco municípios (numeração: 1 a 5) nos quais se realizou a captura dos tatus da espécie *E. sexcinctus*. Fonte: Base cartográfica do IBGE (suporte geográfico).

#### 4.6.2. Obtenção de DNA oriundo de amostras de pacientes

O DNA foi extraído diretamente das lâminas com baciloscopia positiva de pacientes residentes em Mossoró (RN) e as amostras foram tratadas conforme descrito por VAN DER ZANDEN et al., 1998, consistindo na aplicação de 25 µl de água destilada em cada um dos três locais de tecido contendo BAAR fixados e corados nas lâminas de vidro, remoção do material fixado por raspagem, seguido de transferência para um tubo tipo Eppendorf (1,5 mL).

Posteriormente, a amostra foi misturada com um mesmo volume de 15% de Chelex-100 (Sigma-Aldrich) preparado em água, incubada por 30 min a 97°C, e em seguida centrifugada a 14.000 x g por 10 min. Os sobrenadantes foram transferidos para outros tubos de microcentrífuga e armazenado em - 20°C para análises moleculares posteriores.

#### 4.6.3. Banco de dados de pacientes

A fim de se realizar a análise comparativa entre os genótipos de *M. leprae* circulantes em tatus e pacientes oriundos do Brasil e outras locais no mundo criou-se um banco de dados incluindo genótipos publicados anteriormente referente à estirpes de *M. leprae* obtidas de pacientes de diferentes países: Brasil (FONTES et al., 2009, 2012); China (WENG et al., 2007, 2011, 2013; XING et al., 2009), Colômbia (CARDONA-CASTRO et al., 2009c, 2013), EUA (TRUMAN et al., 2011), Filipinas (SAKAMURI et al., 2009a, 2009b), Índia (LAVANIA et al., 2007, 2011, 2015; SHINDE et al., 2009; YOUNG et al., 2008), Tailândia (PHETSUKSIRI et al., 2012; SRISUNGNAM et al., 2009) e Venezuela (não publicados).

Os genótipos obtidos de pacientes brasileiros, incluem genótipos de *M. leprae* circulantes nos estados do Ceará (CE), Pernambuco (PE), Rondônia (RO), Mato Grosso (MT), Pará (PA), Rio de Janeiro (RJ) e São Paulo (SP) (FONTES et al., 2009, 2012, 2017; LIMA et al., 2018). Além disso, inseriu-se os únicos genótipos reportados para estirpes de *M. leprae* obtidas de tatus até o momento, sendo estes referentes a tatus *D. novemcinctus* dos EUA (TRUMAN et al., 2011).

#### 4.6.4. Detecção de VNTRs usando PCR e análise de comprimento de fragmentos

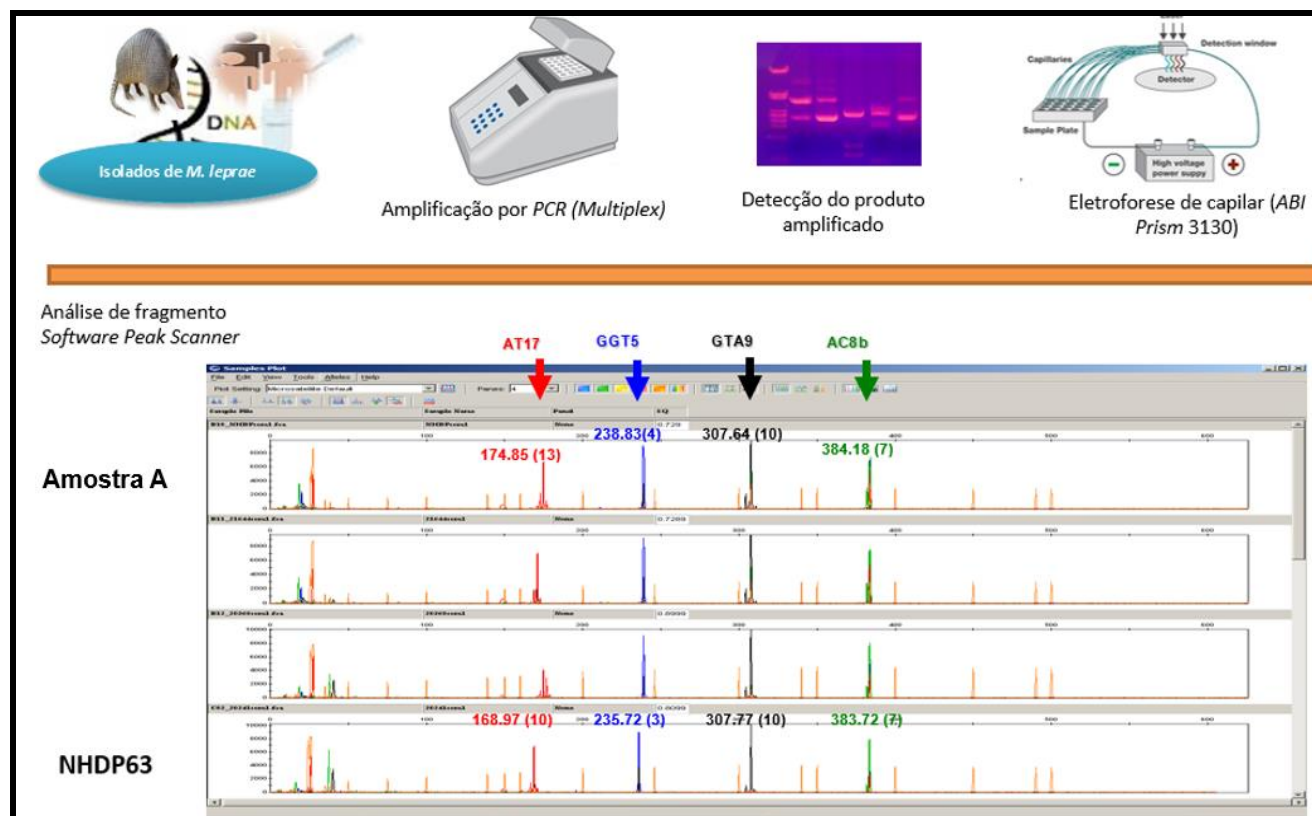
Amostras de DNA foram submetidas à genotipagem para 16 VNTRs, conforme descrito por kimura et al. (2009). As sequências de pares de iniciadores utilizados para amplificação são listadas na tabela 2.

**Tabela 2:** Repetições (VNTRs) selecionadas para o estudo, iniciadores utilizados e tamanho dos fragmentos esperados após amplificação.

PCR	Repetição	Iniciadores Senso	Iniciadores Anti-Senso	TF
<b>C01</b>	AC8b	VIC-gcccacttacctcaaccaac	cctataacggcactcagcca	390
	GTA9	NED-agccttagtcgcgagatg	tccgctgtccgtccgctga	307
	GGT5	6FAM-gcagcgggtgaacagcatagc	tgctgccttgcgaaacggtc	242
	AT17	PET-tctccaacatgctgcgaca	gtacagcggcctgatcgaa	181
<b>C02</b>	21-3	6FAM-gaatctgacctttcgaaatg	cgatgcagcttctactagg	312
	AC9	NED-agcgcccgttgctgataga	gactggatgtcggcacccc	236
	AT15	PET-caatatgcggggttgcgcttctg	ccgtctggctcgatggctggattc	168
<b>C03</b>	AC8a	VIC-gtgttacgcggaaccaggca	ccatctgttggtactactga	124
	27-5	6FAM-attgagcagatggccggtc	agcagtcggcacgccctt	327
	6-7	VIC-gccatcgttgctcggttcac	cggaggaggtgggtacgggt	268
	TA18	NED-cgtgcgtcgtgtgtaggc	gacgtggcaacatcgaagtt	230
	GAA21	PET-ctacagggggcacttagctc	ggacctaaacctcccgtttt	201
<b>C04</b>	18-8	PET-gcccgtctatccgatcaa	gcaaagatcagcacgccaat	348
	12-5	VIC-ctggtccacttgcggtacgac	ggagaaggaggccgaataca	289
	23-3	6FAM-ccgaagccctggacgaag	gccgtaaatccgctccc	326
	TA10	PET-tagattcaaacgacctgca	tgataatcacgtgttccgc	185

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

Em resumo, as amostras foram amplificadas através de quatro reações em multiplex com iniciadores marcados com fluorescência. Os amplicons foram desnaturados e submetidos à eletroforese de capilar (ABI 3130 Genetic Analyzer, da Applied Biosystems), utilizando os padrões internos de dimensionamento de peso molecular (LIZ 500). O número de cópias alélicas foi determinado utilizando o “software Peak Scanner” (Applied Biosystems, Brasil), conforme o esquema ilustrativo abaixo (figura 15).



**Figura 15 - Esquema ilustrativo do procedimento de detecção de VNTRs usando PCR e análise de comprimento de fragmento.** Este procedimento é realizado para amplificação dos marcadores VNTRs e determinação do número de cópias dos alelos através do “software” *Peak Scanner*. Exemplificando: O alelo AT17 (em vermelho) consiste na repetição de duas bases 17 vezes no genoma. Na cepa referência NHDP63, 168.97 equivalem a 10 cópias deste alelo. Na amostra A, a análise de fragmento evidenciou 174.85. Comparando com a cepa referência NHDP,  $174.85 - 168.97 \sim 6$ . Sendo assim, como o marcador AT17 consiste em uma repetição de 2 bases, a amostra A apresenta 3 cópias ( $6/2 = 3$  cópias) a mais deste alelo, em comparação a cepa referência NHDP63.

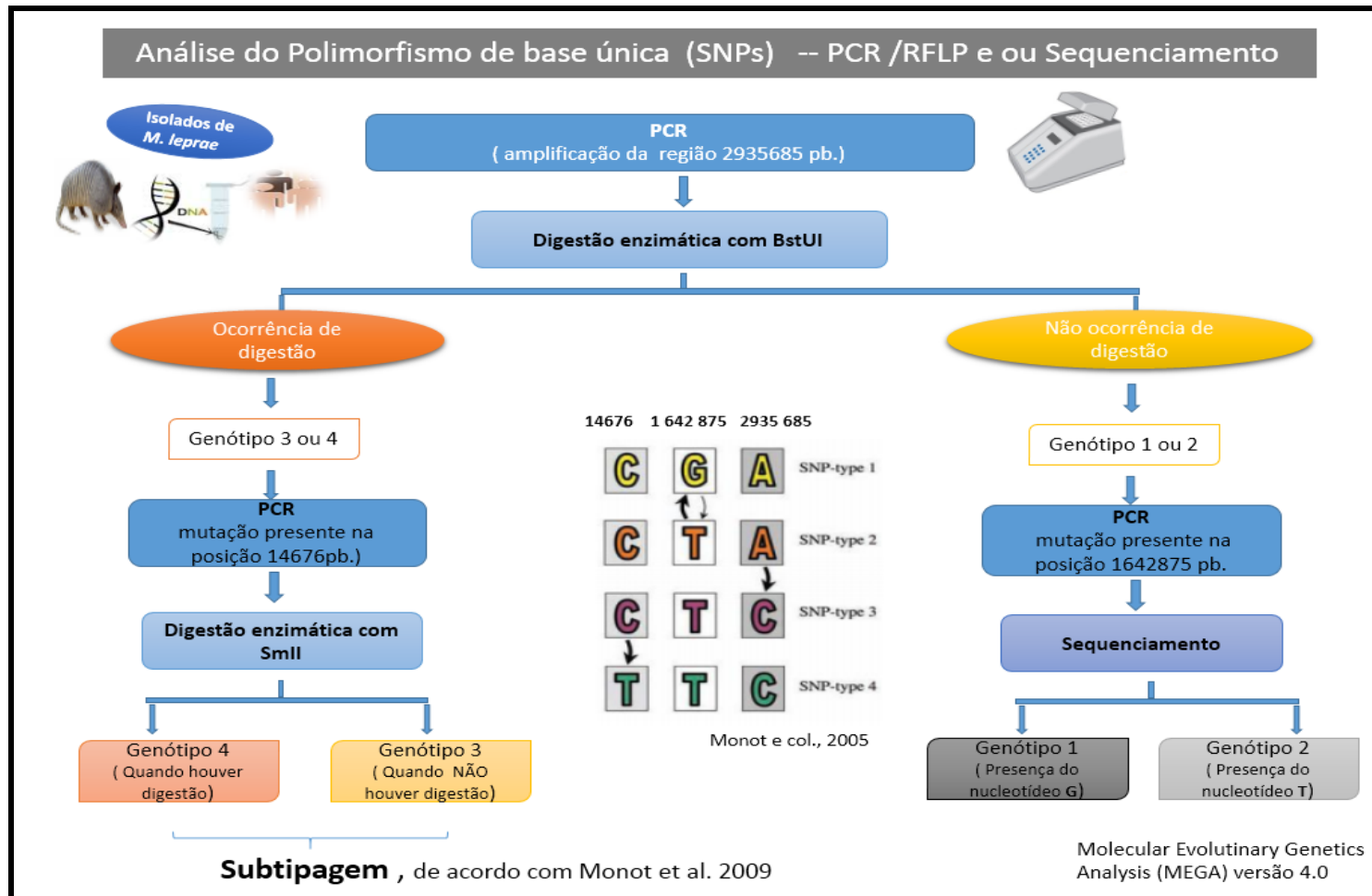
#### 4.6.5. Tipagem de polimorfismo de nucleotídeo único/ “Single nucleotide polymorphism” (SNP)

Para a amplificação das mutações de base única nas posições de 14.676, 1.642.875 e 2.935.685 do genoma de *M. leprae* (COLE et al., 2005) foram utilizados 3 pares de iniciadores descritos por Sakamuri et al., (2009) (Tabela 3).

**Tabela 3** - Iniciadores utilizados para genotipagem baseada no Polimorfismo de base única (SNP).

POSIÇÃO DOS POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA	SEQUÊNCIA DOS INICIADORES
<b>14.676</b>	(SENSO) 5' AAT GGA ATG CTG GTG AGA GC 3'
	(ANTI-SENSO) 5' CAA TGC ATG CTA GCC TTA ATG A 3'
<b>1.642.875</b>	(SENSO) 5' TGC TAG TTT AAC CGA GTA CTG CTA 3'
	(ANTI-SENSO) 5' GTA GTA GTC TTC CAA GTT GTG GTG 3'
<b>2.935.685</b>	(SENSO) 5' ATC TGG TCC GGG TAG GAA TC 3'
	(ANTI-SENSO) 5' ACC GGT GAG CGC ACT AAG 3'

A diferenciação dos genótipos 1/2 e 3/4 foi obtida submetendo-se a análise por PCR-RFLP mediada por *Bst*UI do locus na posição nucleotídica 2,935,685; digestão ocorre no caso do genótipo 3/4 e falta de digestão para o genótipo 1/2. A diferenciação dos genótipos 3 e 4 é obtida por PCR-RFLP mediada por *Sml*I na posição de nucleotídeo 14.676; digestão indica SNP genótipo 4 e falta de genótipo 3. A diferenciação de SNP genótipo 1 ou 2 foi realizada por sequenciamento dos amplicons como descrito por Monot et al. (2005) e esquematizado na figura 16.



**Figura 16** - Esquema ilustrativo da análise do Polimorfismo de base única (SNPs), através de PCR/RFLP e/ou sequenciamento. Fonte: Autora



#### 4.6.6. Análise de dados genotípicos, definição de “clusters” e comparação de genótipos

A fim de delinear a relação entre os perfis genotípicos das estirpes obtidos, o número de cópias de todos os alelos foi introduzido em um arquivo do Microsoft Office Excel (Microsoft, Redmond, EUA) e importado para o software Bionumerics v. 7.6 (Applied Maths NV, Saint-Martens-Latem, Bélgica).

A análise de agrupamento foi realizada através de uma matriz de similaridade usando o algoritmo UPGMA (método de grupo de par não ponderado com média aritmética) (SOKAL;MICHENER, 1958), sendo a base para uma árvore de ligação completa para uma representação gráfica como árvores geradoras mínimas “Minimum Spanning Trees” (MST).

Como não foi possível determinar o número de cópias dos VNTRs, devido à falta de amplificação, usou-se uma configuração para considerar isso como “diferente”, então foi adicionado automaticamente o valor do alelo zero “0”.

A definição de “clustering” foi baseada na comparação do número de cópias VNTRs que apresentaram números de cópias idênticos, usando quatro critérios que foram baseados na análise realizada considerando: 16 VNTRs, 11VNTRs, baseados na discriminação alélica dos marcados obtidos mediante cálculo do HGDI (índice de discriminação de Hunter – Gaston).

Além disso, utilizou-se os critérios de análise usando 10 VNTRs e 4 VNTRs, a fim de reproduzir as análises de estudos anteriores, bem como aumentar a possibilidade de realizar análises comparativas de dados gerados em diferentes investigações, dentro e fora do Brasil, onde cada um utilizou diferentes números de VNTRs (LIMA et al., 2018; TRUMAN et al., 2011).

#### 4.6.7. Diversidade alélica

A diversidade alélica ( $h$ ) em cada locus VNTR para todas as amostras brasileiras foi calculada usando a seguinte equação do índice de discriminação de Hunter - Gaston (HGDI):  $h = 1 - \sum x_i^2 [n/(n-1)]$ , onde  $n$  é o número de isolados e  $x_i$  é a frequência do alelo  $i$ th no locus. Cada locus foi classificado como “altamente discriminante” ( $h \geq 0.6$ ), “moderadamente discriminante” ( $0.3 \leq h \leq 0.6$ ) ou “pouco discriminante” ( $h \leq 0.3$ ) (HUNTER; GASTON, 1988).

#### 4.7. Análise espacial

Os pontos de obtenção dos animais foram georreferenciados usando os endereços mais próximos e os mapas do “Google Earth” para encontrar as coordenadas de latitude e longitude. As coordenadas de latitude e longitude foram expressos em graus, minutos e segundos para a criação e manipulação em o software ArcGis ( anexo A).

A possibilidade de dispersão dos grupos de animais avaliados para infecção foi analisada com base nas estimativas de vegetação da área de estudo, através de uma imagem NDVI (“Normalized Difference Vegetation Index”), que em português, equivale a Índice de Vegetação da Diferença Normalizada. Os índices de NDVI variam de -1 a 1, onde mais próximo de 1 estão as áreas de densa vegetação, de 0, áreas de solo exposto. Já as áreas de completa ausência de vegetação (água) apresentam valores negativos. Este índice foi desenvolvido por Rouse et al. (1974), para avaliar a condição geral da vegetação utilizando imagens do satélite ERTS-1 MSS.

Para avaliar a possibilidade de dispersão dos grupos de animais com base na característica topográfica da área, foi adquirido uma imagem da missão “Shuttle Radar Topography Mission” (SRTM), com dados de topografia da área de estudo. A imagem de radar SRTM é originária da missão de mapeamento do relevo terrestre (SRTM, desenvolvido pela NASA (“National Aeronautics and Space Administration”) e NGA (“National Geospatial-Intelligence Agency”) dos EUA no ano 2000, através da qual se obteve um modelo digital de elevação (MDE) para toda a América do Sul (SOUZA FILHO, 2003).

#### **4.8. Aspectos Éticos**

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (Protocolo número 8068280716) (anexo E) e foi licenciado pelo Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais (IBAMA) para a captura e coleta de material biológico de animais silvestres (protocolo número 50564 -2) (anexo F).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Avaliação clínica e anatomopatológica dos tatus da espécie *Euphractus sexcinctus* analisados no estudo.

O grupo de animais analisados no estudo compreendeu 20 tatus da espécie *E. sexcinctus*, incluindo 9 fêmeas e 11 machos com um peso médio de 1,645 Kg (desvio padrão  $\pm 0,491$ ) (Tabela 4).

**Tabela 4:** Identificação, sexagem e padrão de peso dos tatus da espécie *Euphractus sexcinctus* oriundos de cinco municípios do Rio Grande do Norte, Brasil.

IDENTIFICAÇÃO DO ANIMAL	ESPÉCIE	SEXO	PESO (KG)	MUNICÍPIOS (RN)
T 1	<i>Euphractus sexcinctus</i>	M	1,02	Pendências
T 2	<i>Euphractus sexcinctus</i>	M	1,415	Pendências
T 3	<i>Euphractus sexcinctus</i>	F	0,996	Afonso Bezerra
T 4	<i>Euphractus sexcinctus</i>	M	1,769	Afonso Bezerra
T 5	<i>Euphractus sexcinctus</i>	M	1,728	Macau
T 6	<i>Euphractus sexcinctus</i>	M	1,413	Macau
T 7	<i>Euphractus sexcinctus</i>	F	1,932	Pedro Avelino
T 8	<i>Euphractus sexcinctus</i>	F	2,08	Pedro Avelino
T 9	<i>Euphractus sexcinctus</i>	F	1,596	Macau
T 10	<i>Euphractus sexcinctus</i>	F	1,7	Guamaré
T 11	<i>Euphractus sexcinctus</i>	F	2,048	Pendências
T 12	<i>Euphractus sexcinctus</i>	F	1,960	Macau
T 13	<i>Euphractus sexcinctus</i>	M	1,584	Afonso Bezerra
T 14	<i>Euphractus sexcinctus</i>	F	2,464	Afonso Bezerra
T 15	<i>Euphractus sexcinctus</i>	M	1,373	Macau
T 16	<i>Euphractus sexcinctus</i>	M	0,967	Macau
T 17	<i>Euphractus sexcinctus</i>	M	2,750	Pedro Avelino
T 18	<i>Euphractus sexcinctus</i>	M	1,874	Pedro Avelino
T 19	<i>Euphractus sexcinctus</i>	F	1,287	Guamaré
T 20	<i>Euphractus sexcinctus</i>	M	0,945	Guamaré

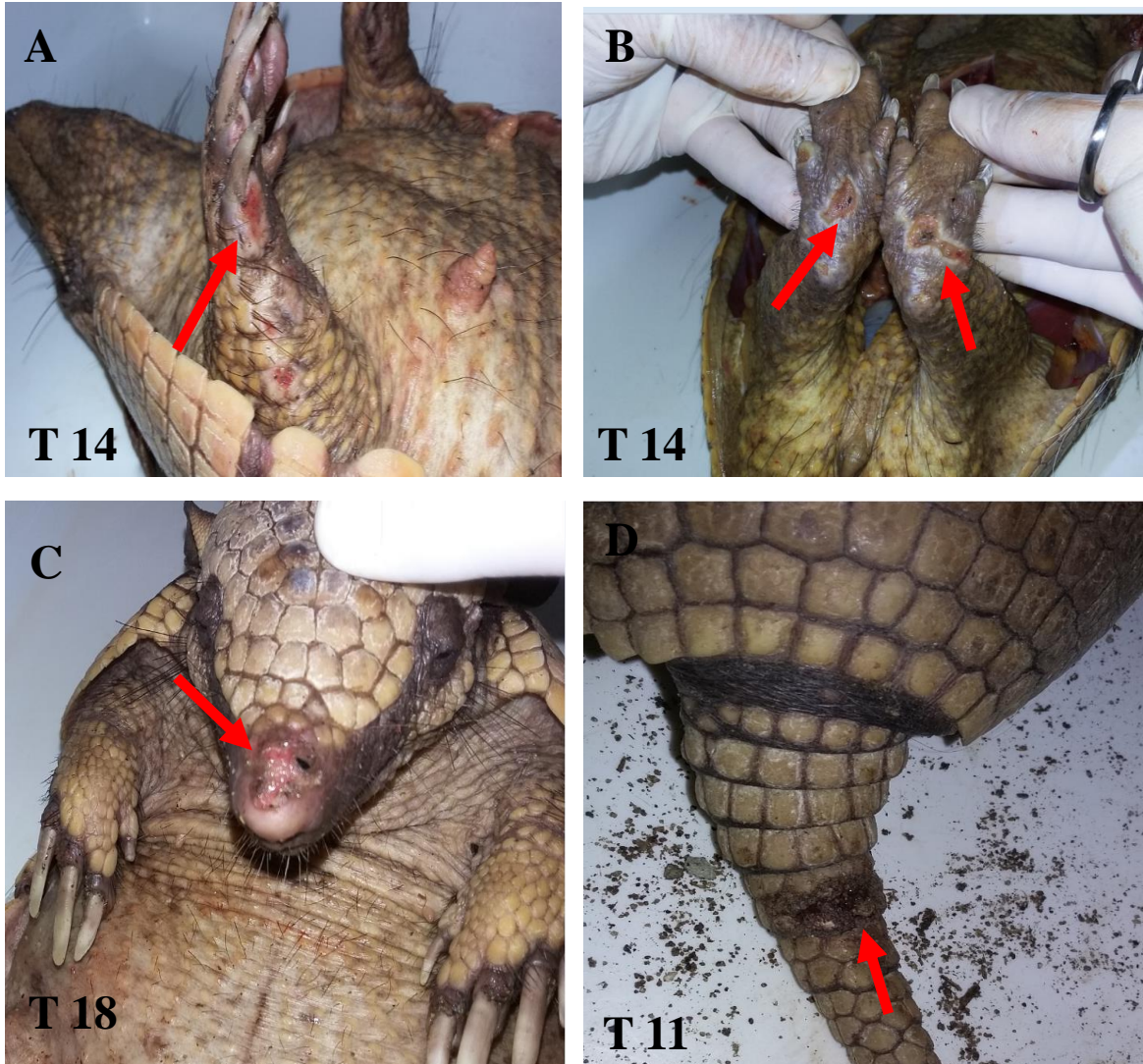
Os exames clínicos e anatomopatológicos evidenciaram a presença de lesões cutâneas em seis animais (30%), esplenomegalia em quatro (20%) e linfadenopatia em sete (35%), como pode ser observado na tabela 5 e nas figuras 17 e 18. Um animal (T03) morreu durante o período de aclimatização, mas a hora exata da morte não pôde ser determinada. Foi possível coletar sangue do animal, porém a necropsia não revelou a causa da morte.

Além disso, um animal apresentou hemodiluição (T02) e outra esteatose hepática (T17), associada à lesão de pele e esplenomegalia.

**Tabela 5:** Dados clínicos e anatomopatológicos registrados para tatus da espécie *E. sexcinctus* (n=20) obtidos em cinco municípios do Rio Grande do Norte, Brasil.

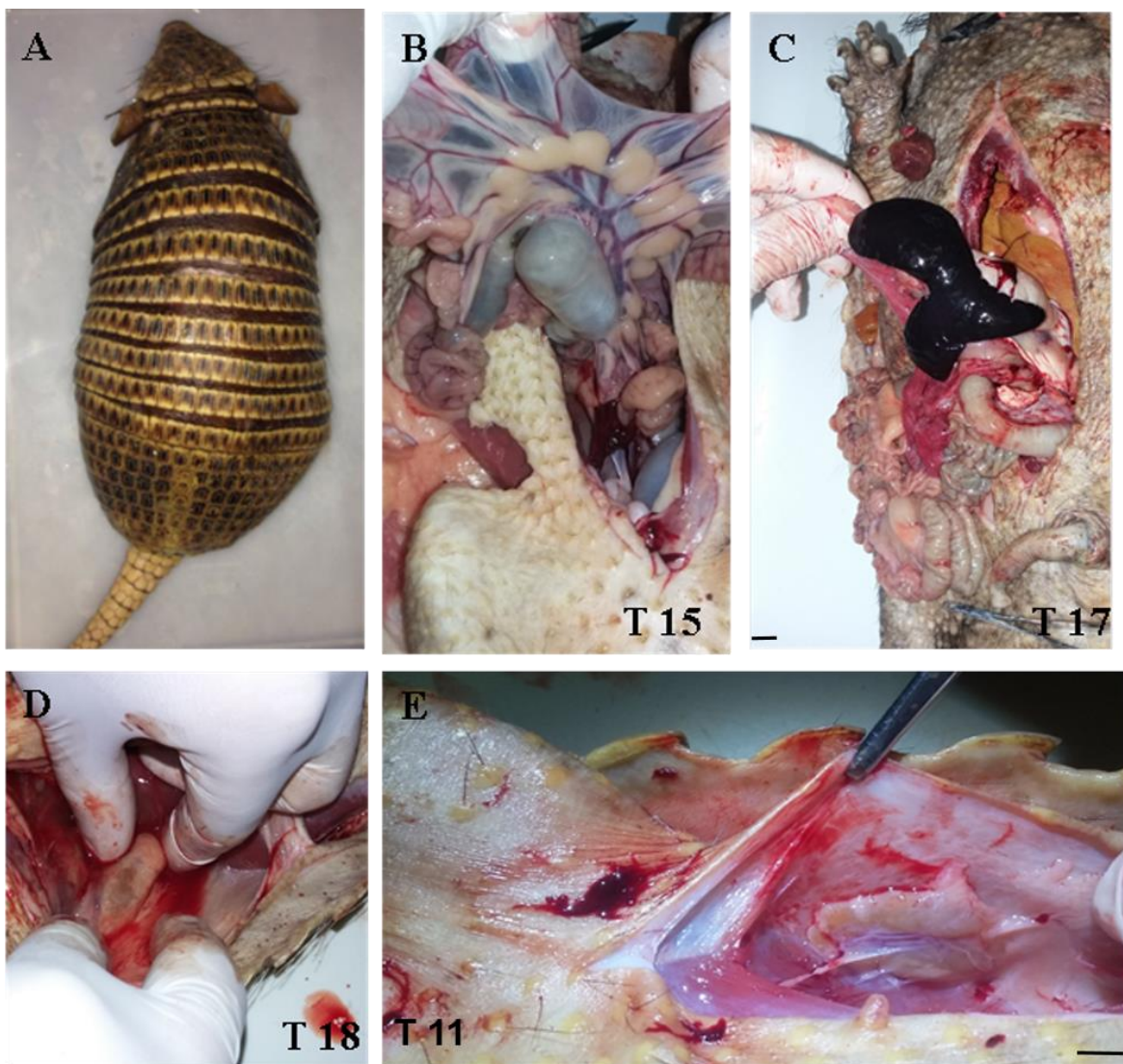
<b>ID ANIMAL</b>	<b>ANÁLISE ANATOMOPATOLÓGICA</b>
<b>T01</b>	lesão cutânea ulcerativa
<b>T02</b>	hemodiluição
<b>T03</b>	animal morto
<b>T04</b>	esplenomegalia
<b>T05</b>	linfadenomegalia
<b>T06</b>	NA
<b>T07</b>	NA
<b>T08</b>	NA
<b>T09</b>	NA
<b>T10</b>	esplenomegalia
<b>T11</b>	lesão de pele e linfadenomegalia
<b>T12</b>	lesão de pele
<b>T13</b>	lesão de pele e linfadenomegalia
<b>T14</b>	esplenomegalia
<b>T15</b>	linfadenomegalia
<b>T16</b>	NA
<b>T17</b>	esplenomegalia, lesão de pele e esteatose
<b>T18</b>	lesão de pele e linfadenomegalia
<b>T19</b>	linfadenomegalia
<b>T20</b>	linfadenomegalia

T- Tatu; NA – nenhuma alteração digna de nota



**Figura 17** - Avaliação clínica de tatus *Euphractus sexcinctus* oriundos de municípios do Rio Grande do Norte (RN). Tatus evidenciando lesões de pele ulcerativas palmar (A), plantar (B) no fuço (C) e na cauda (D).





**Figura 18** -Avaliação anatomopatológica de tatus da espécie *E. sexcinctus* oriundos de municípios do Rio Grande do Norte (RN). (A) Tatus da espécie *E. sexcinctus* em decúbito. Evidências de linfadenomegalia (B, D e E) e evidências de esplenomegalia (C). Barra: 1 cm.

## 5.2. Avaliação da adequação do teste NDO-LID utilizando soros de tatus da espécie *Dasyus novemcinctus*

Os resultados do teste rápido NDO-LID foram comparados com os achados de uma análise anterior, na qual foram analisadas 78 amostras de soro de tatu, através do ensaio de ELISA anti-PGL-I e ELISA anti-LID-1 (Tabela 6). As classificações alocadas aos valores do *Kappa* foram baseadas nos critérios estabelecidos por Rosner (2011).

**Tabela 6** - Avaliação piloto do teste rápido NOD-LID-1 empregando soros previamente analisados de tatus *Dasypus novemcinctus*, caracterizados como positivos ou negativos em Ensaios de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) executadas no Sudeste dos EUA; utilizando os antígenos específicos de *Mycobacterium leprae*, PGL-1 (A) ou LID-1 (B).

(A)

NDO-LID1 TESTE	ELISA-anti PGL=I		TOTAL
	POSITIVO <sup>1</sup>	NEGATIVO <sup>2</sup>	
POSITIVO	34	2	36
NEGATIVO	1	19	20
<b>TOTAL</b>	35	21	56

P < 0,0001

*Kappa*: 0,80 (concordância: muito boa; Rosner B. 2011)

<sup>1</sup>Um total de 35 amostras previamente classificada como positiva em ELISA anti-PGL-1

<sup>2</sup>Um total de 21 amostras previamente classificada como negativa em ELISA anti-PGL-1

(B)

NDO-LID1 TESTE	ELISA-anti LID1		TOTAL
	POSITIVO <sup>3</sup>	NEGATIVO <sup>2</sup>	
POSITIVO	14	2	16
NEGATIVO	8	19	27
<b>TOTAL</b>	22	21	43

P = 0,0001

*Kappa*: 0,54 (concordância: boa; Rosner B. 2011)

<sup>1</sup> Um total de 22 amostras previamente classificada como positiva em ELISA anti-LDI-1

<sup>2</sup>Um total de 21 amostras previamente classificada como negativa em ELISA anti-LID-1

A concordância entre o teste NDO-LID e o ELISA anti-PGL-I foi muito boa (Kappa: 0,80;  $p < 0,0001$ ), com altos níveis de sensibilidade (97,1%) e especificidade (90,5%). Boa concordância (Kappa: 0,54,  $p = 0,0001$ ) foi observada com o ELISA anti-LID-1, com razoável sensibilidade (63%) e especificidade satisfatória (90,5%), como evidenciado na tabela 7.

**Tabela 7** - Características de desempenho do teste NOD-LID-1 para detecção sorológica de *Mycobacterium leprae* em *Dasyatis novemcinctus* em comparação com Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA), utilizando os antígenos específicos de *M. leprae* PGL-1 (A) ou LID-1 (B).

(A)

Teste NDO-LID-1 x ELISA anti-PGL-I	%	IC (95%)
Sensibilidade	97.1	91.6 → 102.7
Especificidade	90.5	77.9 → 103.0
Probabilidade pré-teste	62.5	49.8 → 75.2
Valor Preditivo Positivo	94.4	87.0 → 101.9
Valor preditivo Negativo	95.0	85.4 → 104.6
Acurácia	94.6	88.7 → 100.5

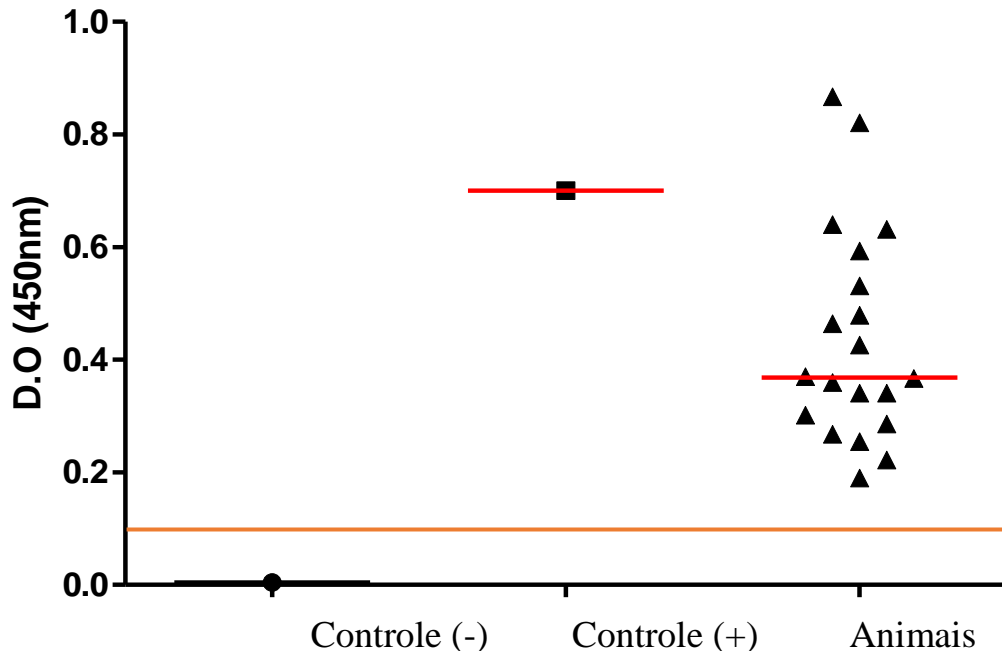
(B)

Teste NDO-LID-1 x ELISA anti-LID1	%	IC (95%)
Sensibilidade	63.6	43.6 → 83.7
Especificidade	90.5	77.9 → 103.0
Probabilidade pré-teste	51.2	36.2 → 66.1
Valor Preditivo Positivo	87.5	71.3 → 103.7
Valor preditivo Negativo	70.4	63.1 → 87.6
Acurácia	76.7	64.1 → 89.4

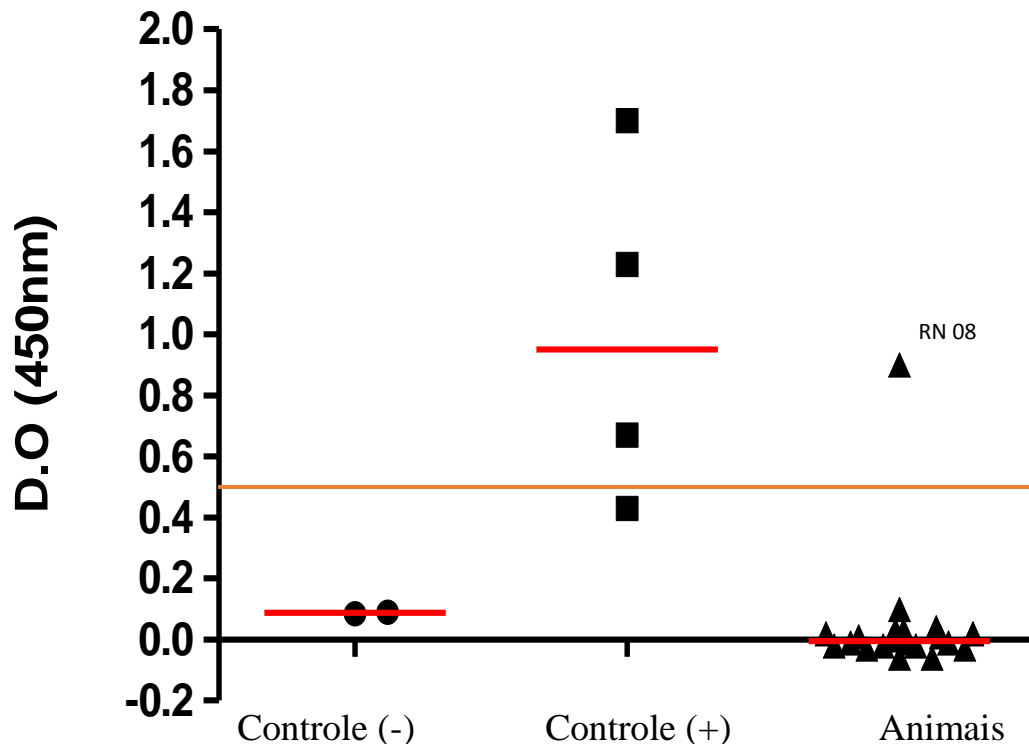


### 5.3. Análise sorológica de tatus *E. sexcinctus* oriundos de cinco municípios do Rio Grande do Norte

A análise sorológica das amostras de soro dos 20 tatus *E. sexcinctus* oriundos do Rio Grande do Norte, realizada através do ELISA anti-PGL-I, evidenciou positividade em 20/20 (100%), enquanto no ELISA anti-LID-1 foi verificado apenas 1/20 (5%) animal positivo, como mostrado nas Figuras 19 e 20.



**Figura 19** - Dosagem de anticorpos anti-PGL-I(IgM) observados em tatus *Euphractus sexcinctus* oriundos de cinco municípios do Rio Grande do Norte (RN). Cada triângulo representa um animal analisado. A linha vermelha corresponde a mediana. A linha horizontal laranja é a linha de corte “cut-off” (OD: 0,1)



**Figura 20** - Dosagem de anticorpos anti-LID1 (IgG) em soros de tatus *Euphractus sexcinctus* oriundos de cinco municípios do Rio Grande do Norte. Cada triângulo representa um animal analisado. A linha vermelha corresponde a mediana. A linha horizontal laranja é a linha de corte “cut-off”(OD: 0,5).

Além disso, quando as 20 amostras foram submetidas aos dois testes sorológicos rápidos de fluxo lateral, um total de 17/20 (85%) dos soros examinados pelo teste rápido NDO-LID foram considerados positivos, enquanto 16/20 (80%), foram considerados positivos no teste ML Flow. Estes resultados foram confirmados ao se repetir os testes, no mínimo, duas vezes.

Os resultados obtidos para as vinte amostras de tatus do Rio Grande do Norte analisadas através dos quatro testes sorológicos são apresentados e resumidos na tabela 8.

**Tabela 8** - Detalhamento dos resultados sorológicos obtidos mediante análise de soro para investigar infecção por *Mycobacterium leprae* em tatus da espécie *Euphractus sexcinctus* (n=20) capturados em cinco municípios do Rio Grande do Norte, Brasil.

Amostra	(D.O) ELISA anti- PGL1 <sup>a</sup>	(D.O) ELISA anti- LID1 <sup>a</sup>	Teste ML flow	Teste NOD- LID
T01	0,821	0,08	+	+
T02	0,222	0,01	-	+
T03	0,286	-0,03	-	-
T04	0,867	0,02	+	+
T05	0,632	0,04	+	+
T06	0,640	0,02	+	+
T07	0,255	0	+	-
T08	0,593	0,9	+	+
T09	0,367	-0,06	+	+
T10	0,531	-0,01	+	+
T11	0,341	0,01	+	+
T12	0,341	-0,02	+	+
T13	0,360	-0,01	+	+
T14	0,426	0,08	-	+
T15	0,302	-0,03	+	+
T16	0,190	-0,02	-	-
T17	0,370	-0,02	+	+
T18	0,464	0,1	+	+
T19	0,479	-0,06	+	+
T20	0,268	-0,01	+	+

<sup>a</sup>Reatividade dos anticorpos anti-PGL-I (IgM) e anticorpos anti-LID1 (IgG); (valores de “cut-off” D.O 0,101 e D.O 0,500 respectivamente) em tatus *Euphractus sexcinctus* oriundos de cinco municípios do Rio Grande do Norte, Brasil;

Como observado na avaliação realizada com os soros de *D. novemcinctus*, os testes de LF demonstraram um grau de discordância com os dados de ELISA anti-PGL-1 obtidos para os 20 soros de *E. sexcinctus*, especificamente em relação ao fenômeno de falsos negativos. Apenas 2/20 (10%) dos soros foram negativos para os dois testes de FL, mas ambas as amostras (T03 e T16) foram positivas no ELISA anti-PGL-1

No caso do animal T03, a negatividade observada nos testes de FL pode refletir uma infecção em momento inicial em que o animal estava nos estágios preliminares de soro-conversão, como indicado pelo valor de DO de 0,286.

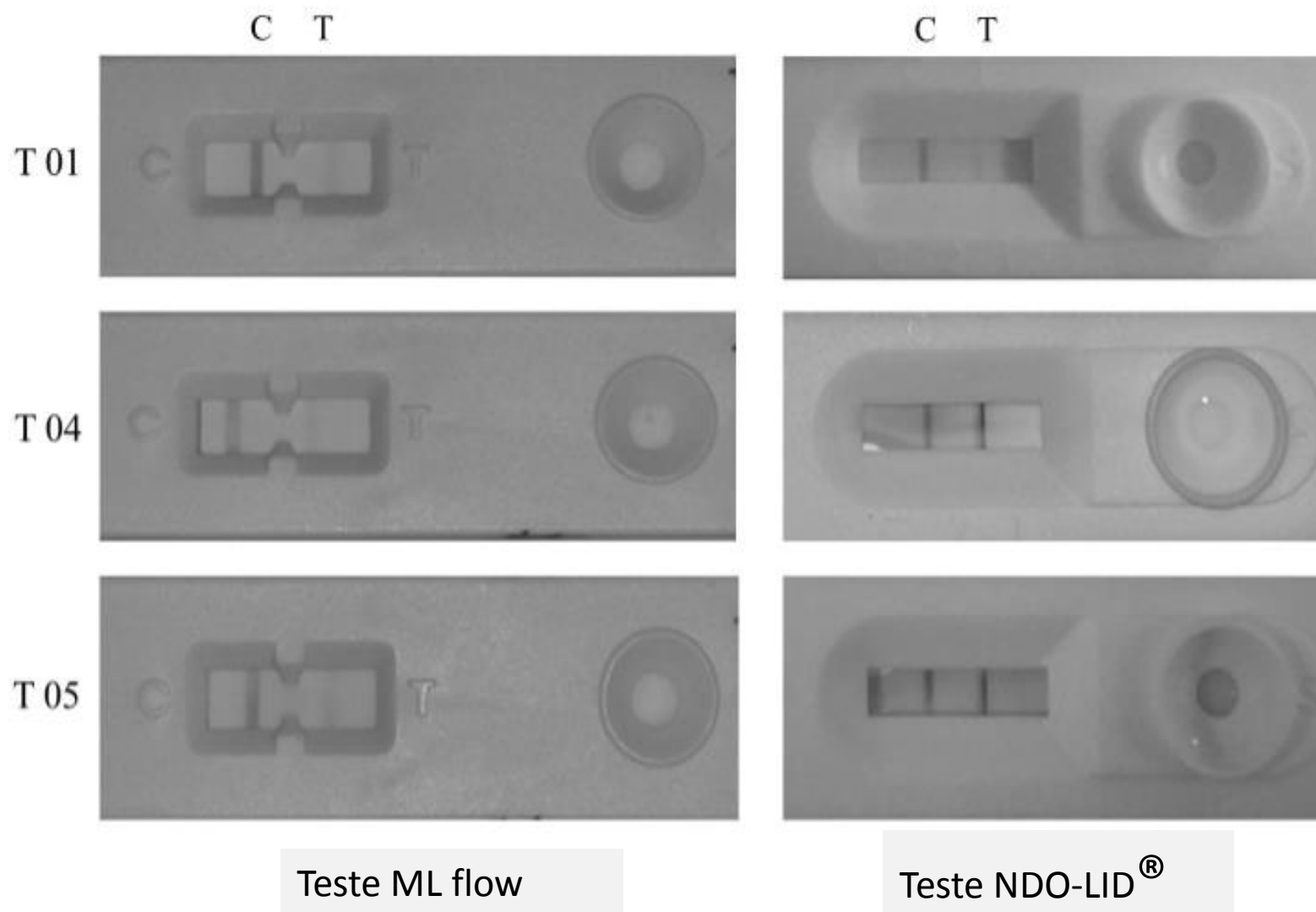
A amostra T16 apresentou o menor valor de O.D (0,19), sendo este o mais próximo do ponto de corte utilizado no ELISA anti-PGL-1. As discrepâncias adicionais observadas entre o FL e o ELISA incluíram dados obtidos com as amostras T02 e T14, que foram registradas

como positivas no teste NOD-LID® e negativas para o teste de fluxo ML, mesmo após repetir o teste duas vezes.

O valor da D.O. registrada para a amostra T14 foi de 0,426, valor superior aos registrados para 5 amostras (T9, T11, T12, T13 e T17), que produziram respostas claramente positivas em ambos os testes de FL. Já a amostra T02 apresentou um menor valor de O.D. (0,222), mas foi claramente positivo no teste NDO-LID®.

Em contraste com as amostras T02 e T14, as quais foram positivas no ELISA anti-PGL1 e teste NOD-LID®, mas negativas no teste rápido ML flow, o soro do animal T07, embora tenha sido também positivo por ELISA (D.O. 0,255) e no sistema de fluxo ML flow, foi classificado como negativo no teste NOD-LID®.

Além disso, como mostrado na figura 21, o teste NDO-LID apresentou bandas mais nítidas e mais facilmente interpretáveis do que o teste ML flow. Esse recurso serviu para reduzir dúvidas sobre a positividade de algumas amostras.



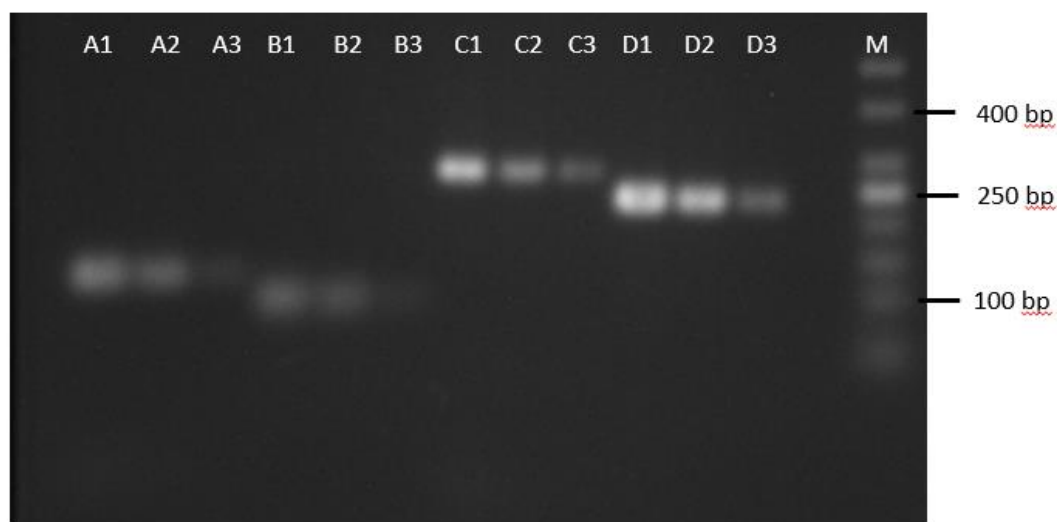
**Figura 21** - Avaliação comparativa da intensidade de bandas (facilidade de interpretação) para três soros representativos oriundos de tatus de *Euphractus sexcinctus* e examinados usando o teste de fluxo lateral ML flow teste (A) e o teste NDO-LID<sup>®</sup> (B), sendo C= linha na zona de controle e T:= linha na zona de teste.

## 5.4. Análise Moleculares

### 5.4.1. Avaliação de sensibilidade do sistema RLEP PCR convencional/ “NESTED” PCR

A sensibilidade de quatro ensaios de PCR para o alvo RLEP foi determinada usando o DNA controle de *M. leprae*. Observa-se que embora todos os pares de primers tenham sido capazes de detectar todas as concentrações, 500 fg, 50 fg e 5 fg de DNA de *M. leprae*, o sistema proposto por Donoughe et al. (2001), o qual utiliza os primers Lep1 e Lep 2 (Figura 22, letra A) e Lep3 e Lep4 (Figura 22, letra B) foi menos sensível e produziu quantidade muito discreta de produto quando usado 5f de DNA de *M. leprae* (Figura 22, A3 e B3).

Já o sistema, o qual se utiliza os iniciadores Rlep 2.1 e Rlep 2.2 (Figura 22, letra C) e Rlep 2.3 e Rlep 2.2 (Figura 22, letra D), proposto por Frota et. (2012), foi mais sensível e forneceu uma quantidade maior de amplicon em todas as concentrações de DNA molde testadas.



**Figura 22 - Teste de sensibilidade de quatro ensaios de PCR para detecção do alvo RLEP.** Gel de agarose 2%. Os números de 1, 2, 3 correspondem ao DNA de *M. leprae* nas concentrações, 500 fg, 50 fg e 5 fg, respectivamente. O sistema proposto por Donoughe et al. (2001), consiste em dois pares de primers, sendo **A** - reação utilizando os primers **Lep1 e Lep 2 (convencional PCR)** e **B**- reação utilizando os primers **Lep3 e Lep4 (Nested PCR)**. O sistema proposto por Frota et al. 2012, também consiste em dois pares de primers, sendo **(C)** reação utilizando os primers **Rlep 2.1 e Rlep 2.2 (convencional PCR)** e **(D)** reação utilizando os primers **Rlep 2.3 e Rlep 2.2. (semi-“nested” PCR)**. **M** corresponde ao marcador molecular (GeneRuler 50 bp DNA Ladder, produto # SM0371 Thermo Scientific)

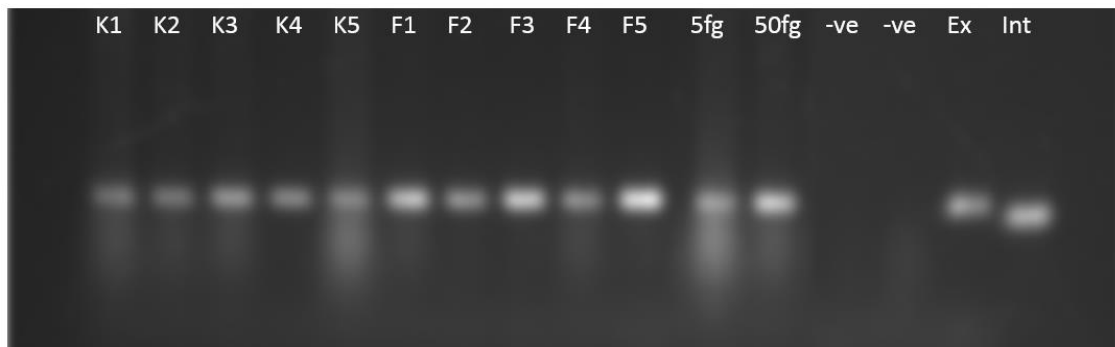
### 5.4.2. Avaliação comparativa entre dos métodos de extração de DNA

Os métodos de extração de DNA utilizando Kit Qiagen e fenol:clorofórmio “*in house*” foram avaliados para cinco amostras (T1, T2, T3, T4 e T5) de fígado de tatu *E. sexcinctus* com positividade confirmada para infecção por *M. leprae*, determinado através de análises sorológicas.

Todas as amostras de DNA geradas pelos dois métodos de extração foram analisadas usando o sistema RLEP, utilizando os iniciadores Rlep 2-1 e Rlep 2.2 (FROTA et al 2012). A

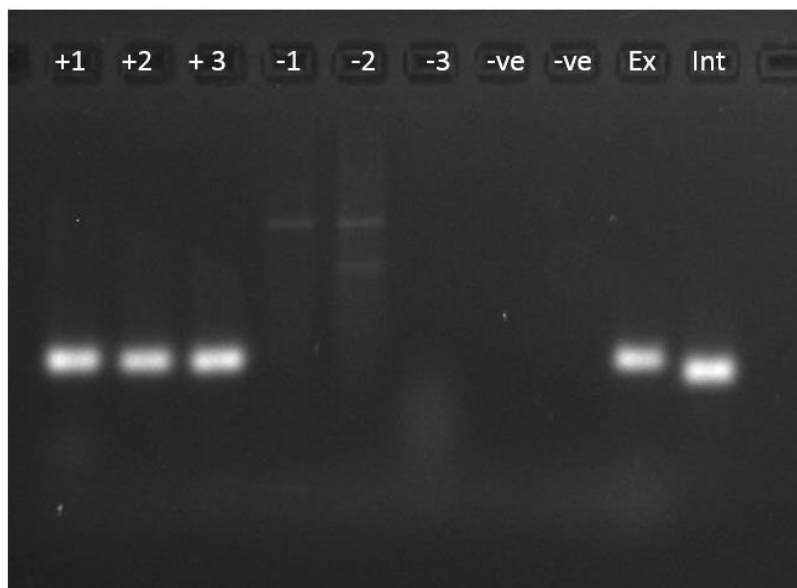
escolha deste ensaio foi tomada com base nos resultados, mostrados na figura 23, referente à sensibilidade dos PCRs.

Os métodos de extração foram muito eficazes, possibilitando amplificação por RLEP PCR de todas as amostras de tatus naturalmente infectados (figura 23).



**Figura 23 - Avaliação comparativa de dois métodos de extração de DNA de tecidos de fígado de tatu, através da análise por Rlep PCR usando os primers Rlep 2-1 & Rlep 2.2, proposto por Frota et al (2012).** Gel de agarose 2%. A numeração de 1 a 5, correspondem às amostras de DNA de fígado de tatus *E. sexcintus* positivos para *M. leprae* (determinado através de sorologia e análise molecular de VNTRs) submetidas aos dois diferentes métodos de extração avaliados. **K1-K5** correspondem a cinco amostras de fígado submetidas à extração pelo Kit Qiagen e **F1-F5** correspondem às mesmas amostras de fígado submetidas à extração pelo método fenol:clorofórmico. O controles positivos, correspondem a 5fg e 50fg de DNA de *M. leprae*. **-ve** corresponde aos controles negativos da reação (água em vez de DNA). **Ex** corresponde ao produto de PCR de 282 pb referente a reação utilizando os iniciadores **Rlep 2.1 e Rlep 2.2**, utilizado nesta avaliação e **Int** corresponde ao produto de PCR de 238 pb referente a reação utilizando os iniciadores **Rlep 2.3 e Rlep 2.2**, ambos propostos por Frota et al. (2012).

Além disso, os métodos de extração possibilitaram amplificação por RLEP PCR dos três controles positivos de extração, referentes a ambos métodos de extração. Vale ressaltar que os três controles de extração negativos não amplificaram (figura 24)

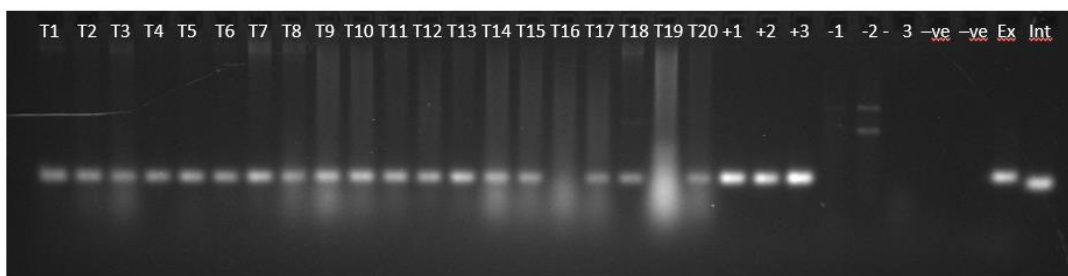


**Figura 24 - Amplificação por RLEP PCR dos controles positivos e negativos de extração da avaliação comparativa de dois métodos de extração de DNA de fígado de tatu.** Gel de agarose 2%. Estas amostras foram amplificadas ao mesmo tempo que as amostras da figura 23, onde +1, e +2, bem como -1 e -2 correspondem aos controles positivos e negativos de extração usando Kit Quiagen, respectivamente. Já +3 é controle positivo de extração, usando o método Fenol:clorofórmio e -3, consiste no respectivo controle negativo. -Ve consiste no controle negativo da reação (água). Ex, é o produto de PCR de 282pb (iniciadores Rlep 2.1 +2.2) e Int é o produto de PCR de 238 pb (iniciadores Rlep 2.3 + 2.2).

#### **5.4.3. Detecção molecular de infecção por *Mycobacterium lepare* em tatus *Euphractus sexcinctus* oriundos do Rio Grande do Norte através de RLEP PCR**

As amostras de DNA de fígado de 18 animais, (T1 a T20, exceto T16 e T19), evidenciaram amplificação do alvo RLEP (fragmento de 282pb) no ensaio de PCR convencional, utilizando os iniciadores Rlep 2.1 e Rlep 2.2. Em relação as duas amostras que não conseguiram produzir o “amplicon” na reação de PCR acima, observou-se que T16 foi positivo apenas por “nested” PCR, especificamente quando uma alíquota (1 µL) da primeira reação foi submetida à reação utilizando os iniciadores internos Rlep 2.3 e Rlep 2.2 (figura 25).





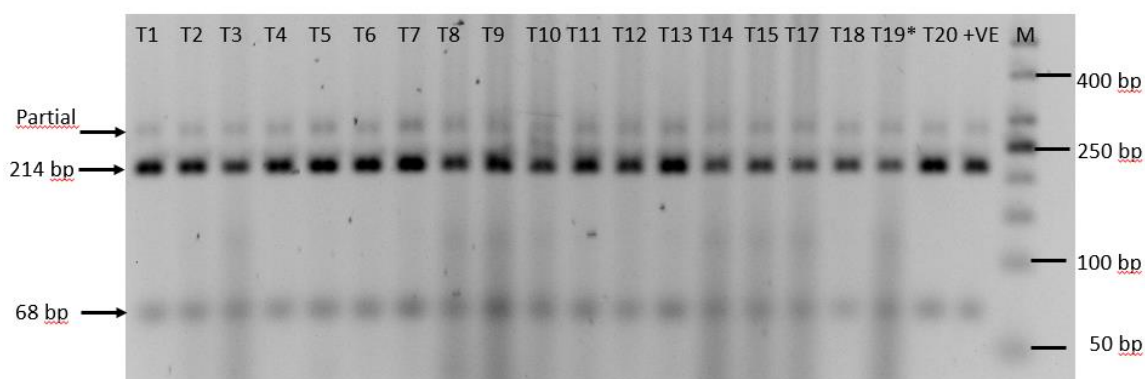
**Figura 25 - Detecção molecular de infecção por *M. lepreae* em tatus *E. sexcinctus* oriundos do Rio Grande do Norte, através de RLEP PCR.** Gel de agarose 2%. T1 – T20 corresponde aos DNAs de fígado de tatu analisados. As amostras +1, +2 e +3, bem como -1, -2 e -3, correspondem aos controles positivos e negativos de extração, respectivamente. -ve corresponde aos controles negativos da reação (água). Ex corresponde ao produto de PCR de 282pb referente a reação utilizando os primers **Rlep 2.1 e Rlep 2.2**, utilizado nesta avaliação e **Int** corresponde ao produto de PCR de 238 pb referente a reação utilizando aos primers **Rlep 2.3 e Rlep 2.2**, ambos proposto por Frota et al. (2012).

A incapacidade de amplificar o alvo RLEP na amostra T19 foi observada para o DNA extraído de dois fragmentos de fígado distintos. Assim, diluições em série (1:10 e 1: 100) dessas amostras foram preparadas em tampão AE, para avaliar a possibilidade de inibição.

Os DNAs extraídos de ambos os fragmentos de fígado, da amostra T19, foram diluídos em duplicata para produzir quatro amostras diluídas 1:10 e mais quatro diluídas 1: 100. Todas as amostras diluídas 1:10, geraram o produto de amplificação do tamanho esperado (282 pb) nas reações de PCR convencionais. No entanto, as amostras diluídas 1: 100 produziram o amplicon em apenas 1 das 4 reações convencionais, mas foram positivas em 3 das 4 reações “nested”.

#### **5.4.4. Identificação de *M. lepreae* utilizando PCR RFLP**

A confirmação da infecção por *M. lepreae* foi realizada através da técnica de RFLP. Portanto, a partir do DNA do controle positivo (+ ve, que corresponde a 50 fg de DNA de *M. lepreae*), o produto amplificado de 282 pb gerado por RLEP PCR, quando digerido com *DdeI* gerou bandas de 214 pb e 68 pb (figura 26), enquanto a digestão com *MspI* produziu fragmentos de 208, 30 e 44 pb.



**Figura 26 - Análises pós-amplificação (PCR-RFLP) de produtos (282 pb) gerados pelos iniciadores Rlep 2.1 e Rlep 2.2, usando DNA oriundo das amostras de fígado de *E. sexcinctus* como molde. Os amplicons foram digeridas pela enzima *DdeI* e separadas em gel de agarose (2.5%), para confirmar a identificação de *M. leprae*. Amostras T1 – T15, T17, T18, T 19 e T20 correspondem aos amplicons (282 pb). +ve corresponde ao amplicon gerado a partir da amostra de 50fg de DNA de *M. leprae* conforme relatada nos testes de sensibilidade. M corresponde ao marcador de peso molecular (50 pb).**

Os mesmos padrões de bandas foram observados para amplicons das 19 amostras de fígado (exceto T16) de *E. sexcinctus* positivas na reação RLEP PCR convencional (primers Rlep 2.1 e Rlep 2.2).

Os padrões de bandas geradas para o controle positivo (50 fg), a partir do amplicon gerado na reação “NESTED” RLEP PCR (238pb), foram 170 e 68 pb quando digeridos por *DdeI* e 164, 30 e 44 pb quando digeridos por *MspI*.

Assim, como os padrões de digestão do amplicon gerado a partir da amostra T16, bem como das outras 19 amostras foram idênticos ao seus respectivos controles positivos, confirmou-se a presença do DNA de *M. leprae* em todas as amostras de fígado dos 20 *E. sexcinctus* analisados.

## 5.5. Genotipagem de *M. leprae*

### 5.5.1. Genotipagem por VNTRs de isolados de *M. leprae* oriundos de tatus das espécies *E. sexcinctus* e *D. novemcinctus*

A sensibilidade da PCR multiplex foi determinada como sendo  $4 \times 10^3$  células/reação. As amostras contendo números menores de células não produziram o amplicon para nenhum dos cinco alvos da reação multiplex.

Todas as amostras testadas foram positivas, ou seja, amplificaram, pelo menos um dos 16 marcadores VNTR. No entanto, em alguns amostras, o uso dos PCRs multiplex não resultou na amplificação de todos os marcadores esperados dentro de um ensaio multiplex. Isso foi resolvido em alguns amostras por meio da realização de reações de PCR de simplex para o(s) marcador(es) ausente(s).

Os padrões de VNTRs foram obtidos para amostras dos 24 tatus, sendo: 20 *E. sexcinctus* oriundos de cinco municípios do RN e quatro *D. novemcinctus*, oriundos de Alta Floresta, Mato Grosso (n=3) e São Paulo (n=1). Dentre os 24 amostras analisadas, apenas

para oito (A1- A7 e A24) foi possível determinar o número de cópias para no mínimo 10, dentre os 16 VNTRs analisados. Somente para uma amostra (A4) foi possível determinar os 16 marcadores (tabela 9).

Embora, não tenha sido possível determinar o número de cópias de todos os alelos para a maioria dos isolados dos animais, observou-se um padrão conservado destes alelos dentre as oito estirpes selecionadas para a análise comparativa.

No entanto, vale ressaltar que a estirpe oriunda do tatu de SP, apresentou oito cópias para o *locus* AC9, presente somente no tatu (A12), oriundo do município de Pendências, RN. As demais estirpes de tatu do RN que tiveram cobertura para este marcador, apresentaram 9 cópias. Além disso, dois dos quatro marcadores hipervariáveis com  $h=1$  (AT15 e TA18), também foram variáveis dentre os isolados de animais (tabela 9).

Não foi possível genotipar os isolados oriundos dos animais com base nos SNPs.

**Tabela 9** - Genotipagem de isolados de *M. leprae* de tatus com base na análise molecular utilizando 16 VNTRs.

ID1	ID2	AC8b	GTA9	GGT5	AT17 <sup>b</sup>	6-3	21-3	AC9	AT15 <sup>b</sup>	AC8a	27-5	6-7	TA18 <sup>b</sup>	GAA21 <sup>b</sup>	23-3	12-5	18-8	Estados (Brasil)	Número de marcadores
T1	A1 <sup>a</sup>	7	10	4	14	3	2	9		9	5	6		11	2	4	3	RN	14
T2	A2 <sup>a</sup>	7	10	4	14	3	2	9						11	2		3	RN	10
T3	A3 <sup>a</sup>	7	10	4		3		9			5	6	25	11	2	4		RN	11
T4	A4 <sup>a</sup>	7	10	4	14	3	2	9	17	9	5	6	25	11	2	4	3	RN	16
T5	A5 <sup>a</sup>	7	10	4		3	2	9		9	5	6	25	11		4	3	RN	13
T6	A6 <sup>a</sup>	7	10	4	14	3	2	9	17	9	5	6		11	2	4	3	RN	15
T7	A7 <sup>a</sup>	7	10	4		3	2	9				6	25		2		3	RN	10
T8	A8						2											RN	1
T9	A9			4											2	4	3	RN	4
T10	A10						2	9	19	9	5			11				RN	6
T11	A11										5		16			4	3	RN	4
T12	A12							8			5					4	3	RN	4
T13	A13			4			2	9			5				2			RN	5
T14	A14						2										3	RN	2
T15	A15						2	9			5	6			2			RN	5
T16	A16					3												RN	1
T17	A17													11				RN	1
T18	A18										5			11				RN	2
T19	A19															4		RN	1
T20	A20			4										11				RN	2
T21 <sup>c</sup>	A21													11	2			MT	2
T22 <sup>c</sup>	A22																	MT	0
T23 <sup>c</sup>	A23						2	9	17						2	4		MT	5
T24 <sup>c</sup>	A24 <sup>a</sup>			4			2	8			5	6	25	11	2	4	3	SP	10

<sup>a</sup> Isolados selecionados para análise comparativa (amarelo)

<sup>b</sup> marcadores altamente variáveis ( $h=1$ )

<sup>c</sup> Animais da espécie *Dasypus novemcinctus*. Obs.: Os demais animais são todos da espécie *Euphractus sexcinctus*.

Em azul, variação encontrada nos marcadores

Em cinza- variação encontrada nos marcadores hipervariáveis

ID1 – identificação das amostras na análise por RLEP PCR e ID2 identificação das amostras na análises para caracterização por genotipagem

### **5.5.2 Comparação entre genótipos de isolados de *M. leprae* presentes em tatus *E. sexcinctus* do Brasil e *D. novemcinctus* dos EUA**

Os genótipos das 33 estirpes de *M. leprae* de tatus *D. novemcinctus* dos EUA (Truman et al., 2011), únicos publicados até o momento relacionadas ao tatu, foram comparados aos genótipos das estirpes circulantes em tatus *D. novemcinctus* (sendo um tatu, A24, oriundo do estado de SP e três, A21, A22 e A23, oriundos do MT) e tatus *E. sexcinctus* (n= 20) avaliados neste estudo.

Enquanto o presente estudo utilizou 16 VNTRs para análise de amostras de tatus do Brasil, Truman et al. (2011) utilizou 10 VNTRs para amostras de tatus dos EUA. Ao comparar tais análises, observou-se que os isolados de tatus do Brasil e dos EUA compartilharam quatro dentre os nove analisados. Dentre os marcadores com o mesmo número de cópias em ambas as populações avaliadas, GTA9 foi altamente discriminatório ( $h = 0.931$ ), e os demais (GGT5, 21-3 e 23-3) foram considerados poucos discriminatórios (ou seja, conservados).

Dentre os nove loci, foi observada a variação de 1 a 3 cópias em cinco loci (AC8a, AC8b, AC9, 6-7 e 12-5) quando comparada ambas populações de animais, sendo tais marcadores considerados moderadamente discriminatórios, exceto o AC8a, que é considerado altamente discriminatório (tabela 10).

**Tabela 10** - Análise comparativa entre os perfis genotípicos de *M. leprae* com base em VNTRs reportados para tatus *Euphractus sexcinctus* e *Dasyus novemcinctus* do Brasil e dos EUA, respectivamente.

Informações	Ac8b	GTA9	GGT5	<u>AT17</u>	6-3	21-3	AC9	<u>AT15</u>	AC8a	27-5	6-7	<u>TA18</u>	<u>GAA21</u>	23-3	12-5	18-8
<b>Tatus do Brasil (Variação alélica)</b>							8 <sub>2</sub>	19 <sub>1</sub>				16 <sub>1</sub>				
<b>Alelos mais comuns no Brasil (tatus)</b>	7	10	4	14	3	2	9	17	9	5	6	25	11	2	4	*
<b>Alelos mais comuns nos EUA (tatus)</b>	10	10	4	*	*	2	8	*	10	*	7	*	*	2	5	*
<b>Tatus dos EUA (Variação alélica)</b>														1 <sub>2</sub>	6 <sub>3</sub>	

\*: resultados ausentes;

N<sub>n</sub>- N é número de cópias de cada loci e n (subscrito), o número de vezes que este alelo foi observado na análise.

Sublinhado: Marcador altamente variável ( $h = 1$ )

## 5.6. Genotipagem (VNTRs e SNPs) de *M. leprae* oriundos de pacientes de Mossoró, Rio Grande do Norte

Dada a inexistência de dados reportados para isolados de pacientes do município de Mossoró, RN, o qual é hiperendêmico pra hanseníase e encontra-se próximas aos cinco municípios do RN, nos quais se capturou os tatus brasileiros, foi avaliada a diversidade genética de isolados de pacientes desta região.

Dentre as 54 amostras obtidas de pacientes do município de Mossoró, RN, apenas 59,26% (32/54) apresentaram cobertura para pelo menos 10 VNTRs, sendo portanto, elencadas para análises comparativas (anexo D).

Dentre os 32 pacientes que apresentaram cobertura para pelo menos 10 VNTRs, 43,75% (14/32) pertenciam ao sexo masculino e 31,25% (10/32) ao sexo feminino. A determinação da média de idade baseou-se apenas em 13 pacientes, sendo estes pertencentes a uma faixa de idade que vai dos 17 a 76 anos.

A genotipagem por SNPs foi definida para 61,1% (33/54) das amostras de pacientes, visto que para 18,5% (10/54) não foi possível determinar nenhum marcador VNTRs e por isto, não foram incluídas nas análises por SNPs. Assim, observou que o genótipo mais frequente foi o SNP 4, ocorrendo em 66,6% (22/33) das amostras analisadas, seguido do SNP 3, ocorrendo em 30,3% (10/33) das amostras analisadas. Vale ressaltar que apenas uma (1/33) das amostras analisadas foi SNP 1 ou 2.

Dada a inexistência de dados reportados para isolados de pacientes desta região, buscou-se realizar a análise comparativa das estirpes de *M. leprae* dos pacientes de Mossoró, como aqueles reportados na literatura referente às estirpes de pacientes de outros estados do Nordeste e Norte, utilizando 16 VNTRs (exceto marcador TA10) e 11 VNTRs, como proposto por Fontes et al. (2017).

A diversidade alélica determinada para os genótipos das estirpes de *M. leprae* oriundos de pacientes de Mossoró (RN) e para as amostras dos Norte e Nordeste, com base na avaliação de 16 VNTRs, demonstrou que quatro loci (AT17, AT15, AT18 e GAA21) foram mais polimórficos ( $h = 1$ ), enquanto outros quatro loci, 6-3, 21-3, 23-3 e (GGT) 5, foram os menos polimórficos (tabela 11).

**Tabela 11** - Diversidade alélica baseada em 16-VNTRs para estirpes de *Mycobacterium leprae* de pacientes de Mossoró, Rio Grande do Norte (1A) e para estirpes de *M. leprae* de pacientes dos estados Rondônia e Pará, região norte e dos estados Ceará e Pernambuco, região Nordeste do Brasil (1B).

A) Isolados de pacientes de Mossoró, Rio Grande do Norte				B) Isolados de pacientes das regiões Norte e Nordeste, Brasil			
Locus	T* amostras	<i>h</i> **	Conclusão	Locus	T amostras	<i>h</i> **	Conclusão
(AT)17	31	1,000	AD	(AT)17	364	1,000	AD
(AT)15	22	1,000	AD	(AT)15	337	1,000	AD
(AT)18	25	1,000	AD	(AT)18	356	1,000	AD
(GAA)21	32	1,000	AD	(GAA)21	365	1,000	AD
(GTA)9	28	0,835	AD	(GTA)9	355	0,895	AD
(AC)8a	32	0,641	AD	18-8	60	0,640	AD
(AC)8b	25	0,412	MD	(AC)9	364	0,552	MD
(AC)9	32	0,321	MD	(AC)8a	633	0,506	MD
27-5	22	0,320	MD	(AC)8b	339	0,474	MD
18-8	23	0,255	PD	6-7	349	0,318	MD
12-5	25	0,238	PD	12-5	351	0,310	MD
6-7	24	0,040	PD	27-5	338	0,285	PD
23-3	30	0,032	PD	23-3	363	0,121	PD
21-3	32	-0,032	PD	(GGT)5	363	0,025	PD
6-3	32	-0,032	PD	21-3	360	0,014	PD
(GGT)5	30	-0,034	PD	6-3	208	-0,005	PD

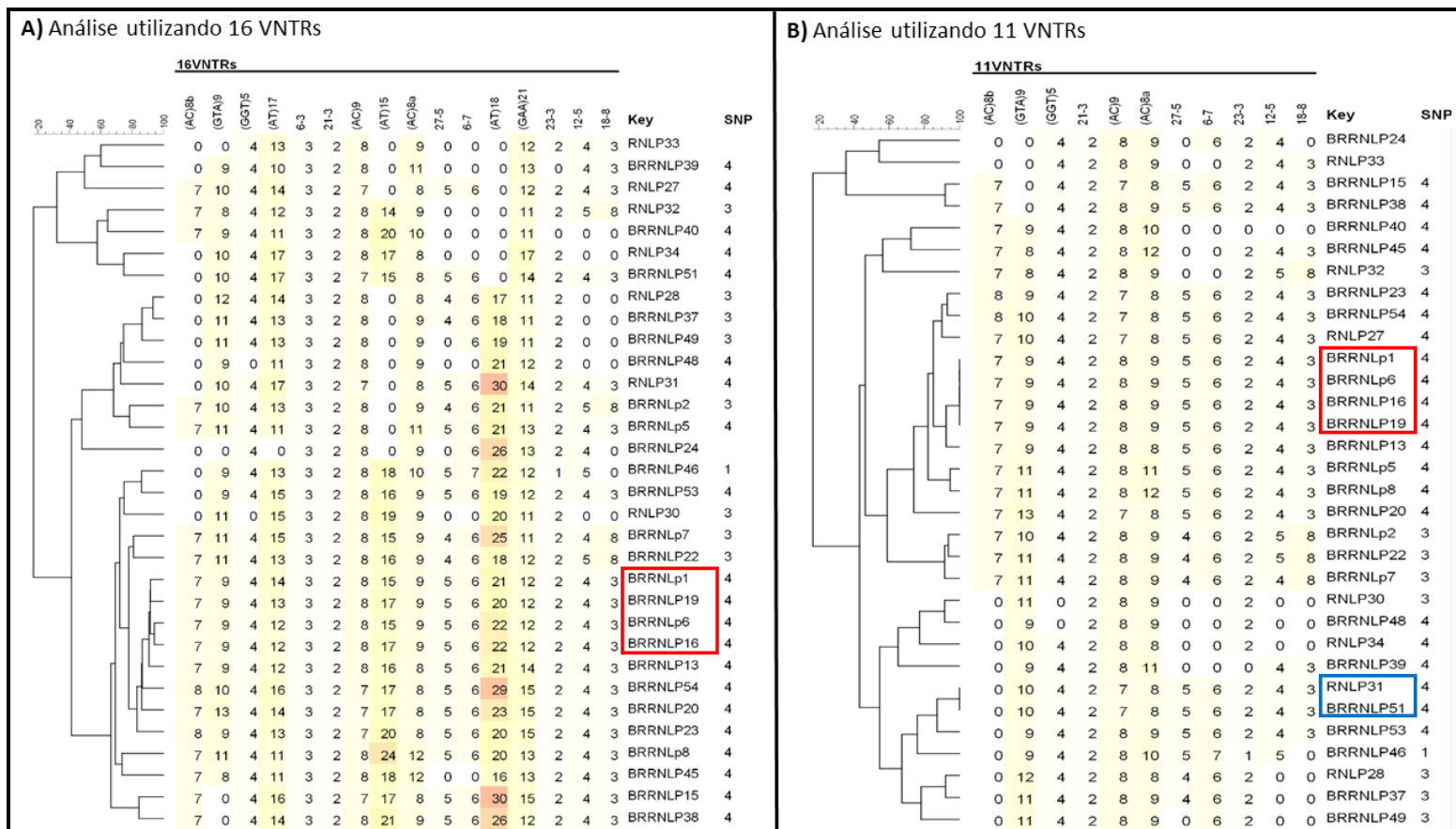
\* Total de amostras; \*\**h*: diversidade alélica baseada no índice discriminatório Hunter & Gaston (HGDI); AD: altamente discriminatório; MD: moderadamente discriminatório; PD: pouco discriminatório.



Ao realizar as análises comparativas entre as estirpes de *M. leprae* oriundas de pacientes de Mossoró, RN, com base em 16VNTRs e 3 SNPs, cada amostra representou um perfil distinto que pode ser atribuído aos marcadores VNTRs polimórficos (figura 27A) ou à ausência de determinação do número de cópias para alguns marcadores.

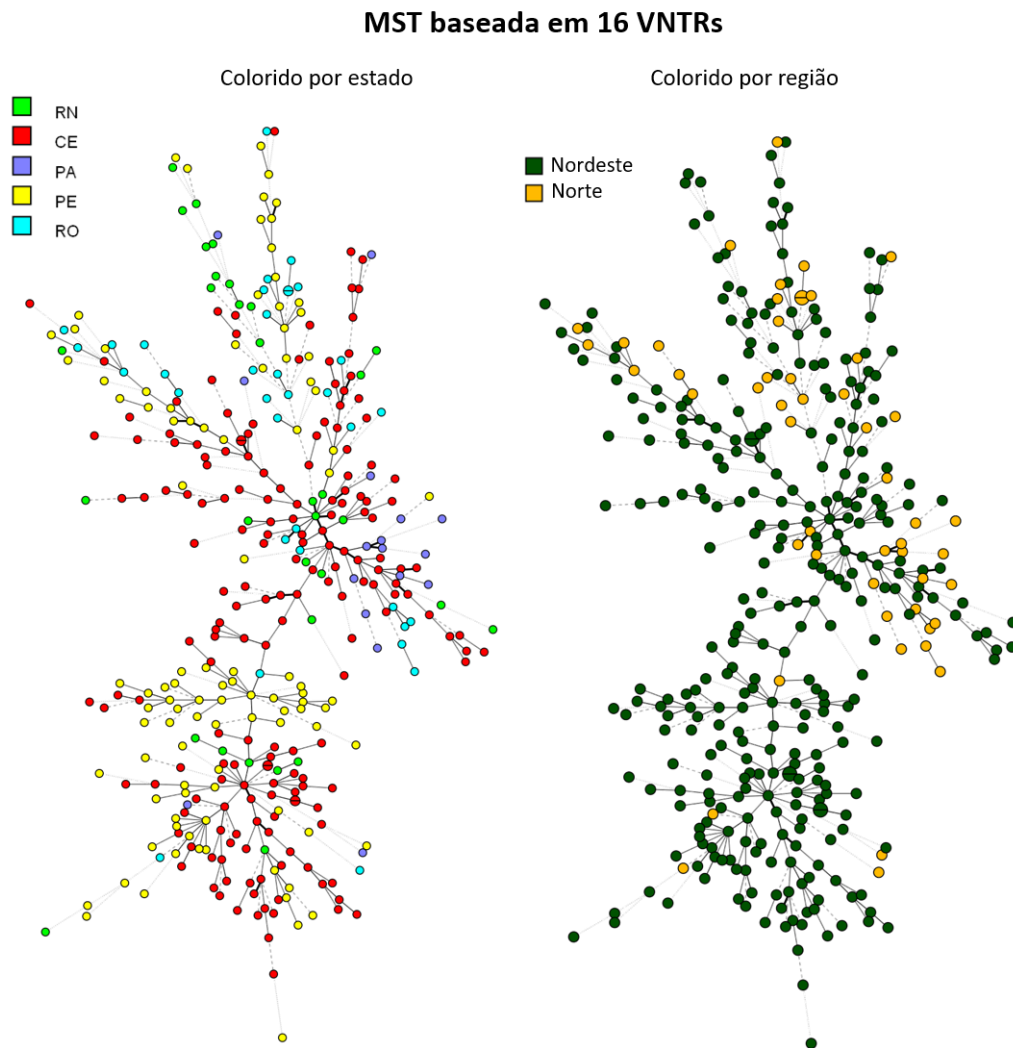
Interessantemente, um grupo de quatro amostras esteve correlacionadas nas duas análises (com base em 16 e 11 VNTRs, respectivamente), mas formaram “clusters” entre si somente na análise com base em 11 VNTRs.

Vale ressaltar que a amostra BRRNLP13 não foi agrupada, devido a uma variação de único-locus em (AC)8a. Além disso, observa-se que ausência de definição em (AC) 8b para as estirpes de *M. leprae* dos pacientes RNLP31 e RNLP51, resultou em um semi-cluster (figura 27B)



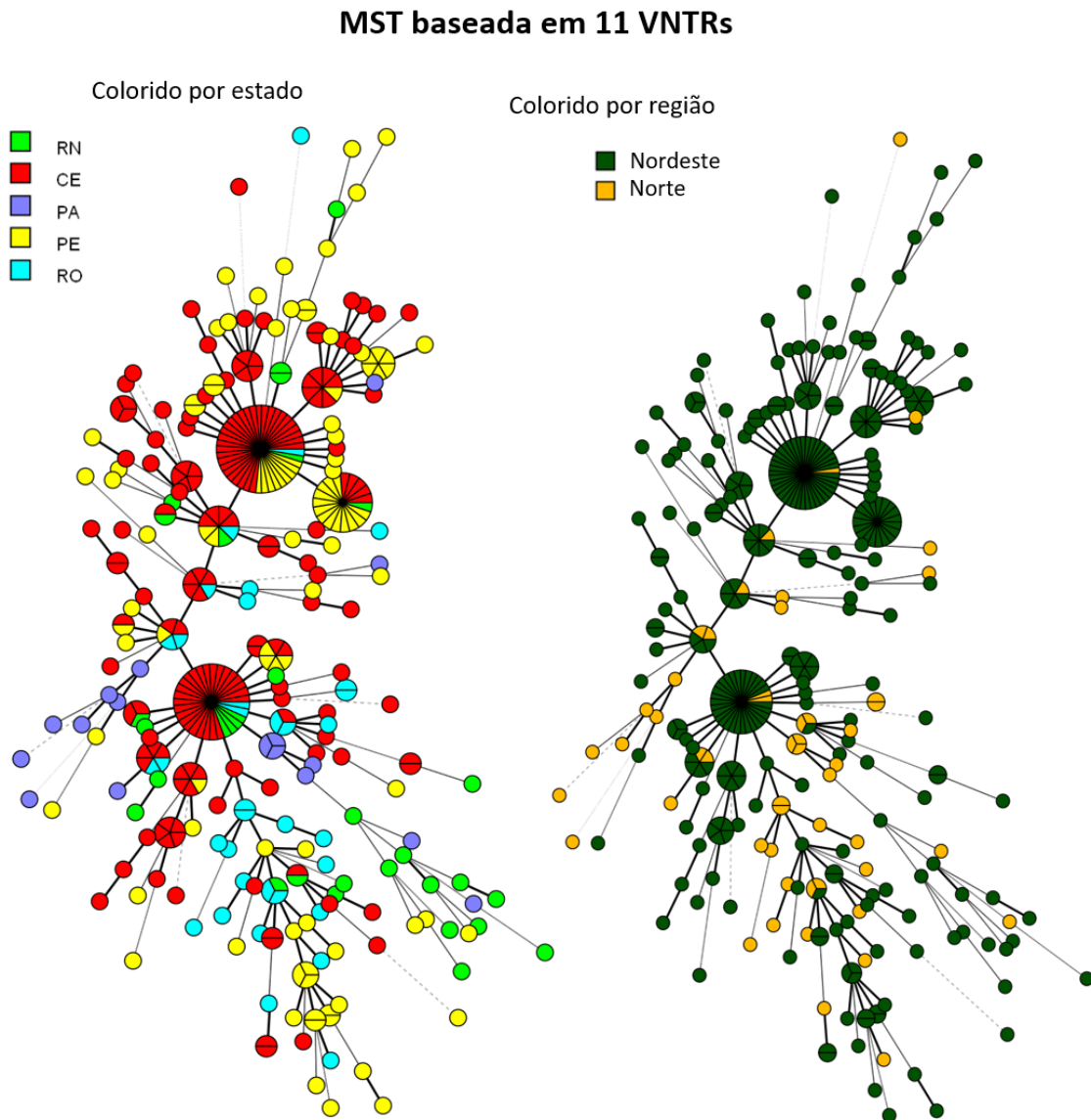
**Figura 27** - A diversidade genética de *M. leprae* representada por dendrograma baseado em VNTRs para 33 amostras de Mossoró, Rio Grande do Norte, Brasil. O dendrograma UPGMA baseado em uma matriz de similaridade foi criada usando o coeficiente de similaridade categórica no número de cópias alélicas dos VNTRs, sendo 16 VNTRs (A) ou 11 VNTRs (B). Destacadas em vermelho e em azul estão as amostras mais relacionadas.

Ao se incluir os genótipos das estirpes de *M. leprae* oriundas das amostras de pacientes de outros estados da região Norte e Nordeste do Brasil, a análise comparativa destas, com as estirpes obtidas dos pacientes de Mossoró, RN, evidenciou que o perfil de agrupamento para os 368 isolados de pacientes analisados mostra uma grande diversidade genética. Assim, com base nos 16 VNTRs, todos os perfis foram únicos, sem evidenciar a formação de clusters (figura 28).



**Figura 28** - Diversidade genética de *Mycobacterium leprae* representada por uma “Minimum Spanning Tree” (MST) baseada na análise de repetições em série variáveis (16 VNTRs) para 368 amostras clínicas de pacientes do Norte e Nordeste do Brasil. Cada círculo representa um genótipo.

Já com base nos 11VNTRs observou-se a formação de dois grandes *clusters*, nos quais as estirpes de *M. leprae* oriundas de pacientes do RN, nordeste do Brasil se agruparam com estirpes de *M. leprae* oriundas de pacientes de outros dois estados da região Nordeste, Ceará (CE) e Pernambuco (PE), bem como com estirpes de *M. leprae* de pacientes de Rondônia, região do Norte do Brasil (figura 29).



**Figura 29** - Diversidade genética de *M. leprae* representada por uma árvore de variação mínima (MST) baseada na análise de repetições em série variáveis (11 VNTRs) para 368 amostras clínicas humanas do Norte e Nordeste do Brasil. Cada círculo representa um genótipo, com o tamanho do círculo diretamente proporcional ao número de estirpes com genótipos correspondentes.

## **5.7. Análise comparativa entre os genótipos das estirpes de *M. leprae* oriundos de tatus e pacientes.**

### **5.7.1. Criação do banco de dados referentes à genótipos determinados para isolados de pacientes e animais**

O banco de dados utilizados nas análises comparativas consistiu em incluir, além dos genótipos determinados para amostras de animais [A1 – A7 (RN) e A24 (SP)] , bem como para os pacientes de Mossoró (RN), um banco de dados gerados com todos os genótipos reportados na literatura referentes a amostras de pacientes dos estados brasileiros CE, MT, PA, PE, RJ, RO e SP. Além disso, genótipos reportados referentes a pacientes da China, Colômbia, EUA, Filipinas, Índia, Tailândia e Venezuela também foram incluídos. Em relação aos genótipos referentes às amostras de tatu reportados na literatura, inclui-se, àqueles isolados de tatus *D. novemcinctus* dos EUA.

### **5.7.2. Diversidade alélica dos marcadores VNTRs na população brasileira**

O resultado da diversidade alélica ( $h$ ) para as 728 amostras brasileiras, incluindo amostras deste estudo, bem como de publicações anteriores, demonstrou uma variação entre -0,005 e 1, com a distribuição do número de cópias de 1 para 36. Entre os marcadores altamente discriminatórios, quatro [(AT) 15, (TA) 18, (AT) 17 e (GAA) 21] demonstraram um  $h = 1$ , e entre os pouco discriminatórios, o *locus* 6-3 foi  $h = -0,005$  (tabela 12).

**Tabela 12:** Diversidade alélica de 16 loci de VNTRs e conjunto de loci de VNTRs utilizados nas análises comparativas entre populações de tatus e pacientes

Loci	Total de amostras	<i>h</i>	Conclusão	16VNTRs	11VNTRs	10VNTRs	4VNTRs
				Presente estudo	Presente estudo	Truman et al. 2011	Lima et al. 2018
(AT)18	675	1,000	Altamente discriminatório	X			
(AT)15	608	1,000	Altamente discriminatório	X			
(AT)17	696	1,000	Altamente discriminatório	X			
(GAA)21	728	1,000	Altamente discriminatório	X			
(GTA)9	691	0,931	Altamente discriminatório	X	X	X	X
(TA)10	745	0,856	Altamente discriminatório				
(AC)8a	718	0,68	Altamente discriminatório	X	X	X	X
12-5	703	0,597	Moderadamente discriminatório	X	X	X	
(AC)9	720	0,557	Moderadamente discriminatório	X	X	X	X
27-5	699	0,522	Moderadamente discriminatório	X	X	X	
6-7	686	0,462	Moderadamente discriminatório	X	X	X	
18-8	176	0,429	Moderadamente discriminatório	X	X		
(AC)8b	687	0,363	Moderadamente discriminatório	X	X	X	X
23-3	729	0,07	Pouco discriminatório	X	X	X	
(GGT)5	717	0,064	Pouco discriminatório	X	X	X	
21-3	723	0,007	Pouco discriminatório	X	X	X	
6-3	218	- 0,005	Pouco discriminatório	X			

### 5.7.3. Análise genotípica comparativa com base em VNTRs

A variabilidade genética de isolados de *M. leprae* com base no polimorfismo dos diferentes 16 VNTRs foi determinado através de FLA (“Fragment length analysis”).

Assim, propôs-se que isolados oriundos de amostras clínicas de pacientes hansenianos de diferentes países e de tatus das espécies *E. sexcinctus* e *D. novemcinctus*, oriundos do Brasil e EUA, respectivamente, fossem submetidas à análise comparativa utilizando como base, seleção de marcadores reportados em estudos preliminares, ou seja, 4 VNTRs, proposto por Lima et al. 2018 e 10 VNTRs, proposto por Truman et al. 2011.

Além disso, duas análises com maior estringência (incluindo um maior número de marcadores), baseadas em 11 e 16 VNTRs foram propostas neste estudo.

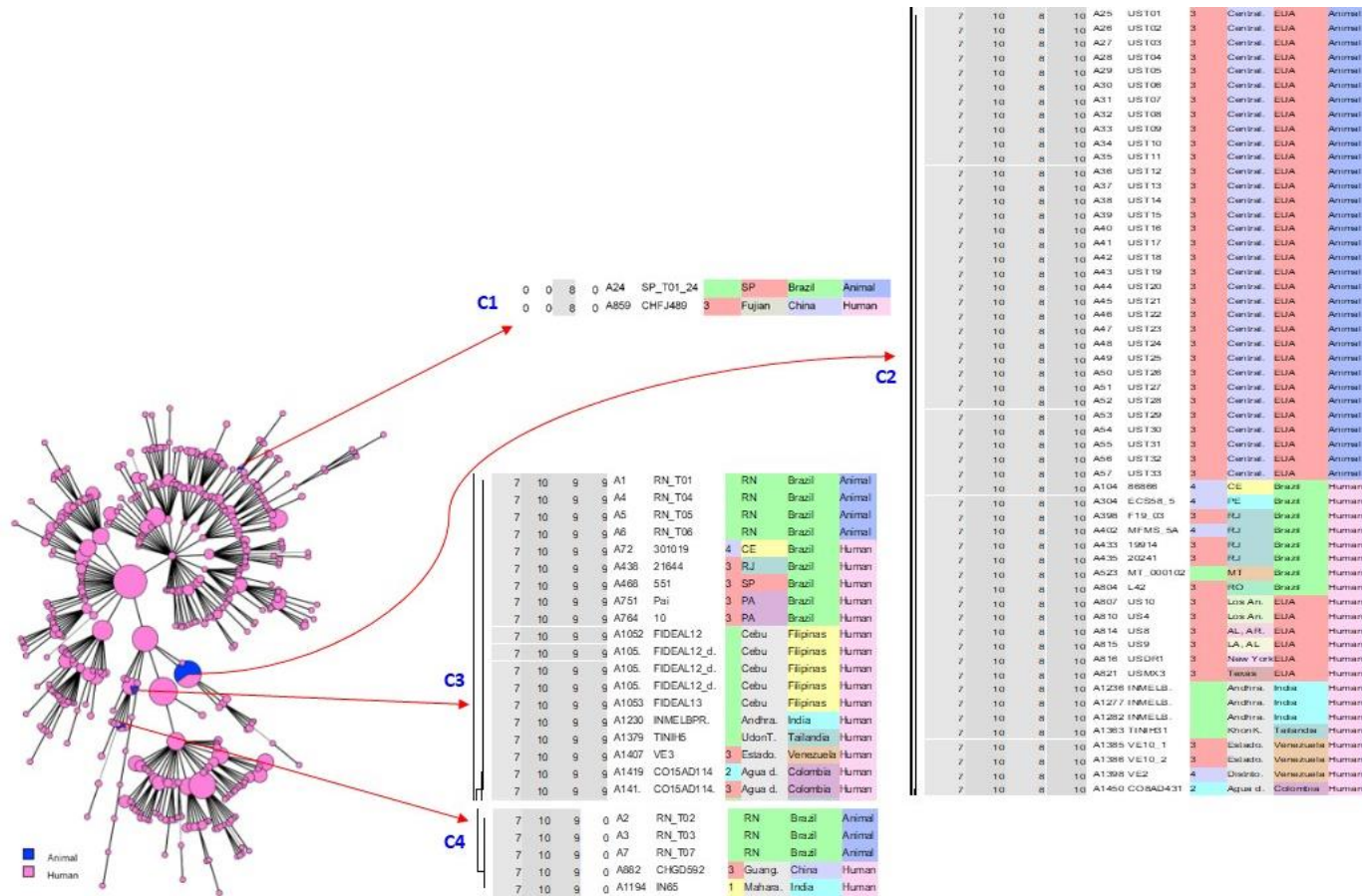
No total, foram analisadas amostras pertencentes ao banco de dados de genótipos construídos para este estudo, incluindo amostras de genótipos de *M. leprae* reportadas para tatus e pacientes do Brasil e diferentes países do mundo (China, Colômbia, EUA, Filipinas, Índia, Tailândia e Venezuela).

Assim, considerando as análises comparativas baseadas em 4VNTRs, reportada por Lima et al. 2018, e 10 VNTRs reportada por Truman et al. (2011), observou-se a formação de quatro “clusters” (C1-C4) compreendendo amostras de animais e humanos provavelmente não relacionadas epidemiologicamente, devido à distância geográfica.

A partir da análise com base em 4VNTRs, um cluster (C1) ocorreu devido à semelhança de apenas um marcador, dos 4, uma vez que os demais não tiveram resultados. Assim, este cluster não foi considerado válido.

As estirpes de *M. leprae* de tatus dos EUA agruparam com amostras de pacientes também dos EUA, bem como isolados de pacientes do Brasil, Índia, Tailândia, Venezuela e Colômbia.

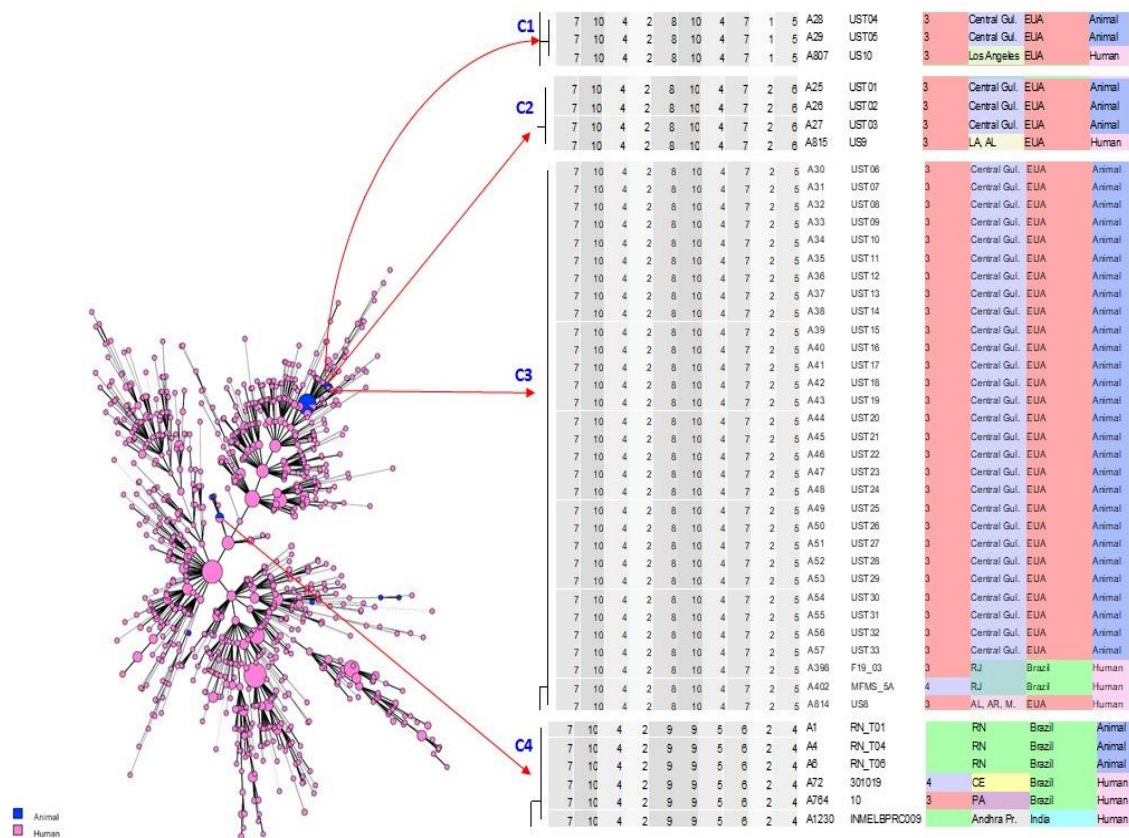
No entanto, não agruparam com as estirpes de *M. leprae* oriundas de tatus do Brasil. Além disso, as estirpes de *M. leprae* oriundos de animais do RN, Brasil agruparam com isolados de pacientes de diferentes países (C3 e C4), tais como Brasil (PA, CE, RJ e SP), Filipinas, Índia, Tailândia, Venezuela, Colômbia, China (figura 30).



**Figura 30 - Diversidade genética de *M. leprae* e análise comparativa entre pacientes e animais com base em 4 VNTRs, proposto por Lima et al. 2018.** A) Uma “Minimum Spanning Tree” (MST) destacando os “clusters” que compreendem amostras animais e humanas. Cada círculo representa um genótipo analisado e o tamanho do círculo corresponde ao número de isolados com o mesmo genótipo. Círculos de cor rosa referem-se a isolados de pacientes e círculos de cor azul referem-se a isolados de tatus. As setas vermelhas indicam a representação em dendrograma dos “clusters” (C1 – C4).

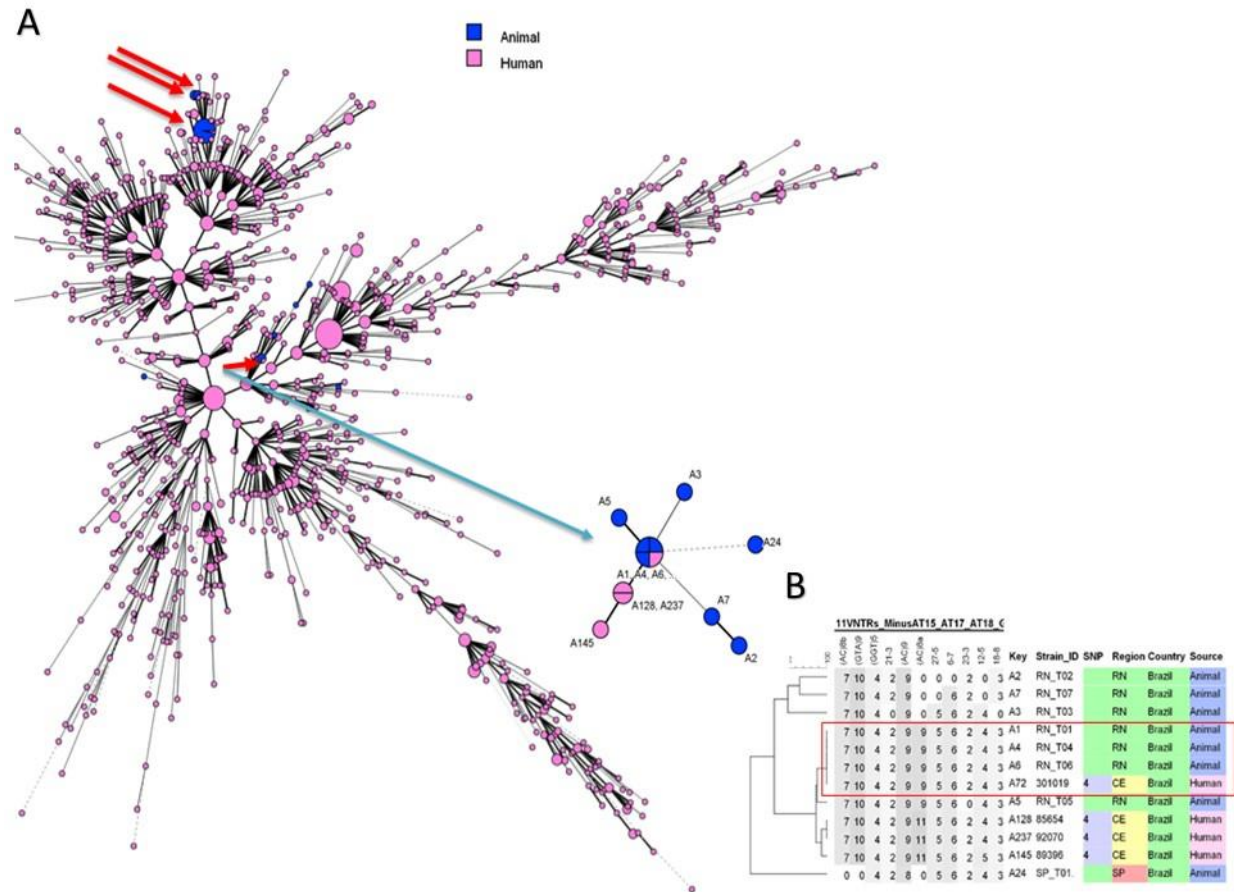


Considerando a análise com base em 10 VNTRs, observou-se que os isolados de *M. leprae* de tatus dos EUA agruparam pacientes dos EUA (C1 e C2), bem como com amostras de pacientes do Brasil (2 pacientes do RJ). Os isolados de *M. leprae* de tatus do RN agruparam com amostras humanas dos estados CE (n=1) e PA (n= 1), Brasil, bem como da Índia (n=1) (figura 31).



**Figura 31 - Diversidade genética de *M. leprae* e análise comparativa entre pacientes e animais com base em 10 VNTRs, proposto por Truman et al. (2018).** A) Uma “Minimum Spanning Tree” (MST) destacando os “clusters” que compreendem amostras animais e humanas. Cada círculo representa um genótipo analisado e o tamanho do círculo corresponde ao número de isolados com o mesmo genótipo. Círculos de cor rosa referem-se a isolados de pacientes e círculos de cor azul referem-se a isolados de tatus. As setas vermelhas indicam a representação em dendrograma dos “clusters” (C1 – C4).

A fim de aumentar a estringência da análise comparativa, removeu-se marcadores altamente discriminatórios ( $h=1$ ) e pouco discriminatório ( $h= -0,005$ ), realizando assim, agrupamentos baseado em 11VNTRs. Esta análise revelou a formação de perfis únicos e “clusters”. Vale ressaltar que uma amostra humana (A72), correspondente a um paciente oriundo do estado do Ceará, foi agrupada com amostras de 3 animais (A1, A4 e A6), oriundos do estado do Rio Grande do Norte (figura 32).



**Figura 32 - Diversidade genética de *M. leprae* e análise comparativa entre pacientes e animais com base em 11VNTRs.** **A)** Representa uma “Minimum Spanning Tree” (MST) destacando os clusters que compreendem amostras animais e humanas. As setas vermelhas indicam os clusters e a seta azul reporta o destacamento do “cluster” onde ocorreu agrupamento entre amostras de tatus e humanos oriundos do Brasil. Cada círculo representa um genótipo analisado e o tamanho do círculo corresponde ao número de isolados com o mesmo genótipo. Círculos de cor rosa refere-se a isolados de pacientes e círculos de cor azul refere-se a isolados de tatus. **B)** Representação do dendrograma referente as amostras de pacientes brasileiros mais relacionadas às amostras de tatus do Rio Grande do Norte, Brasil. O retângulo vermelho evidencia o cluster formado entre a amostra do paciente (A 72 e amostras dos tatus (A1, A4 e A6).

Considerando a análise comparativa utilizando todos os 16VNTRs, não se observou formação de “cluster” entre os isolados de *M. leprae* de animais e humanos, devido à limitação técnica da análise “Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis” (VNTR-MLVA), em possibilitar a determinação de números de cópias para todos os 16 VNTRs. Como as ausências de marcadores são identificados como “0” pelo “software Bionumerics”, tornou qualquer isolado diferentes dos demais consideradas na análise.

No entanto, analisando-se a planilha do banco de dados, e utilizando o isolado referente ao animal (A4), de Afonso Bezerra, RN, como padrão, visto que possui número de cópias determinados para todos os 16 loci, observou-se que o isolado de *M. leprae* encontrado no animal está relacionado ao isolado reportado à amostra humana A751, do estado do Pará, em 14 dos 16 VNTRs.

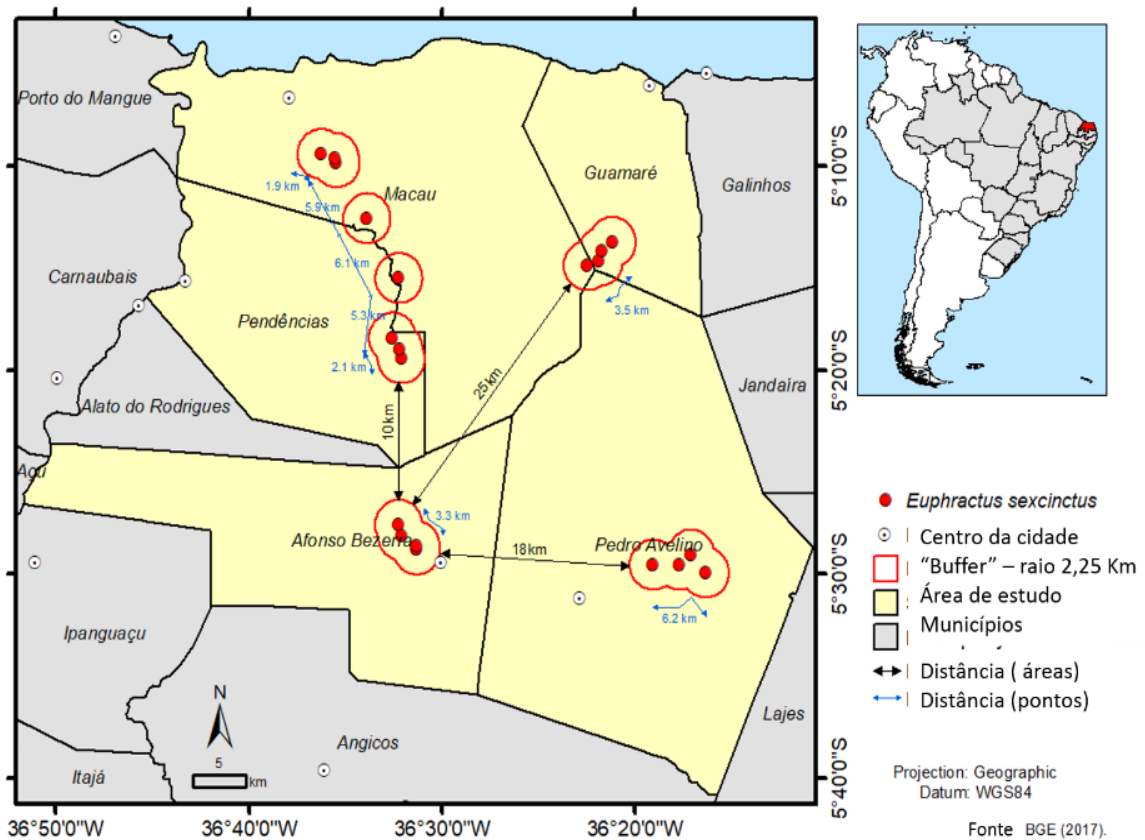
Vale ressaltar que dentre os 14 loci idênticos entre os isolados de tatu (A4) e paciente (A751), incluem-se quatro loci hiper-variáveis. Entretanto, estas amostras não foram agrupadas, devido à variação no locus 27-5 e por não ter sido determinado o número de cópias do marcador 18-8 na amostra de paciente A751 (figura 33).

16 VNTRs																Registro		Região	País	Fonte
(AC)8b	(GTA)9	(GGT)5	(AT)17	6-3	21-3	(AC)9	(AT)15	(AC)8a	27-5	6-7	(AT)18	(GAA)21	23-3	12-5	18-8					
7	10	4	14	3	2	9	17	9	5	6	25	11	2	4	3	A4	RN_T04	RN	Brazil	Animal
7	10	4	14	3	2	9	17	9	4	6	25	11	2	4	0	A751	Pai	PA	Brazil	Humano

**Figura 33 - Genotipagem baseadas em 16 VNTRs para amostra de tatu (A4, RN, Brasil) e paciente (A751, PA, Brasil).** O número de cópias de 16 VNTRs foram determinados. 0 significa ausência de resultado, visto que o número de cópias do marcador não pôde ser determinado.

## 5.8. Análise espacial da área de captura dos tatus *E. sexcinctus* do Rio Grande do Norte.

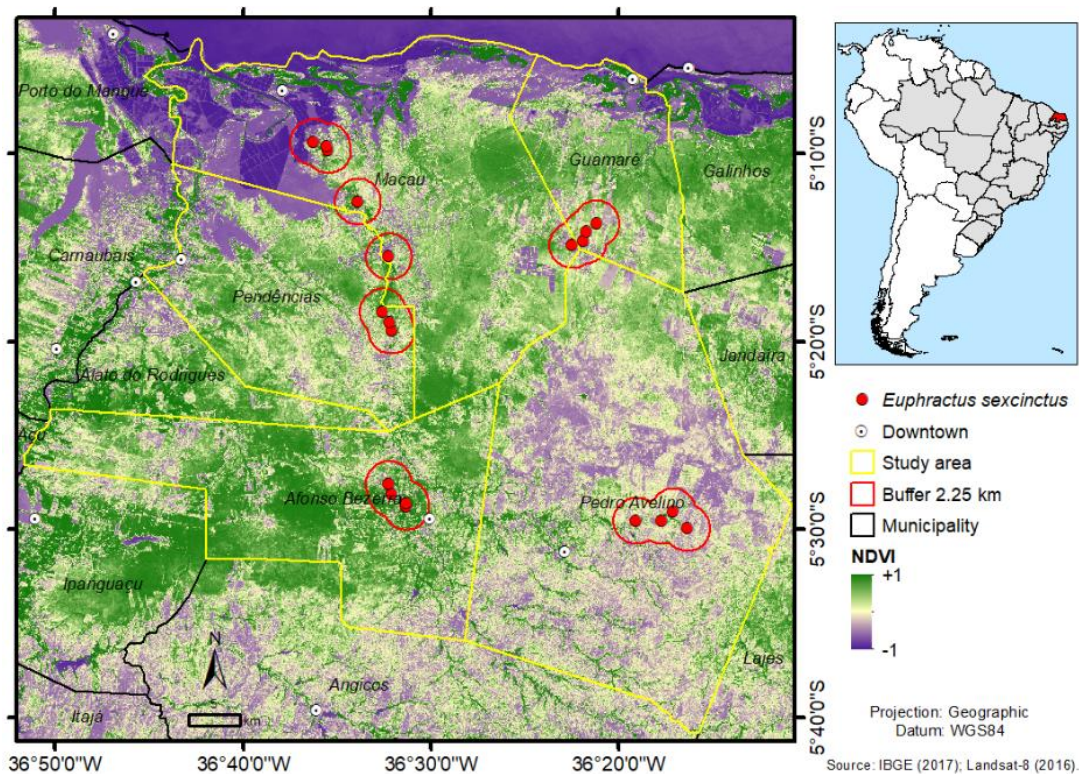
Analisando a distância entre os pontos de obtenção dos animais oriundo do RN avaliados no estudo, observa-se a formação de aglomerados entre os animais positivos para um raio de 2,25 Km, que corresponde a dispersão diária de tatus desta espécie, nas regiões de Afonso Bezerra, Guamaré e Pedro Avelino. Já em Pendências e Macau, os animais estão mais dispersos, havendo formação de diferentes pontos de aglomeração (figura 34).



**Figura 34 - Mapa da área de estudo.** Em vermelho (ponto) estão os locais de coleta dos animais e ao redor, o raio de dispersão de 2,25 km. As distâncias entre os pontos de coleta são evidenciadas pelas setas azuis e as distâncias entre as áreas, evidenciados pelas setas pretas

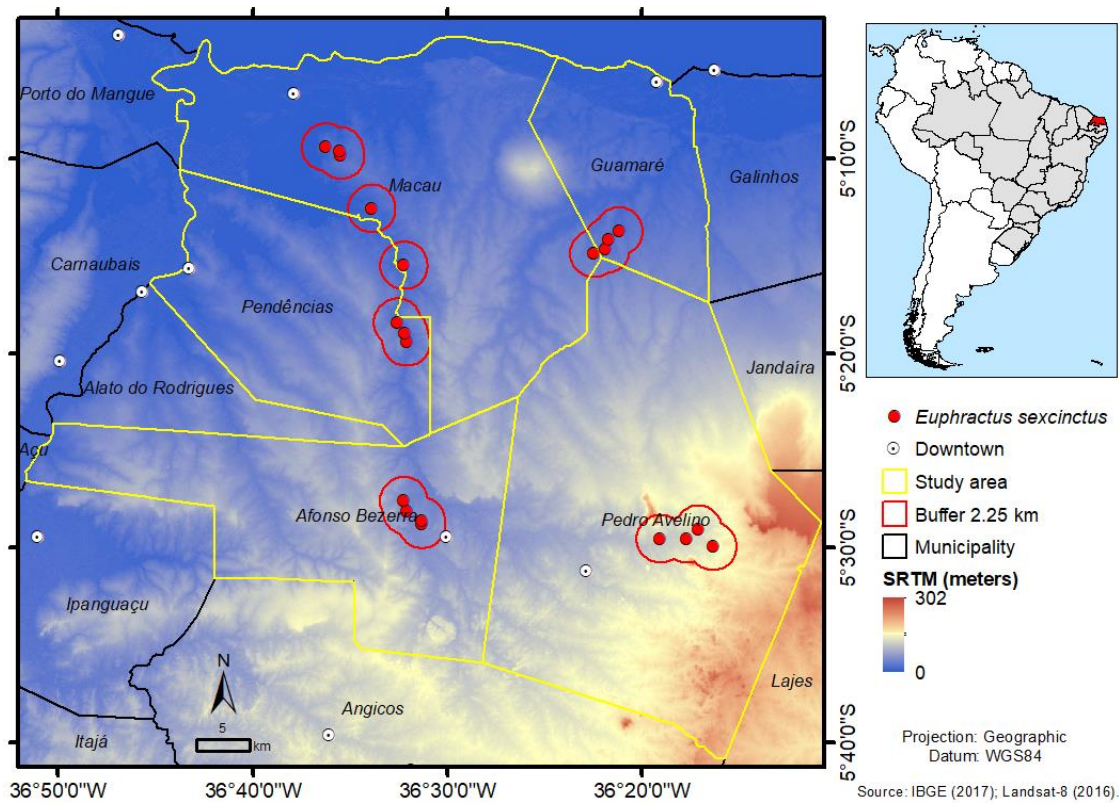
Baseando-se nas características ambientais e topográficas da área de estudo, correlacionadas às coordenadas geográficas dos pontos de obtenção dos animais, avaliou-se o potencial de dispersão dos tatus *E. sexcinctus* entre os cinco municípios avaliados, bem como para municípios limítrofes à área de estudo. Assim, observa-se em algumas áreas, sobretudo em Afonso Bezerra, maiores áreas com vegetação (figura 35).





**Figura 35 - Mapa da área de estudo e avaliação da cobertura vegetal da área.** Em vermelho (ponto) estão os locais de coleta dos animais e ao redor, o raio de dispersão de 2,25 km. Os valores iguais ou menores a 0 (zero) indicam a ausência de vegetação ou solo exposto (cor clara e roxo, respectivamente). Os valores próximos a 1 indicam grande quantidade de vegetação fotossinteticamente ativa (verde). NDVI –“Normalized Difference Vegetation Index”, ou IVDN em português para Índice de Vegetação por Diferença Normalizada.

Vale ressaltar, que em Pedro Avelino, embora tenha baixos índices de vegetação, existem áreas mais altas (elevações) e isto pode dificultar a dispersão desses animais para os municípios limítrofes (não avaliados no estudo) (figura 36).



**Figura 36 - Mapa da área de estudo e avaliação da topografia da área.** Em vermelho (ponto) estão os locais de coleta dos animais e ao redor, o raio de dispersão de 2,25 km. SRTM (Shuttle Radar Topography Mission) consiste da imagem de radar originária da missão de mapeamento do relevo terrestre.

## 6. DISCUSSÃO

Hanseníase é uma das doenças mais antigas e intrigantes que acometem o homem. Apesar de todos os esforços da comunidade científica e organizações ligadas à saúde, ainda é um agravo relevante de saúde pública, sobretudo no Brasil. A transmissão em muitas regiões se apresenta ativa e os fatores associados à sua ocorrência ainda não estão completamente elucidados (WHO, 2016, 2018).

Apesar dos estudos epidemiológicos acerca deste agravo ainda serem focados na participação exclusiva dos humanos no contexto da transmissão, evidências da presença de *M. leprae* em diferentes fontes ambientais, e mais recentemente, infecção por *M. lepromatosis* em animais, apontam a necessidade de se compreender melhor o papel de fontes não-humanas na epidemiologia da hanseníase (BRATSCHI et al., 2015; TIÓ-COMA et al., 2019).

Neste contexto, uma abordagem “One Health”, englobando aspectos da saúde humana, animal e ambiental, poderia ser altamente aplicável para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes para o manejo e controle da hanseníase (THIRUNAVUKKARASU et al., 2017).

A descoberta de populações naturalmente infectadas de tatus de *Dasytus novemcinctus* nos EUA, na década de 1970, foi inicialmente considerada vantajosa para a pesquisa sobre a hanseníase, na medida em que forneceu aos pesquisadores um sistema modelo para a cultivo do organismo (SHARMA et al., 2013).

Além disso, é válido reportar que acredita-se que a infecção de tatus por *M. leprae* tenha sido um evento relativamente recente (nos últimos 500 anos), ocorrido devido a colonização das Américas por europeus e pela introdução forçada de africanos escravizados. Assim, cada povo teria levado consigo seus patógenos associados e os transferidos aos animais. (BALAMAYOORAN et al., 2015).

A recente confirmação da hanseníase zoonótica envolvendo *D. novemcinctus* no sul dos EUA (TRUMAN et al., 2011), fornece um exemplo de como atividades antropogênicas invasivas, quase inevitavelmente, resultam em consequências imprevistas para futuras gerações de seres humanos e animais. Além disso, resultou em uma mudança de paradigma na maneira como a hanseníase é reportada, reforçando a necessidade de se atentar para as possíveis fontes não-humanas de infecção.

Evidências ao longo da história da susceptibilidade de tatu *D. novemcinctus* à infecção por *M. leprae*, a descoberta destes mamíferos naturalmente infectados, conferiu a este mamífero, destaque nas investigações relacionadas a fontes não-humanas de *M. leprae* (SHARMA et al., 2013; TRUMAN et al., 2011). Além disso, dentre os hospedeiros susceptíveis à infecção, tatus são únicos que reproduzem a patogenia relatada em humanos (SHARMA et al., 2013).

A aceitação destas evidências pela comunidade científica foi pautada na aplicação rigorosa de métodos sorológicos, moleculares e histopatológicos, os quais inicialmente propuseram um provável papel reservatório dos tatus para *M. leprae* (CARDONA-CASTRO et al., 2009; DEPS et al., 2008; TRUMAN et al., 1986, 2011; WALSH; MEYERS; BINFORD, 1986) e posteriormente, combinando ferramentas de biologia molecular e epidemiologia, confirmaram a caráter zoonótico deste agravo (SHARMA et al., 2015; TRUMAN et al., 2011).

Assim, a aplicação cuidadosa de métodos epidemiológicos moleculares tradicionais e modernos, ajudaram a remover quaisquer dúvidas sobre a avaliação da hipótese de ocorrência da hanseníase zoonótica nos EUA (DOMOZYCH et al., 2016). Neste contexto, novos dados continuam a ser produzidos nos EUA, proporcionando contribuições significativas para nossa compreensão destes aspectos epidemiológicos da hanseníase associados aos tatus (DOMOZYCH et al., 2016; SHARMA et al., 2015, 2018).



Portanto, a execução da pesquisa, bem como os métodos utilizados para interpretar a poder informativo dos dados realizados nos EUA, tem servido como modelo para pesquisas futuras sobre este tema em outras regiões das Américas, incluindo o Brasil.

Pesquisadores latino-americanos também produziram um corpo substancial de dados em relação ao possível caráter zoonótico da hanseníase envolvendo tatus ao longo dos últimos 15 anos (CARDONA-CASTRO et al., 2009; DA SILVA et al., 2018; DEPS et al., 2008; FROTA et al., 2012; KERR et al., 2015). No entanto, é evidente, que, em comparação aos estudos norte-americanos, os resultados reportados na América Latina são predominantemente sugestivos de uma possível ocorrência de hanseníase zoonótica associada ao tatu, e não confirmatórios. As razões para isto são numerosas e incluem aspectos metodológicos, logísticos, infraestruturais, financeiros e legislativos.

Além disso, é notório que desvendar a dinâmica de uma possível hanseníase zoonótica em algumas regiões do Brasil, incluindo o Rio Grande do Norte (RN), pode ser mais complexo do que no sul dos EUA.

As razões mais evidentes desta complexidade, podem ser atribuídas ao caráter heterogêneo da endemicidade da hanseníase no Brasil, onde um mesmo estado, pode apresentar áreas hiperendêmicas, como é o caso do município de Mossoró, bem como áreas limítrofes ao município, não-endêmicas (DATASUS, 2017). Além disso, ao contrários dos EUA, reporta-se no Brasil, uma diversidade maior de espécies de tatu (PEDRINI et al., 2010).

No Brasil, embora haja evidências crescentes para apoiar o envolvimento das espécies brasileiras no contexto epidemiológico da hanseníase, a extensão destes achados é desconhecida. Além disso, dados sobre a infecção natural em tatus *E. sexcinctus*, animal amplamente caçado em áreas rurais do semiárido brasileiro, ainda são controversos.

Em alguns estudos, a inclusão de métodos epidemiológicos tradicionais na tentativa de confirmar associação entre o contato com tatus brasileiros (caça, criação, manipulação de carcaças e consumo de carne) e a infecção por *M. leprae*, produziu dados contraditórios (BRATSCHI et al., 2015).

Como discutido anteriormente, a aplicabilidade de instrumentos tradicionais (como por exemplo: questionários e entrevistas estruturadas) para gerar dados epidemiológicos em relação à hanseníase tem sido questionado, sobretudo, devido ao caráter crônico da doença. Assim, esta característica da doença, limita significativamente a determinação de qual evento específico e/ou comportamento foi responsável pelo estabelecimento de uma infecção que se manifestou anos após a exposição ao patógeno.

A fragilidade dessa abordagem epidemiológica tradicional foi discutida nos estudos norte-americanos, um vez que os dados fornecidos através da aplicação das ferramentas epidemiológicas moleculares robustas, foram determinantes para a confirmação da existência de infecção humana através de cepas de *M. leprae* que circulam em populações de tatus.

Além disso, é válido ressaltar que, apesar da evidência dos dados de genotipagem, comprovando o compartilhamento entre as cepas da população animal e humana, muitos pacientes infectados que também albergavam a cepa, não relataram nenhum conhecimento prévio de contato com tatus (TRUMAN et al., 2011). Um ponto que permanece inexplicado até agora.

Neste contexto, um outro aspecto precisa ser considerado ao analisar os estudos publicados abordando esta temática. Em contraste, com o que foi reportado nos EUA, onde dados científicos sólidos, puderam confirmar a relevância em termos de saúde pública da infecção em tatus e seu papel como reservatório, no Brasil, o sensacionalismo entrou nas discussões sobre a hanseníase zoonótica no território brasileiro.

Este fato pode ser exemplificado pela resposta da mídia não científica, em inglês “popular press”, à publicação de um estudo realizado no norte do estado do Pará, Brasil, em 2018 (DA SILVA et al., 2018a). Neste estudo, o DNA de *M. leprae* foi detectado em 10 das

16 espécimes de *D. novemcinctus* analisadas, usando RLEP-PCR convencional. Além disso, constituintes da parede celular e DNA micobacteriano também foram identificados através de técnicas histológicas aplicadas ao baço dos animais.

Entretanto, este dado de infecção nos animais, foi apresentado juntamente com dados epidemiológicos, pautados na correlação entre a resposta sorológica de pacientes à infecção por *M. leprae*, e a informação de contato prévio com tatus. Assim, sugeriram que a presença de níveis elevados de soro-reatividade em humanos (com base no uso de um ELISA anti-PGL-1), que viviam na mesma região dos tatus infectados, estaria associado ao consumo frequente de carne deste mamífero.

Os autores concluíram, corretamente, que seus achados poderiam ser considerados evidências do potencial reservatório de *D. novemcinctus* para *M. leprae*. No entanto, em contraste com a situação nos EUA, nenhuma evidência clara foi apresentada para apoiar a existência de hanseníase zoonótica no Pará, ou em qualquer outra região do Brasil.

No entanto, devido ao uso inadequado do título do estudo: “Evidências de hanseníase zoonótica no Pará, Amazônia brasileira e riscos associados ao contato humano ou consumo de tatus”, a imprensa popular relatou que a ligação entre os tatus e a hanseníase humana estaria ocorrendo no Brasil, respaldado cientificamente.

Desde a divulgação dos dados, atrelados a um título inadequado, vários relatórios foram publicados “on-line”, incluindo a página brasileira da “National Geographic” (National Geographic, 2017). Esta divulgação disseminou uma representação imprecisa dos dados.

Além disso, outro agravante a ser mencionado, é a divulgação e extrapolação, do percentual de infecção nos animais reportados no estudo, o qual foi calculado com base em um “n” amostral estatisticamente insignificante, para estimar a prevalência de *M. leprae* em populações de *D. novemcinctus* no Brasil.

Portanto, o que está sendo reportado, não é compatível com os métodos utilizados ou com os achados apresentados até o momento pela comunidade científica que atuam nesta linha de pesquisa no Brasil. Assim, o caráter zoonótico da hanseníase no Brasil precisa ser investigado com ferramentas mais robustas.

É notório que os estudos envolvendo a espécie *Dasyopus novemcinctus* no Brasil e em outros países nas Américas, tem sido reportados mais frequentemente ao longo dos anos de investigação do papel destes mamíferos como reservatório.

Devido a impossibilidade de cultivar o patógeno *in vitro*, a evidência de infecção em tatus selvagens tem sido realizada através de análises sorológicas, moleculares, clínicas e histopatológicas (CARDONA-CASTRO et al., 2009; DA SILVA et al., 2018; DEPS et al., 2008b; FROTA et al., 2012).

No entanto, em regiões brasileiras, sobretudo no semiárido nordestino, a espécie *Euphractus sexcinctus* encontra-se sobreposta ao *Dasyopus novemcinctus*. Além disso, também são comumente caçadas e mantidas em cativeiro para engorda e consumo (ALVES et al., 2009; KERR et al., 2015).

Dada a diversidade de tatus coexistindo na natureza, acredita-se que a ausência de registros em outras espécies seja resultado de uma baixa investigação. Portanto, no presente estudo, procurou-se investigar infecção natural por *M. leprae* em *Euphractus sexcinctus* de diferentes municípios do RN, os quais embora estejam próximos a áreas de alta endemidade, como o município de Mossoró, são considerados não-endêmicos para hanseníase (DATASUS, 2017).

Para isto, além de empregar métodos sorológicos e moleculares, como usado anteriormente por outros pesquisadores sul-americanos (CARDONA-CASTRO et al., 2009; DEPS et al., 2008; DEPS; ANTUNES; TOMIMORI-YAMASHITA, 2007; FROTA et al., 2012), incluiu-se ferramentas de epidemiologia molecular (usando análises VNTR e SNP), a fim de caracterizar os isolados de *M. leprae* circulantes nos animais, e possibilitar a base para

uma comparação dos genótipos de *M. leprae* circulantes dentro do território brasileiro e demais regiões reportadas.

Neste contexto, um dos objetivos primários do estudo, foi produzir dados de genotipagem, analisando isolados de *M. leprae* circulantes em pacientes do município de Mossoró, RN, a fim de preencher uma lacuna no banco de dados atual, o qual reporta os genótipos de *M. leprae* circulantes em pacientes de diferentes regiões brasileiras.

Além disso, buscou-se investigar a infecção natural por *M. leprae* em 20 tatus da espécie *Euphractus sexcinctus*, oriundos de 5 diferentes municípios do Rio Grande do Norte, Brasil (figura 11). Vale ressaltar, que a decisão em se implementar a genotipagem no estudo e produzir dados de genotipagem comparativa, foi motivada pela necessidade de se reforçar esta vertente atual de pesquisa, a qual busca compreender o papel de fontes não-humanas de *M. leprae* na disseminação do agravo. Assim, com dados mais robustos se alavanca as discussões e retira a temática do seu caráter sugestivo.

Neste contexto, a inspeção clínica de 20 tatus *Euphractus sexcinctus* no presente estudo, forneceu algumas evidências de sinais clínicos como: esplenomegalia (20%), lesões ulcerativas palmares, plantares e no fuço (30%) e linfadenopatia (35%) (tabela 5, figuras 17 e 18). No entanto, embora possam estar associadas a outras inúmeras causas, estes sintomas têm sido correlacionados com a infecção por *M. leprae* em tatus da espécie *D. novemcinctus* por outros autores (BALAMAYOORAN et al., 2015; DEPS et al., 2008b; FROTA et al., 2012; SHARMA et al., 2013).

Embora Walsh et al. (1975) tenham reportado que 49 animais da Lousiana, EUA, evidenciavam lesões idênticas à hanseníase experimental, anos depois, os estudos apontaram que os achados clínicos em *D. novemcinctus* infectados naturalmente não são frequentes. Em 50 animais encontrados na Lousiana e Texas, somente 5/50 (10 %) apresentavam evidências clínicas de infecção. (WALSH et al., 1886).

Sharma et al. (2013) reportam que, embora inespecíficos, lesões ao redor dos olhos, nariz e patas são os sinais mais comuns em *D. novemcinctus* infectados por *M. leprae*. Além disso, em infecções experimentais, lesões plantares ulcerativas são comuns nos últimos estágios de infecção (SHARMA et al., 2013).

Além disso, um animal (T02) do presente estudo, apresentou hemodiluição. Em tatus *D. novemcinctus* se reporta a ocorrência de profunda anemia em animais infectados experimentalmente (TRUMAN;SANCHEZ, 1993; SHARMA et al., 2013). Outra alteração digna de nota e reportada somente um animal analisado (T17), foi a evidência macroscópica de esteatose hepática (tabela 5, figura 18).

Reportou-se recentemente a ocorrência de esteatose hepática em quatro tatus *E. sexcintus* que viviam ilegalmente em cativeiro, mas foram obtidos da natureza nos estados do Piauí (n=1) e Rio Grande do Norte (n=3) (BATISTA et al., 2019; SILVA et al., 2018).

Embora as causas para esteatose sejam inúmeras, nestes trabalhos associaram principalmente à dieta desequilibrada e condição de obesidade dos animais, visto que tatus criados em cativeiros, são mantidos em barris, com espaço restrito, sendo muitas vezes submetidos à alimentação inadequada e em grande quantidade. O intuito é a engorda, abate e posterior consumo da carne.

No entanto, os animais reportados neste estudo, inclusive o que apresentou esteatose hepática, haviam sido recentemente retirados natureza, não estando em condições de cativeiro e obesidade, já que o peso médio desses animais era de 1,645 Kg (SD 0,491), característico de animais filhotes desta espécie (MEDRI, 2008) (tabela 4).

Vale ressaltar que, dentre as causas reportadas para esta alteração hepática, incluem-se a infecção sistêmica por *Mycobacterium* spp. e *Leishmania* spp (SHIMIZU, 2008; SILVA et al., 2018). Além disso, este mesmo animal apresentou evidências de esplenomegalia e lesões

de pele. Vale ressaltar que lesões de pele podem ser atribuídas ao hábito escavatório destes animais, ou ocasionadas durante o manejo e caça (SILVA et al., 2018).

Não existem estudos de infecções experimentais por *M. leprae* em tatus da *E. sexcinctus* que reforcem a associação destes achados à patogenia da doença nesta espécie animal. No entanto, devido a utilização de *D. novemcinctus* para o cultivo de *M. leprae*, uma quantidade substancial de informações acerca da patogenia decorrente da infecção por *M. leprae* nesta espécie foram reportadas.

Além disso, os impactos negativos da infecção por *M. leprae* em populações de tatus *D. novemcinctus*, em relação ao desenvolvimento, reprodução e longevidade foram recentemente descritos no sul dos EUA (OLI et al., 2017). Assim, demonstraram claramente que mais atenção deve ser dada à compreensão da dinâmica de infecções por *M. leprae* em tatus de outras espécies e em outras regiões das Américas, as quais reportam infecções naturais nestes animais, incluindo Argentina, Brasil, Colômbia e México (DA SILVA et al., 2018a; DEPS; ANTUNES; TOMIMORI-YAMASHITA, 2007; FROTA et al., 2012).

Pesquisas prévias empregando o método RLEP-PCR e, em menor grau, técnicas sorológicas, para examinar populações de tatus (principalmente *D. novemcinctus*), para a presença do *M. leprae* em várias regiões do Brasil e na Colômbia, geraram achados contraditórios (CARDONA-CASTRO et al., 2009c; DA SILVA et al., 2018b; DEPS et al., 2008b; FROTA et al., 2012)

Neste estudo, os dados sorológicos, com base na utilização de ELISA anti-PGL-I, indicaram que 20/20 (100%) dos tatus estavam infectados com *M. leprae*. Já os níveis de detecção registrados com os testes rápidos de fluxo lateral (FL), foram 17/20 (85%) e 16/20 (80%), para o NDO-LID<sup>®</sup> e ML flow, respectivamente (tabela 8). Estes níveis de positividade, excederam aqueles relatados até o momento usando métodos sorológicos para analisar espécimes de *D. novemcinctus* capturados no Brasil (DEPS et al., 2008; DEPS; ANTUNES; TOMIMORI-YAMASHITA, 2007) ou nos EUA (SHARMA et al., 2015).

Analisando amostras de soro de 47 tatus *Dasyopus novemcinctus* de áreas endêmicas do Estado do Espírito Santo, Deps et al. (2008b) observaram que o percentual de positividade de anticorpos neste estudo foi de 10,6% (5/47), utilizando um ELISA anti-PGL-I, percentual menor do que o encontrado no estudo no Texas (16%) e outros que analisaram 216 tatus da Flórida e Louisiana (27/216 = 12,5%) (TRUMAN; JOB; HASTINGS, 1990)

No presente estudo, a confiança na validade dos achados sorológicos foi aumentada pelo alto grau de concordância entre os três métodos que incorporaram a detecção de IgM anti-PGL-1. Além disso, foi observado posteriormente, que 100% das amostras de fígado destes animais eram reprodutivamente positivas, pela presença de DNA de *M. leprae*.

O ELISA é considerado o método imunológico padrão ouro para detecção e caracterização da infecção por *M. leprae* em humanos e tatus (DEPS et al., 2008a; FRADE et al., 2017). No entanto, o uso de métodos alternativos, particularmente, testes de fluxo imunocromogênicos posteriores (FL), tem sido relatado por vários autores (DEPS; ANTUNES; TOMIMORI-YAMASHITA, 2007; DUTHIE et al., 2014; HUNGRIA et al., 2016; MARÇAL et al., 2018) e há um consenso geral de que esses testes são valiosos como um componente de programas integrados de vigilância, onde o acesso à infra-estrutura necessária para realizar o ELISA não está disponível. No presente estudo, avaliamos dois testes de FL comercialmente disponíveis, especificamente os sistemas ML-flow e NDO-LID<sup>®</sup>.

Em contraste com o sistema de fluxo ML, o teste NDO-LID<sup>®</sup> não foi utilizado anteriormente para avaliação sorológica de tatus. Na ausência de um precedente, considerou-se essencial realizar uma avaliação do teste NDO-LID<sup>®</sup> utilizando soro de tatus *D. novemcinctus*, previamente avaliados por ELISA anti-PGL-I e ELISA anti-LID1

Por um lado, a correlação verificada entre o anti-PGL-1 ELISA e a NDO-LID<sup>®</sup> teste mostrou ser altamente significativa, com apenas um único possível falso negativo e dois aparentes falso-positivos (tabela 6A). Por outro lado, a concordância com o ELISA anti-LID1 foi menos convincente, especificamente devido o número de possíveis falsos negativos (8/22), o qual foi considerado inaceitavelmente alto (tabela 6B).

No caso de ambos os ensaios, a revisão dos valores de D.O., demonstrou que as possíveis amostras falso-positivas foram considerados amostras negativas limítrofes (em relação aos valores de corte dos dois ELISAs (tabela 6).

Em termos práticos, falsos positivos nos testes FL resultariam em custos desnecessários associados ao transporte de material para laboratórios centralizados capacitados para à execução do ELISA. No entanto, a existência de falsos negativos seria mais problemática, uma vez que tais amostras não seriam identificadas para análise posterior. Assim, pelo menos em teoria, os animais infectados seriam deixados em circulação, o que poderia resultar num risco potencial para a transmissão zoonótica.

No entanto, é válido ressaltar que o teste NDO-LID detecta ambos antígenos, e o desempenho deste teste na análise de soros de tatus *D. novemcinctus* na detecção de resposta anti-PGL-I IgM foi altamente satisfatório, justificando sua inclusão na avaliação comparativa posterior realizada com *E. sexcinctus*.

As discordâncias observadas entre os testes de FL e o anti PGL-I-ELISA, quando aplicado aos soros *E. sexcinctus*, foram indicativas de resultados falsos negativos para ambos os testes de FL. Esta hipótese foi apoiada pela detecção de DNA marcador amplificável em todas as amostras negativas para FL. Na maioria dos casos, as amostras falso-negativas apresentaram menor reatividade no ELISA em relação às amostras que foram inequivocamente positivas nos testes de FL (tabela 8).

Pode ser o caso, que os animais negativos FL estavam nas fases iniciais de infecção com *M. leprae*, resultando em níveis de soroconversão abaixo do limite de detecção dos testes. No caso específico da amostra T03, a negatividade pode estar ligada ao fato de que esse animal morreu durante o período de aclimação e que o atraso no processamento, em relação aos demais, pode ter levado à degradação post-mortem de imunoglobulinas séricas, como relatado para raposas na Escandinávia (TRYLAND et al., 2006).

A observação de que duas amostras (T02 e T14) foram positivas no teste NOD-LID<sup>®</sup> e negativa para o teste de fluxo ML (tabela 8), foi intrigante, pois uma das amostras apresentou um valor OD elevado e ambas foram positivas para a presença de DNA de *leprae*. Os dados moleculares acoplados à natureza prontamente interpretável do teste OL, apoiaram a positividade registrada no ELISA e indicaram que ambas as amostras podem ter contido uma fonte de material inibitório que interferiu com a funcionalidade do teste de fluxo ML.

Vale ressaltar, que os resultados negativos podem ter emergido da diferença na composição do antígeno (tri-oligossacarídeo em vez de di-oligossacarídeo) usado no sistema de fluxo ML, como discutido por outros autores (MOURA et al., 2008)

No entanto, independentemente da explicação, com base nas evidências disponíveis, concluiu-se que essas amostras representavam resultados falso-negativos, que classificavam o sistema de fluxo ML como marginalmente menos confiável do que o teste NDO-LID<sup>®</sup>. As limitações do teste de fluxo ML para teste sorológico humano de hanseníase foram discutidas recentemente por HUNGRIA et al. (2016), mas a falsa negatividade não foi identificada como um problema.

Em contraste com amostras de T02 e T14, a amostra T07 era positiva por ELISA (OD 0,255) e no ML Flow, mas classificado como negativo no teste NOD-LID<sup>®</sup>. Os dados moleculares, apoiam a positividade dos testes sorológicos e indicam que o resultado foi

reprodutível. A ocorrência de falso negativo no teste NOD-LID<sup>®</sup> pode refletir um mecanismo inibitório indeterminado. Um nível aceitável de discordância entre ELISA e o teste NOD-LID<sup>®</sup> foi observado para amostras de soro humano analisados por Frade et al., (2017), que concluíram que o valor prático do teste de fluxo lateral estava associado ao seu uso como ferramenta de triagem, em vez de um método definitivo para prever o status da infecção.

Assim, neste estudo, a utilização de ferramentas sorológicas, indica que além do teste de fluxo lateral MLflow, o NDO-LID<sup>®</sup> (OL hanseníase) pode ser utilizado para triagem sorológicas e avaliação conveniente, rápida e confiável de populações de tatus brasileiros. A relevância desses achados se dá pela simplicidade de uso, exigência de treinamento mínimo, facilidade de interpretação (particularmente no caso do teste NOD-LID<sup>®</sup>), capacidade de realizar análises não letais em campo, reprodutibilidade comprovada e alto nível de concordância com o método imunodiagnóstico considerado padrão ouro (ELISA anti-PGL-1).

Recomendações para o uso do teste NDO-LID<sup>®</sup>, como uma ferramenta de triagem para hanseníase humana, foram recentemente propostas por pesquisadores brasileiros com base em uma avaliação robusta de mais de 400 amostras (FRADE et al., 2017b).

No entanto, dado o número limitado de amostras testadas neste estudo (n=20), seria imprudente sugerir que os testes de fluxo lateral pudessem ser vistos como uma ferramenta para a identificação definitiva de animais infectados. Portanto, a recomendação seria empregar estes testes para rastreamento inicial não invasivo, em situações em que o acesso a abordagens diagnósticas centralizadas e altamente equipadas não seja uma opção. Além disso, em consonância com a legislação brasileira que se refere à proteção da vida selvagem, a utilização destes testes poderá preceder e orientar decisões em relação à exigência de amostragem letal de tecidos internos desta espécie animal para exames moleculares e/ou histopatológicos.

Embora os dados sorológicos indiquem alto percentual de infecção, a despeito das técnicas disponíveis para a identificação de infecção por *M. leprae* em tatus, evidenciou-se a presença de DNA de *M. leprae* no tecido hepático dos 20 animais *E. sexcinctus*. Tal achado foi obtido através da utilização do elemento repetitivo multi-cópia específico de *M. leprae* (RLEP), como alvo em ensaios de PCR convencional e NESTED PCR, quando considerado necessário.

Assim, em concordância com os dados de ELISA anti-PGL1, a análise molecular por RLEP-PCR confirmou infecção em 20/20 (100%) dos animais analisados (figura 25).

Avaliações da carga bacteriana presente em *D. novemcinctus* infectados experimentalmente apontam que concentrações de  $10^9$  a  $10^{11}$  *M. leprae*/ grama de fígado, baço ou linfonodos podem ser encontrados (JOB, 2000; TRUMAN, 2008). No entanto, não se sabe se níveis semelhantes de crescimento bacteriano são encontrados em animais naturalmente infectados.

Dados produzidos por métodos moleculares (variações de RLEP-PCR), avaliando tatus naturalmente infectados, demonstraram a presença do DNA de *M. leprae* em vários tecidos (fígado, baço, linfonodo, orelha, pele, sangue) (DA SILVA et al., 2018a; DEPS; SANTOS; YAMASHITA-TOMIMORI, 2002; FROTA et al., 2012). Curiosamente, o uso de ferramentas de histoquímica (DAPI, SYBR gold e Fite Faraco) e realização de análises imunohistoquímicas de fragmentos de baços oriundos um espécime infectado naturalmente, PCR positivo, de *D. novemcinctus*, capturado no Pará, indicou que a carga bacteriana foi baixa (DA SILVA et al., 2018).

Analisando diferentes tecidos de *D. novemcinctus* e *E. sexcinctus*, através de RLEP PCR, Frota et al., (2012), encontraram maior percentual de infecção em orelha, fígado, nariz e baço, respectivamente. Já Da silva et al., (2018) reportaram que tatus positivos para RLEP, quando analisado o baço, também foram positivos para RLEP no análise de fígados. Além disso, quando a análise era negativa, ambos tecidos também foram negativos para RLEP.

No presente estudo, a análise molecular, aponta positividade em 100% dos fígados analisados. Vale ressaltar que um total de 18 das 20 amostras foram detectadas diretamente usando a PCR convencional, e uma única amostra (T19), não produziu o amplicon nas PCRs iniciais. No entanto, após a diluição (1:10), também foi positiva para o biomarcador RLEP. Este resultado sugeriu que o fígado desse animal continha um inibidor de PCR que não foi removido usando o Kit Qiagen.

Além disso, uma amostra adicional (T16) foi registrada como negativa mesmo após a diluição do DNA. No entanto, quando submetida ao NESTED PCR, evidenciou positividade (figura 25). Vale ressaltar que esta amostra demonstrou o menor valor de DO no ELISA anti-PGL-I e foi registrada como negativa em ambos os testes de FL (tabela 8)

Embora exista diferentes alvos, a predileção pela escolha do alvo RLEP deve-se a presença de múltiplas cópias (37) deste alvo no genoma do bacilo, aumentando a chance do anelamento e amplificação (TURANKAR et al., 2015)

Os estudos realizados em diferentes países, bem como no Brasil, utilizando RLEP como alvo nas análises moleculares de infecção por *M. leprae* em tatus, utilizam protocolos baseados nos estudos de Donoghue et al. (2011) e Frota et al., (2012), os quais diferem nos iniciadores e ciclagem, utilizados, essencialmente (FROTA et al., 2012).

No presente estudo, comparando a sensibilidade de ambos sistemas, os dados evidenciaram que o sistema proposto por Frota et al., 2012 foi mais sensível, sendo capaz de detectar 5 fg (figura 22).

Além disso, mais uma vez, este nível de detecção molecular superou os níveis de infecção registrados anteriormente em exemplares brasileiros de *D. novemcinctus* e *E. sexcinctus*, utilizando RLEP-PCR (DA SILVA et al., 2018; FROTA et al., 2012; PEDRINI et al., 2010).

Frota et al., (2012), embora tenham realizado a análise em tatus oriundos do Ceará, estado limítrofe ao Rio Grande do Norte, no nordeste brasileiro, bem como implementado um sistema mais sensível do que aquele proposto por Donoughe et al. (2001), detectaram positividade em 21% (6/29) dos animais, sendo 5/27 da espécie *D. novemcinctus* e 1/2 da espécie *E. sexcinctus*.

Em um estudo anterior, publicado em 2010, fragmentos de tecidos de 22 tatus da espécie *E. sexcintus* capturados no sudeste e no centro-oeste brasileiro, foram analisados através RLEP PCR, mas não apresentaram positividade. Além destes, o referido estudo também não reportou infecção em tatus das demais espécies analisadas, incluindo tatus da espécie *D. novemcinctus* (n=18) (PEDRINI et al., 2010)

Em contrapartida, uma investigação de infecção por *M. leprae* em tatus *D. novemcinctus* oriundos de uma região hiperendêmica para hanseníase, localizada no Pará, região Norte brasileira, o percentual de infecção encontrado foi de 62% (10/16), usando o mesmo alvo molecular (DA SILVA et al., 2018).

Ensaio quantitativos de PCR em tempo real (qPCR), sendo considerados mais sensíveis quando comparados ao PCR convencional, tem sido utilizado para diagnóstico de hanseníase utilizando biópsias de pele de pacientes, apresentando alta sensibilidade (100%) para pacientes multibacilares (MB > 5 lesões) e 84,6% de sensibilidade para pacientes paucibacilares (PB <5 lesões) (TRUMAN et al., 2008).

O estudo mais recente, envolvendo investigação de infecção por *M. leprae* em tatu, utilizou RLEP PCR em tempo real na análise de tecidos em 12 animais oriundo de Coari, Amazonas. No entanto, embora sejam tatus da espécie *D. novemcictus* oriundos de área hiperendêmica para a doença, limítrofe ao estado do Pará, o qual reportou 62% de infecção em tatu galinha, nenhuma positividade nestes animais foram evidenciadas (STEFANI et al., 2019).

Além disso, nos estudos reportados para os animais da espécie *D. novemcinctus* oriundos dos EUA, autores apontam que ao contrário do que se observa entre humanos, a grande maioria dos tatus parecia ser susceptível à infecção. Ocorrendo resistência em um percentual em torno de 15 – 20% dos animais (BALAMAYOORAN et al., 2015).

Embora os dados do presente estudo também corroborem com evidências de altos índices de infecção, o conhecimento sobre infecção e patogênese de *M. leprae* em *E. sexcinctus* é muito limitado quando comparado com o grande corpo de trabalho produzido a partir de infecções experimentais e naturais de *D. novemcinctus*.

De qualquer forma, a abordagem adotada, pautada em múltiplos métodos de detecção, claramente apoiam os achados de Frota et al. (2012), que reportaram pela primeira vez infecção em 1/2 *E. sexcinctus* no Ceará, estado limítrofe ao Rio Grande do Norte.

Como evidenciado no presente estudo, a infecção por *M. leprae* resultou na estimulação de uma resposta imune humoral, que pôde ser detectada em todos os casos pelo ELISA anti PGL-I e na maioria dos animais pelos testes de fluxo lateral. A última observação, confirmou o valor de tais testes para vigilância integrada de infecção em tatus como sugerido anteriormente por Deps et al. (2007).

A presença de resposta sorológica, bem como detecção do DNA de *M. leprae* no fígado ou outros tecidos (por exemplo, baço), tem sido considerada uma clara evidência do potencial reservatório desses animais. No entanto, vale ressaltar, que como mostrado por Silva et al., (2018), a quantidade de células de *M. leprae* que poderiam ser detectadas, usando uma variedade de métodos de coloração, em amostras de baço PCR-positivas (de *D. novemcinctus* naturalmente infectados), foi muito baixo.

Além disso, deve-se notar que, nenhum dos estudos realizados na América Latina até o momento, demonstrou a presença de células viáveis do *M. leprae* em tatus. Como tal, é impossível afirmar de forma conclusiva que a presença de anticorpos ou DNA nestes animais é prova da sua capacidade de transmitir o agente patogênico a outro animal ou humano.

Dessa forma, a avaliação da viabilidade do bacilo oriundo de tatus naturalmente infectados, poderá ser executada, utilizando o modelo consolidado, coxim plantar de nu/nu, bem como utilizando análise molecular do gene RNA ribossômico 16S (MARTINEZ et al., 2009; TURANKAR et al., 2016).

Além das observações feitas acima, deve-se notar que os estudos realizados até o momento na América Latina apresentam, no mínimo, duas limitações adicionais quando comparados aos dados da América do Norte. O primeiro ponto a ser considerado é o baixo número de amostras que foram examinadas na maioria das análises. As razões para tal estão relacionadas, principalmente às dificuldades associadas à questão legal de acesso aos animais silvestres. (BRATSCHI et al., 2015).

Outras limitações dos atuais estudos consistem no fato de que a maioria destes, além de envolverem poucas amostras, estas nem sempre foram coletadas sistematicamente ou aleatoriamente. A sensibilidade dos sistemas moleculares utilizados nem sempre foram reportados nos estudos. Além disso, se observa também, que em alguns estudos, embora o contato com tatus tenha sido relatado, evidências de infecção por *M. leprae* entre populações de tatu locais ou o contato paralelo com casos humanos acometidos pela hanseníase, nem sempre foram fornecidas ou sistematicamente investigados (BRATSCHI et al., 2015).

Vale ressaltar, que o fato da hanseníase ser um agravo com período de incubação longo, dificulta ainda mais a determinação de fontes de infecção.

No entanto, outra limitação bastante relevante associada aos dados latino-americanos é a ausência de dados epidemiológicos moleculares. Acredita-se que, assim como reportado nos EUA, por Truman et al. (2011), somente através da apresentação de tais informações será possível demonstrar claramente uma correlação entre as bactérias presentes nos tatus e àquelas presentes em populações humanas dentro ou além das áreas de captura.



Neste contexto, a ocorrência de hanseníase zoonótica foi comprovado nos EUA (TRUMAN et al., 2011). No Brasil, diversos estudos tem associado o histórico de contato com tatu como fator de risco para aquisição da hanseníase em humanos (CLARK et al., 2008; DEPS et al., 2008a; KERR-PONTES et al., 2006). No entanto, baseando-se em estudos epidemiológicos tradicionais, como estudos de caso-controle e inquéritos epidemiológicos, por exemplo, é difícil obter uma compreensão mais aprofundada sobre a participação de tatus na transmissão de *M. leprae*.

Portanto, estudos de epidemiologia molecular são ferramentas mais adequadas para este tipo de investigação. Assim, no presente estudo, mediante confirmação de infecção por *M. leprae* nos tatus *E. sexcinctus*, buscou-se determinar a diversidade genética de *M. leprae* circulante em populações animais e de pacientes.

A combinação do alto poder discriminatório da análise de VNTR, atrelado a robusta abordagem da tipagem de SNP para correlações filogeográficas, tem se mostrado eficaz em estudos epidemiológicos moleculares de tuberculose e hanseníase. (FONTES et al., 2017; TRUMAN et al., 2011), (CARDONA-CASTRO et al., 2009; TURANKAR et al., 2014)(JAGIELSKI et al., 2016).

No presente estudo estas ferramentas foram utilizadas para descrever a diversidade genética de *M. leprae* e investigar, através de análises comparativas, se o genótipo de cepas circulantes na população de tatus do Brasil, estaria associada às infecções em pacientes hansenianos brasileiros e de outros países.

Em um primeiro momento, a diversidade genética de tatus, bem como de pacientes de Mossoró, RN, município endêmico para hanseníase e próximo as regiões de origens dos tatus foram realizadas com base em 16VNTRs e 3 SNPs.

Assim, a diversidade genética de *M. leprae*, circulante em 24 tatus brasileiros, sendo tatus *E. sexcinctus* (n=20) do RN, bem como em 4 *D. novemcinctus*, oriundos de Alta Floresta, Mato Grosso (n=3) e São Paulo (n=1) foi determinada e apenas oito (A1- A7 e A24) , 7 do RN e 1 SP, possuíam determinação do número de cópias para no mínimo 10/16 loci analisados, sendo somente 1 (A4) com cobertura para os 16 alelos (tabela 9).

No entanto, embora não tenha sido possível determinar o número de cópia de todos os alelos para a maiorias dos isolados dos animais, observou-se um padrão conservado destes alelos dentre os 8 animais, sendo estas amostras selecionadas para a análise comparativa (tabela 9).

Nos EUA, a transferência de *M. leprae* entre tatus do Sul dos EUA parece ser altamente eficiente, já que a cepa de *M. leprae*, genótipo (3I-2-v1), foi encontrada infectando tatus em cinco estados dos EUA (TRUMAN et al., 2011). No presente estudo, o padrão conversado foi evidenciado nas estirpes de *M. leprae* oriundas de *E. sexcinctus* de diferentes municípios do RN, e do estado de SP.

No entanto, vale ressaltar, que o isolado oriundo de de SP, apresentou 8 cópias para o locus AC 9, semelhante ao tatu oriundo do município de Pendências, RN (T12). Enquanto que os demais tatus do RN, que tiveram cobertura para este marcador, apresentaram 9 cópias. Além disso, 2 dos 4 marcadores hipervariáveis ( $h=1$ ), AT15 e TA 18, também foram variáveis dentre os isolados de animais (tabela 9).

Comparando os genótipos dos isolados de *M. leprae* circulantes nos tatus brasileiros, com aqueles circulantes nos animais dos EUA, reportados por Truman et al., (2011), para os quais foram descritos o número de cópias de 10 loci (VNTRs), ambas populações compartilhavam 4/9 loci. Dentre estes marcadores, GGT5, 21-3 e 23-3 são poucos discriminatórios (conservados), enquanto GT9, é altamente discriminatório ( $h= 0.931$ ).

Em contrapartida, evidenciou-se variação de 1 a 3 cópias em outros 5/9 marcadores, sendo 1/5 (AC8a) altamente discriminatório e os demais moderadamente discriminatório (AC8b, AC9, 6-7, 12-5). Estes dados apontam diferenças consideráveis entre os genótipos

circulantes na população de tatus do Brasil e EUA, baseado em avaliação de 9 VNTRs. Assim, apesar da limitação em se determinar o número de cópias para todos os 16 VNTRs analisados, os dados preliminares de VNTRs sugerem a circulação de uma cepa restrita à população de tatu brasileira, sobretudo no Rio Grande do Norte, quando comparada àquela circulante nos EUA (tabela 10).

Não foi possível genotipar os isolados dos animais utilizando SNP (amostras não amplificaram). No entanto, vale ressaltar que um estudo recente mostrou que a cepa zoonótica de *M. leprae* (SNP subtipo 3I), reportada em tatus *D. novemcinctus* dos EUA, não possui nenhuma vantagem de crescimento em comparação com a estirpe geneticamente distante SNP tipo-4P.

A proliferação da cepa 4P foi maior do que o crescimento da cepa 3I em tatus infectados individualmente e nos co-infectados com ambos subtipos, sugerindo assim, diferenças patológicas entre essas duas cepas (SHARMA et al., 2018). Dessa forma, evidencia a relevância em se aprofundar a tipagem de *M. leprae* com base em SNPs.

Dada a inexistência de dados reportados para isolados de pacientes da região Mossoró, Rio Grande do Norte, foi avaliada a diversidade genética de estirpes de *M. leprae* de pacientes desta região. O município de Mossoró é considerado hiperendêmico pra hanseníase e encontra-se próxima aos cinco municípios do RN, nos quais se capturou-se os tatus *E. sexcinctus* (n=20). Além disso, a população exibe histórico de contato e consumo de tatus (DATASUS, 2017; BATISTA et al., 2019)

Dentre as 54 amostras obtidas de pacientes do município de Mossoró, RN, apenas 59,26% (32/54) apresentaram cobertura para pelo menos 10VNTRs, sendo estas as amostras incluídas nas análises comparativas posteriores (anexo D). Em relação ao gênero dos pacientes dos quais os isolados foram obtidos, 43,75% (14/32) eram do sexo masculino e 31,25% (10/32) do sexo feminino. A determinação da média de idade baseou-se apenas em 13 pacientes, sendo estes pertencentes a uma faixa de idade que vai dos 17 a 76 anos.

Um estudo recente realizado na região de Mossoró, apontou que a razão de chances para hanseníase multibacilar foi duas vezes maior para homens em comparação às mulheres, observando-se o mesmo para doentes com 60 ou mais anos de idade comparados aos mais jovens (NOBRE, 2016).

A tipagem por SNPs foi definida para 61,1% (33/54) das amostras de pacientes, visto que para 18,5% (10/54) não foi possível determinar nenhum marcador VNTRs e por isto, não foram incluídas nas análises por SNPs. No entanto, observou-se que o genótipo mais predominante foi SNP 4, ocorrendo em 66,6% (22/33) das amostras analisadas, seguido do SNP 3, ocorrendo em 30,3% (10/33) das amostras analisadas. Vale ressaltar que apenas uma (1/33) das amostras analisadas foi SNP 1 ou 2 (anexo D).

No Brasil, a genotipagem prévia de estirpes de *M. leprae* oriundos de pacientes não relacionados da região Sudeste do país, demonstrou uma alta variabilidade genética baseada em VNTR, bem como predominância do SNP-Tipo 3 (FONTES et al., 2009). Em concordância com estudos que apontam que SNP-tipo 4 é muito mais frequente na região norte-nordeste do país (FONTES et al., 2017), o presente estudo também evidenciou a predominância de SNP 4 dentre as estirpes de *M. leprae* obtidas de pacientes de Mossoró.

Ao realizar as análises comparativas entre os isolados de *M. leprae* oriundos de pacientes de Mossoró, RN, com base em 16VNTRs e 3 SNPs, cada amostra representou um perfil distinto que pode ser atribuído aos marcadores VNTRs polimórficos (figura 27A) ou à ausência de determinação do número de cópias para alguns marcadores.

Vale ressaltar, que um grupo de quatro amostras esteve correlacionadas nas duas análises (com base em 16 e 11 VNTRs, respectivamente), mas formaram “clusters” entre si somente na análise com base em 11 VNTRs. Vale ressaltar, que a amostra BRRNLP13 não foi agrupada, devido a uma variação de único-locus em (AC)8a (figura 27A). Além disso,

observa-se que a ausência do marcador (AC) 8b, entre os isolados de pacientes RNLP31 e RNLP51, gerou a formação de “semi-cluster” (figura 27B)

A análise comparativa, com base em 16 VNTRS, das estirpes de *M. leprae* oriundas dos pacientes de Mossoró, com àquelas de pacientes de outros estados da região Nordeste e Norte, evidenciou grande diversidade (figura 28). No entanto, com base na análise de 11VNTRs, observou-se a formação de dois grandes “clusters” (figura 29).

Nestes, as amostras de pacientes do RN, região nordeste brasileira, se agruparam com pacientes de Fortaleza, Ceará, município limítrofe à Mossoró, e Pernambuco, sendo este estado também pertencente a região Nordeste. Além disso, isolados de Rondônia, região Norte do Brasil também se agruparam com pacientes de Mossoró, Ceará e Pernambuco (figura 29).

Portanto, além da proximidade geográfica entre os estados da região Nordeste, os fluxos migratórios bidirecionais históricos entre pessoas do Nordeste e Norte, poderia explicar esta correlação entre as estirpes de *M. leprae* encontrada nos pacientes da região Norte e Nordeste neste estudo (NOBRE et al., 2015)

Após a determinação da diversidade genética de *M. leprae* circulantes na população animal, bem como em pacientes do município de Mossoró, RN, estes dados foram comparados com dados de genótipos reportados na literatura para pacientes de diferentes estados brasileiros, diferentes países, bem como àqueles reportados para tatus dos EUA.

Portanto, as análises comparativas foram realizadas a fim de verificar se as estirpes de *M. leprae* circulantes na população de tatus do Brasil e estariam associadas às infecções em pacientes hansenianos brasileiros e de outros países. Estas análises comparativas foram realizadas com base na utilização de 16 VNTRs, 10 VNTRs e 4 VNTRs, segundo trabalhos reportados na literatura (FONTES et al., 2017; LIMA et al., 2018; TRUMAN et al., 2011)

Primeiramente, determinou-se o índice de discriminação alélica (HGDI) dos marcadores, sendo possível observar que algumas repetições apresentaram-se altamente polimórficas, enquanto outras demonstraram baixo ou nenhum polimorfismo. No presente estudo, os VNTRs que apresentaram os maiores índices de discriminação alélica foram as repetições de dinucleotídeos compostas por AT (AT17, AT15, TA18) e o trinucleotídeo GAA21 (tabela 12).

Assim, é válido reportar, que este último microssatélite (GAA21) também foi descrito como sendo altamente polimórfico em um estudo conduzido na Tailândia, no qual o poder discriminatório de 14 VNTRs foi avaliado através da análise de biópsias de pele e esfregaços dérmicos de pacientes hansenianos. Neste mesmo trabalho, repetições de dinucleotídeos como AT17, AT15 e TA18 também apresentaram as maiores taxas de diversidade alélica, assim como reportado em outro estudo (FONTES et al., 2017).

As análises comparativas baseadas em 4VNTRs, reportadas por Lima et al. 2018 (Figura 30), e 10 VNTRs (Figura 31), reportada por Truman et al. (2011), evidenciaram a formação de quatro *clusters* (C1-C4) compreendendo amostras de animais e humanos provavelmente não relacionadas epidemiologicamente, devido à distância geográfica.

A partir da análise com base em 4VNTRs, um cluster (C1) ocorreu devido à semelhança de apenas um marcador, dos 4 analisados, uma vez que os demais não tiveram resultados. Assim, este *cluster* não foi considerado válido. As estirpes de *M. leprae* de tatus dos EUA agruparam com amostras de pacientes também dos EUA, bem como isolados de pacientes do Brasil, Índia, Tailândia, Venezuela e Colômbia.

No entanto, não houve agrupamento entre os isolados de *M. leprae* oriundos de tatus do dos EUA e do Brasil. Além disso, os isolados de *M. leprae* oriundos dos animais do RN, agruparam com isolados de pacientes de diferentes países (C3 e C4), tais como Brasil (PA, CE, RJ e SP), Filipinas, Índia, Tailândia, Venezuela, Colômbia, China (figura 30)

A fim de aumentar a estringência da análise comparativa, removeu-se marcadores altamente discriminatórios ( $h=1$ ) e pouco discriminatório ( $h= -0,005$ ), realizando assim, agrupamentos baseado em 11VNTRs. Assim, a análise comparativa entre 8 isolados de tatu oriundos do Brasil (sendo 7, do RN e 1, de SP) e o banco de dados completo utilizado no estudo, evidenciou a formação de um cluster entre isolados de tatus do RN (A1, A4 e A6), oriundos dos municípios de Pendência, Afonso Bezerra e Macau, RN respectivamente, bem como com um paciente de Fortaleza, Ceará (figura 32).

Embora se observe um padrão conservado entre a maioria dos alelos determinados para as estirpes de *M. leprae* obtidas dos animais do RN, só houve a formação de cluster entre aqueles (A1, A4 e A6) que apresentavam determinação do número de cópias para todos os 11 loci considerados na análise, sendo estes idênticos (figura 32).

O estado do Ceará, sendo aquele de origem do paciente que apresenta a estirpe correlacionada com àquelas dos animais, é considerado hiperendêmico para hanseníase, e se reporta para esta área evidências epidemiológicas relevantes, tais como: ocorrência de *E. sexccintus*, bem como evidências de infecção por *M. leprae* nesta espécie animal e histórico de consumo de carne deste tatu. Além disso, geograficamente, o Ceará se encontra limítrofe ao estado do Rio Grande do Norte.

Com base nos diferentes estudos reportados na literatura, as análises realizadas excluindo os marcadores hipervariáveis são relevantes para que se observe a formação de cluster (FONTES et al., 2017). No entanto, a manutenção destes marcadores na proposta de análise que envolvia todos os 16 VNTRs utilizados na genotipagem de isolados animais do Rio Grande do Norte, evidenciou que o isolado de tatu (A4), oriundo de Afonso Bezerra, RN, compartilha 14 dos 16 VNTRs, incluindo os loci considerados altamente discriminatórios, com um paciente do Pará, Brasil (A751) (figura 33).

Vale ressaltar, que um estudo envolvendo uma família de Andhra Pradesh, Índia, os padrões de VNTRs de *M. leprae* em dois pacientes diferiam somente nos marcadores (GTA) 9 e (AT) 15, sendo idênticos em 16 dos 18 loci analisados. Assim, consideraram esta evidência, um indicativo de ocorrência de uma fonte comum de infecção (SHINDE et al., 2009).

Neste contexto, um fato histórico relevante foi ocorrência de fluxo migratório massivo durante os períodos de seca prolongadas, entre população humana do RN, Nordeste brasileiro, para a região Amazônica, sobretudo Pará. Estima-se que meio milhão de imigrantes, principalmente nordestinos, tem migrado para a região Amazônia entre 1890 e 1920. No entanto, houve retorno de muitos trabalhadores para seus estados de origem, devido condições precárias de vida e trabalho.

A evidência da doença já ser considerada um problema de saúde pública no estado do Pará 60 anos antes (a partir de 1804) dos primeiros casos serem relatados no Rio Grande do Norte e no estado do Ceará, reforça a evidência de que este fluxo migratório possa ter contribuído para a introdução de hanseníase no Rio Grande Norte, explicando em parte a correlação entre cepas dessas duas regiões.

Aém destas evidências históricas, reporta-se que no Pará, a hanseníase é endêmica, e há consumo de carne de tatus, bem como infecção natural em tatus no oeste do estado também foi recentemente reporada (DA SILVA et al., 2018).

Dessa forma, se poderia sugerir uma correlação epidemiológica entre as estirpe de *M. leprae* do tatu (A4), oriundo de Afonso Bezerra, RN, com um paciente do Pará, Brasil (A751), uma vez que compartilham 14 dos 16 VNTRs, incluindo os hipervariáveis.

No entanto, a ausência do marcador 18-8 e variação no 27-5, diante da ausência de evidências epidemiológicas dos hábitos e padrão de migração do paciente em questão, não permite a confirmação de correlação epidemiológica entre as estirpes presente nos animais e humanos.

Embora os dados de genotipagem baseados em VNTRs, evidenciem uma correlação entre as estirpes de *M. leprae* de tatus com àquelas oriundas de um paciente do Ceará (considerando 11 VNTRs) e outro do Pará, uma vez que compartilham 14/16 marcadores VNTRs, incluindo 4 hipervariáveis, não fornecem evidências definitivas para existência um perfil genético de *M. leprae* comum entre pacientes e tatus brasileiros.

Este fato deve-se às limitações para se obter a caracterização completa dos isolados de *M. leprae* associadas às amostras de tatu, como para uma porção substancial dos isolados humanos. Sendo assim, é impreciso afirmar que estes resultados forneceram evidências conclusivas sobre a existência de estirpes de *M. leprae* sendo compartilhadas entre população humana e animal no Brasil.

Portanto, recomenda-se que, para resolver esta lacuna, as melhorias nos protocolos VNTR existentes devem ser uma prioridade para futuras pesquisas sobre este importante tópico. Além disso, apesar das regiões das quais pertencem os pacientes que tiveram estirpes mais correlacionadas com àquelas dos tatus do RN, sejam endêmicas, apresentem o histórico de tatus naturalmente infectados, bem como de ocorrência do hábito cultural de caça, manipulação, criação e consumo de tatus, evidências epidemiológicas mais precisas são necessárias.

Vale ressaltar, que informações mais precisas, acerca do histórico epidemiológico dos pacientes são extremamente relevantes, tais como: descrição dos hábitos, padrão de deslocamento, características ambientais dos locais de moradia, evidências de contato com outros pacientes hansênicos, bem como caça, criação, manipulação e consumo do tatu.

Embora Truman et. al. (2011), tenha utilizado apenas 10 VNTRs, a análise de genotipagem molecular implementada foi mais robusta, visto que aplicou-se subtipagem por SNPs, bem como a análise de genoma completo de algumas estirpes através de WGS, além das ferramentas epidemiológicas que forneceram informações sobre o hábitos e deslocamento dos pacientes (Truman et al., 2011)

De qualquer forma, apesar dos dados de genotipagem serem apenas sugestivos, concluiu-se que, em comum com *D. novemcinctus*, tatus *E. sexcinctus* representam um potencial reservatório de *M. leprae* e, como tal, seu papel em um possível ciclo zoonótico de hanseníase no Brasil merece mais investigação.

A limitação encontrada para se determinar o número de cópias dos alelos” tanto em isolados de tatus, quanto em isolados de pacientes, deve-se a dificuldade de se obter DNA de *M. leprae*, uma vez que sendo o bacilo incultivável em meio axênico, esta obtenção se restringe ao processamento direto das amostras clínicas.

A presença de DNA do bacilo em amostras de linfa, sangue, biópsias de pele, biópsias de pele embebidas em parafina são reportadas (FONTES et al., 2009, 2012). No presente estudo, as estirpes de *M. leprae* de pacientes foram obtidos de material de linfa proveniente de lâminas de baciloscopia (esfregaços dérmicos), uma vez que fazem parte da rotina dos serviços de saúde de atendimento aos pacientes, e assim, viabilizaram sua aquisição para o estudo, como reportado por Fontes et al. (2012). No entanto, acredita-se que pelo fato das lâminas serem fixadas e coradas, inibidores possam ter interferido na amplificação do DNA por PCR.

Apesar da multiplicação deste patógeno seja possível *in vivo*, realizando cultivo em tatu ou em coxim plantar de camundongo *nu/nu*, é necessário muito tempo para que uma quantidade considerável de bactérias seja obtida para posterior obtenção de DNA. Além disso, pouco se sabe sobre as características adaptativas ou sobre as alterações genéticas potenciais deste organismo quando cultivados durante longo período. Por estas razões, a genotipagem de *M. leprae* tem sido, ao longo dos anos, um grande desafio para pesquisadores do mundo todo.

A análise de 15 VNTRs, 6 minissatélites e 9 microssatélites, analisados por meio de quatro PCRs multiplex, o qual utiliza oligonucleotídeos marcados com fluorescência para que o número de cópias de cada repetição seja determinado através de “Fragment length analysis”, foi sugerida como uma forma de análise mais rápida e eficiente para genotipagem de *M. leprae* (Kimura et al., 2009).

No entanto, durante as análises, o número de cópias de alguns marcadores só pôde ser determinados através de PCR “single”, demonstrando uma baixa sensibilidade deste método. A sensibilidade relativamente limitada de uma das quatro reações multiplex foi confirmada neste estudo.

As estratégias para solucionar esta limitação não está clara. O uso de kits para purificação de DNA é altamente recomendado, uma vez que fornece um grau de controle de qualidade e, em teoria, garante que os dados gerados possam ser comparados entre os estudos.

No entanto, eles sofrem da desvantagem de poderem processar apenas uma quantidade limitada de tecido (25 mg) no caso do kit da Qiagen utilizado neste estudo.

Portanto, este fato pode ser um problema para tecidos com baixa carga bacteriana, e com uma distribuição tecidual bacteriana heterogênea, como foi o caso dos tecidos examinados no estudo de Da Silva et al., 2018.

A comparação entre os métodos de extração de DNA com fenol : clorofórmio e o kit Qiagen, demonstrou que (para as cinco amostras examinadas), os resultados no RLEP-PCR eram essencialmente os mesmos (figura 23). No entanto, é válido ressaltar, que o método do fenol:clorofórmio permitiria a ampliação do processo de purificação, permitindo o processamento de maiores quantidades de tecido. Portanto, seria relevante considerar para futuros estudos esta abordagem.

O sistema de VNTRs usado para tipagem de *M. leprae* é muito similar ao MIRU-VNTR, ferramenta amplamente utilizada para genotipagem de isolados de *M. tuberculosis* (Mtb) (SUPPLY et al., 2006).

Vale ressaltar, que Mtb são organismos cultiváveis e as amostras analisadas são geralmente oriundas de isolamento em meio de cultivo, assim, fornecem DNA em quantidade considerável para as análises. No entanto, apesar deste fato, autores apontam que o método de MIRU-VNTR também reporta limitações, onde parte dos loci geralmente não podem ser amplificados por PCRs multiplex.

Dessa forma, um estudo posterior reavaliou sete primers e o PCR master mix, obtendo um método de tipagem VNTR 24-locus fortemente otimizado e que reduziu significativamente o tempo de resposta da “digitação” e também o ônus financeiro da técnica (DE BEER et al., 2014). Assim, é necessário que este tipo de otimização seja realizado para a atual método de tipagem de *M. leprae*, baseado em VNTRS-SNPs, sobretudo quando se utiliza amostras biológicas ambientais.

A análise da diversidade genética de patógenos bacterianos ajuda a compreender melhor a epidemiologia e a evolução destes micro-organismos (SHARMA et al., 2018; TRUMAN et al., 2011). Portanto, a relevância da compreensão da evolução destes patógenos é importante, devido o avanço da resistência antimicrobiana.

Além disso, ajuda a compreender respostas provenientes da relação patógeno-hospedeiro, ou seja, a influência da diversidade genética dos bacilos na resposta imune do hospedeiro e na evolução e mudança nos aspectos epidemiológicos das doenças.

Apesar dos desafios de se realizar genotipagem de *M. leprae*, Truman et al. (2011) forneceu evidências mais definitivas da ligação de transmissão entre os genótipos circulantes em tatus (3I-2-v1) com aqueles encontrados em pacientes humanos nos EUA. Sendo este achado mais rigorosamente confirmado pelo sequenciamento completo do genoma de *M. leprae*, a partir de espécimes de tecido ou biópsia (SHARMA et al., 2015; TRUMAN et al., 2011).

Reforçando a ideia que a hanseníase sempre esteve permeada de lacunas epidemiológicas. Recentemente, assim como reportado em tatus, infecções naturais em primatas não-humanos e esquilos vermelhos foram confirmados (AVANZI et al., 2016; HONAP et al., 2018; TIÓ-COMA et al., 2019).

No entanto, embora a prevalência de hanseníase natural em primatas não-humanos seja provavelmente baixa, análises filogenéticas evidenciaram que a cepa de *M. leprae* de um primata *Cynomolgus* (*Macaca fascicularis*) das Filipinas, está mais relacionada com uma cepa de *M. leprae* humana da Nova Caledônia. Enquanto que as cepas de *M. leprae* de Chimpanzé (*Patricias inhadis*) e *Mangabey fuliginoso*, ambos da África ocidental, se correlaciona à uma cepa humana de *M. leprae* comumente encontrada na África Ocidental (HONAP et al., 2018)

Além disso, algo mais interessante e intrigante foi reportado em um estudo com esquilos vermelhos (*Sciurus vulgaris*). Apesar da hanseníase ser considerada erradicada das ilhas britânicas séculos atrás, um estudo recente utilizando ferramentas histopatológicas, sorológicas, reportou infecção por *M. leprae* em esquilos da Brownsea Island, Inglaterra.

O sequenciamento completo demonstrou que o genoma de *M. leprae* desta população de esquilos vermelhos foi homóloga à sequência recuperada de um caso humano dos tempos medievais. Assim, evidencia que os esquilos podem atuar como reservatórios para *M. leprae* nas Ilhas Britânicas, mantendo o bacilo no ambiente após o desaparecimento do reservatório humano (AVANZI et al., 2016)

Estes achados reforçam a relevância de se investigar infecção, bem como a diversidade genética destes patógenos a fim de elucidar aspectos epidemiológicos desta doença que ainda configura um agravo relevante em saúde pública. Assim, compreender como *M. leprae* é transmitido, torna-se crucial para frear a ocorrência de novos casos, bem como o avanço da doença.

Em suma, o presente estudo, embora não possa afirmar que as estirpes de *M. leprae* são realmente associados à uma população humana de área endêmica do RN, demonstra a infecção natural em uma espécie pouco estudada, e contribui com os primeiros genótipos de *M. leprae* circulantes em tatus brasileiros, estimulando assim, o avanço para uma visão “One-Health” sobre a avaliação da relevância do tatu na transmissão de *M. leprae*.

Além disso, os dados reportados no presente estudo reforçam que investigações em diferentes espécies de tatus devem ser realizadas, dado o alto percentual de infecção reportados em tatus da *E. sexcinctus*, bem como a possibilidade de correção epidemiológica entre tatus do RN, com pacientes do Ceará e Pará.

Vale ressaltar, que os animais são oriundos de diferentes municípios do Rio Grande do Norte, e embora estejam próximos a Mossoró, município hiperendêmico, não são considerados endêmicos para a doença.

Além disso, a disseminação de infecção por *M. leprae* entre os tatus parece ser eficiente, já que foi evidenciada em tatus *E. sexcinctus* de diferentes municípios não-endêmicos do RN. Vale ressaltar, que haviam pontos de obtenção dos animais mais dispersos, bem como aglomerados de animais positivos para um raio de 2,25 Km, sendo este, o raio de dispersão diária de animais desta espécie, segundo Encarnação (1987) (figura 34).

A fim de estimar o comportamento ecológico dos tatus *E. sexcinctus* do RN, baseado nas características ambientais da área de estudo, observa-se, sobretudo em Afonso Bezerra, maiores áreas com vegetação. Assim, além desses animais terem hábitos solitários, a vegetação poderia diminuir a dispersão desses animais entre as áreas avaliadas (figura 35).

Nesta região, foi obtido animal que apresentou positividade em todas técnicas para detecção de infecção utilizadas no estudo, bem como para o qual foram obtidos os 16 VNTRs, sendo a estirpe de *M. leprae* deste animal aquela mais correlacionada com uma estirpe de *M. leprae* humana.

Vale ressaltar, que em Pedro Avelino, embora tenha baixos índices de vegetação, existem áreas mais altas (elevações) e isto pode dificultar a dispersão desses animais para os municípios limítrofes do RN não incluídos no presente estudo (figura 36). No entanto, devido ao alto percentual de infecção em tatus reportado no presente estudo, envolvendo análise em cinco municípios não-endêmicos, aponta para a necessidade de mais estudos no Rio Grande do Norte.

Além disso, outro aspecto a ser avaliado, são os fatores que possam estar favorecendo a manutenção da endemia entre os animais, visto que embora se acredite que os animais tenham sido infectados a partir dos humanos, ao longo da história de ocupação e dispersão desses animais nas Américas, os municípios que compreendem a área de obtenção dos animais avaliados no presente estudo não são prioritários para hanseníase, sendo considerados não endêmicos para a doença. Assim, nas referidas regiões, a possibilidade dos humanos estarem transmitindo para os animais seria baixa (DATASUS, 2017; PEDRINI et al. 2010).

De qualquer forma, vale ressaltar, que em tais municípios os hábitos de caça, criação, manipulação, bem como o uso de diferentes tecidos desses animais para consumo e fins médico-medicinais são culturais nas regiões (FROTA et al., 2012; SILVA et al., 2018).

Assim, além de estudos reportarem que estes hábitos sejam considerados fatores de risco para aquisição da doença (DA SILVA et al., 2018b; DEPS et al., 2008a; KERR et al., 2015), o presente estudo, embora não seja conclusivo, reporta uma correlação entre estirpes de *M. leprae* entre animais e pacientes.

Dessa forma, apesar dos municípios do RN que compreendem o presente estudo não serem considerados prioritários para hanseníase, na ocasião, uma atenção deverá ser dada a estas populações sobre o ponto de vista de busca ativa de casos índices e contatos para hanseníase, visto que o período de incubação para este agravo é longo.

Além disso, é válido ressaltar, que as ações que governamentais e institucionais de combate à caça ilegal devem ser implementadas e continuadas. Assim, atreladas a estas, as ações de educação em saúde também se fazem necessárias, sobretudo em áreas rurais, a fim de promover informação e desestimular os hábitos de caça destes mamíferos silvêstres, tanto pelo aspecto legal, como pelos aspectos ecológicos e sanitários.

Neste contexto, fica claro entender a complexidade de se implementar ferramentas afim de elucidar os aspectos relacionados à transmissão do bacilo associado à hanseníase, de forma mais definitiva, sobretudo, no que diz respeito às fontes de infecção não-humanas. Além disso, a implementação de medidas efetivas para o enfrentamento deste agravo, também tem sido um dos maiores entraves da comunidade científica, sobretudo brasileira.

No entanto, estratégias para viabilizar as melhorias das atuais ferramentas metodológicas, bem como das ações de políticas públicas que visam frear a disseminação deste agravo precisam ser consideradas. Assim, poderemos avançar nos estudos desta importante temática, bem como na implementação das estratégias para enfrentamento deste relevante agravo em saúde pública.



## 7. CONCLUSÕES

1. Os tatus da espécie *Euphractus sexcinctus* oriundos de cinco municípios do Rio Grande do Norte, apresentaram evidências, moleculares e sorológicas de exposição e infecção por *M. leprae*.
2. O método sorológico ELISA, utilizando PGL-I como antígeno, foi confirmado como o método mais sensível e específico para detecção imunológica de exposição a *M. leprae* em *E. Sexcinctus*.
3. O método sorológico ELISA, usando a proteína recombinante LID-1 como antígeno, indicou que a LID-1 é pouco imunogênica em *E. sexcinctus* naturalmente infectada.
4. O uso de testes imunocromatográficos de fluxo lateral, baseados na detecção do antígeno PGL-I, oferece uma alternativa ao ELISA e seu uso como método inicial de triagem deve ser investigado em futuros estudos de infecção natural em tatus por *M. leprae*.
5. Ensaios de PCR utilizando o biomarcador RLEP fornecem detecção sensível e específica de DNA de *M. leprae* no tecido hepático de *E. sexcinctus*, mas não fornecem evidências conclusivas para a capacidade dos animais atuarem como um reservatório de *M. leprae*.
6. O estabelecimento de um banco de dados para perfis de genotipagem VNTR, baseado em isolados humanos brasileiros e internacionais, juntamente com perfis de animais, demonstrou numerosas deficiências (principalmente marcadores ausentes) no conjunto de dados.
7. A aplicação de métodos de genotipagem baseados em SNPs e VNTR demonstrou que as estirpes de *M. leprae* presentes nos pacientes de Mossoró, RN foi muito semelhante ao que se reporta em outros estados do Nordeste brasileiro, Ceará e Pernambuco.
8. As tentativas de realizar genotipagem de *M. leprae* presente em *E. sexcinctus*, baseadas em SNPs, não tiveram sucesso, enquanto que o uso de VNTRs foi parcialmente bem sucedido. No entanto, as amostras de tatu evidenciaram um perfil aparentemente único.
9. A comparação entre os genótipos dos isolados de *M. leprae* gerados para as amostras de tatus, com aqueles contidos no banco de dados referentes a humanos e tatus, já reportados na literatura, não forneceu evidências definitivas para a transmissão zoonótica de *M. leprae* no Brasil.
10. O desenvolvimento de melhorias nos métodos usados para gerar dados genotípicos baseados em VNTR e SNPs, a partir de amostras de tatu, as quais contêm quantidade limitada de DNA de *M. leprae*, deve ser considerado como uma prioridade para estudos futuros.

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Hanseníase, apesar de ser uma das primeiras doenças humanas reportadas na história da humanidade. A despeito de muitos esforços das organizações e secretarias de saúde, bem como de inúmeros hansenologistas, ainda possui lacunas epidemiológicas que remontam a idade da própria doença.

Os altos níveis de transmissão recente no mundo evidenciam que é necessário o acompanhamento epidemiológico para uma melhor compreensão e redução da disseminação deste agravo.

As ferramentas sorológicas como parte do sistema integrado de vigilância e ferramentas moleculares robustas capazes de fornecer informações relevantes sobre o fluxo de transmissão são de relevante aplicabilidade em estudos epidemiológicos.

As evidências de respostas sorológicas ao *M. leprae* e a presença do DNA do bacilo em tecidos de todos tatus da espécie *E. sexcinctus* analisados no estudo, apontam que a ausência de registros de infecção em outras espécies possa ser resultado de uma baixa investigação, sobretudo pela diversidade de espécies de tatus coexistindo em diferentes áreas.

Além disso, a ocorrência de infecção em tatus oriundos de cinco municípios distintos do RN, sugerem disseminação da infecção entre *E. sexcinctus*. Além disso, reforçam a necessidade de se entender os fatores envolvidos na disseminação da endemia entre os animais, bem como considerar em futuros estudos ecológicos os impactos da infecção por *M. leprae* no desenvolvimento, reprodução e longevidade desses animais.

Vale ressaltar, que além da importância em se compreender a causa, patogênese, fatores de susceptibilidade e resistência dos hospedeiros, bem como os fatores de virulência e resistência dos patógenos envolvidos em uma doença, é importante direcionar esforços para a compreensão dos aspectos ligados a sua transmissão. Assim, é possível o desenvolvimento de estratégias mais eficazes de prevenção e controle do agravo.

Ao contrário dos dados norte-americanos robustos acerca da relevância em termos de saúde pública da infecção em tatus e seu papel como reservatório, no Brasil, as evidências do caráter zoonótico ainda são sugestivas. Além disso, é notório que desvendar a dinâmica de uma possível hanseníase zoonótica em algumas regiões do Brasil, incluindo o Rio Grande do Norte (RN), pode ser mais complexo do que no sul dos EUA.

As razões mais evidentes desta complexidade, podem ser atribuídas ao caráter heterogêneo da prevalência da hanseníase no Brasil e um número de maior de espécies de animais coexistindo em diferentes regiões brasileiras. Nestas, as ações antrópicas inerentes à caça de tatus podem envolver questões culturais e socioeconômicas diferentes das que ocorrem na região norte-americana.

Em relação aos aspectos epidemiológicos, o desafio enfrentado nos estudos da hanseníase consiste, sobretudo, no fato do agravo ser de caráter crônico, apresentando um longo período de incubação. Assim, limita significativamente inferir evidências robustas e seguras sobre a fonte de infecção. Outro fator limitante seria o forte estigma social, o qual desencoraja os pacientes a procurar serviços de saúde, bem como fornecer informações detalhadas sobre sua história epidemiológica. Além disso, a desestruturação de algumas unidades de saúde em diversas regiões brasileiras podem subestimar o real cenário epidemiológico das regiões.

A fragilidade dessa abordagem epidemiológica tradicional foi abordada nos estudos norte-americanos, uma vez que os dados fornecidos através da aplicação das ferramentas epidemiológicas moleculares robustas, como genotipagem baseada em VNTRs, tipagem e subtipagem de SNPs e WGS, foram determinantes para a confirmação da existência de infecção humana através de cepas de *M. leprae* que circulam em populações de tatus.

Todavia, ainda que os serviços de WGS sejam oferecidos por plataformas tecnológicas em muitos institutos de pesquisa, trata-se de uma ferramenta laboriosa, requer infraestrutura laboratorial específica e grande capacitação técnica para a análise dos resultados gerados. Além disso, a técnica requer DNA em quantidade e qualidade, o que para um patógeno que não é cultivável *in vitro* como *M. leprae* trata-se ser um fator limitante.

Portanto, embora o WGS seja uma ferramenta de epidemiologia molecular promissora, a tipagem molecular realizada com base em SNP e VNTR ainda é a abordagem mais viável e acessível para a maioria dos grupos de pesquisa e tem sido implementada para se avaliar a diversidade genética entre isolados de *M. leprae*, bem como monitorar a dinâmica de transmissão da hanseníase.

De qualquer forma, dadas as deficiências nos perfis genotípicos das amostras oriundas de tatu e em uma porção substancial das oriundas dos humanos, devido a dificuldades encontradas na amplificação de alguns marcadores, seria incorreto afirmar que nossos dados forneceram evidências conclusivas da existência de perfil genotípico de *M. leprae* comum entre pacientes e humanos no Brasil.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, L. B. et al. Insights from animal models on the immunogenetics of leprosy: a review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107 Suppl 1, p. 197–208, dez. 2012.
- AHMED, R. et al. Phage-typing scheme for *Escherichia coli* O157:H7. **The Journal of infectious diseases**, v. 155, n. 4, p. 806–9, abr. 1987.
- AHUJA, M. et al. Detection of *Mycobacterium lepromatosis* in patients with leprosy in India. **Infection and drug resistance**, v. 11, p. 1677–1683, 2018.
- ALVES, R. R. et al. Hunting strategies used in the semi-arid region of northeastern Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 5, n. 1, p. 12, 22 dez. 2009.
- AVANZI, C. et al. Red squirrels in the British Isles are infected with leprosy bacilli. **Science**, v. 354, n. 6313, p. 744–747, 11 nov. 2016.
- AVNI, E. et al. A phylogenomic study quantifies competing mechanisms for pseudogenization in prokaryotes-The *Mycobacterium leprae* case. **PloS one**, v. 13, n. 11, p. e0204322, 2018.
- BAGAGLI, E. et al. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. **Medical mycology**, v. 41, n. 3, p. 217–23, jun. 2003.
- BAKKER, M. I. et al. Risk factors for developing leprosy--a population-based cohort study in Indonesia. **Leprosy review**, v. 77, n. 1, p. 48–61, mar. 2006.
- BALAMAYOORAN, G. et al. The armadillo as an animal model and reservoir host for *Mycobacterium leprae*. **Clinics in Dermatology**, v. 33, n. 1, p. 108–115, 1 jan. 2015.
- BANG, P. D. et al. Evaluation of polymerase chain reaction-based detection of *Mycobacterium leprae* for the diagnosis of leprosy. **The Journal of Dermatology**, v. 36, n. 5, p. 269–276, maio 2009.
- BATISTA, J. S. et al. Hepatic Lipidosis in Banded Armadillos (*Euphractus sexcinctus*) Bred in Captivity. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 44, n. 1, p. 4, 16 jan. 2019.
- BEYENE, D. et al. Nasal carriage of *Mycobacterium leprae* DNA in healthy individuals in Lega Robi village, Ethiopia. **Epidemiology and infection**, v. 131, n. 2, p. 841–8, out. 2003.
- BONATO, V. et al. Ecology of the Armadillos *Cabassous unicinctus* and *Euphractus sexcinctus* (Cingulata: Dasypodidae) in a Brazilian Cerrado. **Journal of Mammalogy**, v. 89, n. 1, p. 168–174, 19 fev. 2008.
- BRAET, S. et al. The Repetitive Element RLEP Is a Highly Specific Target for Detection of *Mycobacterium leprae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 56, n. 3, 5 jan. 2018.
- BRASIL. Lei Federal N° 9.605, de 12 de fevereiro de 1998. Dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, e dá outras providências. Disponível em [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/L9605.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L9605.htm). Acesso em maio de 2019.

- BRATSCHI, M. W. et al. Current knowledge on *Mycobacterium leprae* transmission: a systematic literature review. **Leprosy review**, v. 86, n. 2, p. 142–55, jun. 2015.
- BRETT, S. J. et al. Serological activity of a characteristic phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae* in sera from patients with leprosy and tuberculosis. **Clinical and experimental immunology**, v. 52, n. 2, p. 271–9, maio 1983.
- BÜHRER-SÉKULA, S. et al. The ML flow test as a point of care test for leprosy control programmes: potential effects on classification of leprosy patients. **Leprosy review**, v. 78, n. 1, p. 70–9, mar. 2007.
- BÜHRER-SÉKULA, S. Sorologia PGL-I na hanseníase. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. SUPPL. 2, p. 3–5, 2008.
- CARDONA-CASTRO, N. et al. Identification and comparison of *Mycobacterium leprae* genotypes in two geographical regions of Colombia. **Leprosy review**, v. 80, n. 3, p. 316–21, set. 2009a.
- CARDONA-CASTRO, N. et al. Identification and comparison of *Mycobacterium leprae* genotypes in two geographical regions of Colombia. **Leprosy review**, v. 80, n. 3, p. 316–21, set. 2009b.
- CARDONA-CASTRO, N. et al. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA in nine-banded armadillos (*Dasypus novemcinctus*) from the Andean region of Colombia. **Leprosy review**, v. 80, n. 4, p. 424–31, dez. 2009c.
- CARDONA-CASTRO, N. et al. *Mycobacterium leprae* in Colombia described by SNP7614 in gyrA, two minisatellites and geography. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 14, p. 375–382, mar. 2013.
- CARDOSO, L. P. V et al. Development of a quantitative rapid diagnostic test for multibacillary leprosy using smart phone technology. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, n. 497, p. 1–10, 2013.
- CHEHL, S.; JOB, C. K.; HASTINGS, R. C. Transmission of leprosy in nude mice. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, [s. l.], v. 34, n. 6, p. 1161–6, 1985
- CLARK-CURTISS, J. E.; DOCHERTY, M. A. A species-specific repetitive sequence in *Mycobacterium leprae* DNA. **The Journal of infectious diseases**, v. 159, n. 1, p. 7–15, jan. 1989.
- CLARK, B. M. et al. Case-control study of armadillo contact and Hansen's disease. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 78, n. 6, p. 962–7, jun. 2008.
- COLE, S. T. et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. **Nature**, v. 409, n. 6823, p. 1007–1011, 22 fev. 2001.
- CURTISS, R. et al. Leprosy research in the post-genome era. **Leprosy review**, v. 72, n. 1, p. 8–22, mar. 2001.

DA SILVA, M. B. et al. Evidence of zoonotic leprosy in Pará, Brazilian Amazon, and risks associated with human contact or consumption of armadillos. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 6, p. e0006532, 28 jun. 2018.

DE BEER, J. L. et al. Optimization of Standard In-House 24-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Typing for *Mycobacterium tuberculosis* and Its Direct Application to Clinical Material. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 1338–1342, 1 maio 2014.

DEPS, P. D.; SANTOS, A. R.; YAMASHITA-TOMIMORI, J. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA by PCR in blood sample from nine-banded armadillo: preliminary results. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association**, v. 70, n. 1, p. 34–5, mar. 2002.

DEPS, P. D. et al. Epidemiological features of the leprosy transmission in relation to armadillo exposure. **Hansenologia Internationalis (Online)**, v. 28, n. 2, p. 138–144, 2003.

DEPS, P. D.; ANTUNES, J. M. A. DE P.; TOMIMORI-YAMASHITA, J. Detection of *Mycobacterium leprae* infection in wild nine-banded armadillos (*Dasypus novemcinctus*) using the rapid ML Flow test. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 1, p. 86–7, 2007.

DEPS, P. D. et al. Contact with armadillos increases the risk of leprosy in Brazil: a case control study. **Indian journal of dermatology, venereology and leprology**, v. 74, n. 4, p. 338–42, 2008a.

DEPS, P. D. et al. Research regarding anti-PGL-I antibodies by ELISA in wild armadillos from Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41 Suppl 2, p. 73–6, 2008b.

DEVIDES, A. C. et al. Can anti-PGL-1 and anti-NDO-LID-1 antibody titers be used to predict the risk of reactions in leprosy patients? **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 91, n. 3, p. 260–265, jul. 2018.

DOMOZYCH, R. et al. Increasing incidence of leprosy and transmission from armadillos in Central Florida: A case series. **JAAD case reports**, v. 2, n. 3, p. 189–92, maio 2016.

DONOGHUE, H.D.SPIGELMAN, M.HOLTON, J. PCR primers that can detect low levels of *Mycobacterium leprae* DNA. **Journal of Medical Microbiology**, v. 50, n. 2, p. 177–182, 1 fev. 2001.

DUTHIE, M. S. et al. Use of Protein Antigens for Early Serological Diagnosis of Leprosy. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 11, p. 1400–1408, 1 nov. 2007.

DUTHIE, M. S. et al. Insight toward Early Diagnosis of Leprosy through Analysis of the Developing Antibody Responses of *Mycobacterium leprae* -Infected Armadillos. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 18, n. 2, p. 254–259, fev. 2011.

DUTHIE, M. S. et al. Rapid quantitative serological test for detection of infection with *Mycobacterium leprae*, the causative agent of leprosy. **Journal of clinical microbiology**, v. 52, n. 2, p. 613–9, fev. 2014.

ENCARNAÇÃO, C. D. da.. Contribuição à ecologia dos tatus (*Xenarthra*, Dasypodidae) da Serra da Canastra, Minas Gerais. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1987.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E. Using allele frequencies and geographic subdivision to reconstruct gene trees within a species: molecular variance parsimony. **Genetics**, v. 136, n. 1, p. 343–59, jan. 1994.

EYBPOOSH, S. et al. Molecular epidemiology of infectious diseases. **Electronic physician**, v. 9, n. 8, p. 5149–5158, ago. 2017.

FERREIRA, J. DA S. et al. Ticks as potential vectors of *Mycobacterium leprae*: Use of tick cell lines to culture the bacilli and generate transgenic strains. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 12, p. e0007001, 19 dez. 2018.

FERREIRA MARÇAL, P. H. et al. Utility of immunoglobulin isotypes against LID-1 and NDO-LID for, particularly IgG1, confirming the diagnosis of multibacillary leprosy. **Mem Inst Oswaldo Cruz Rio de Janeiro**, v. 113, n. 5, 2018.

FONTES, A. N. B. et al. Genetic diversity of *Mycobacterium leprae* isolates from Brazilian leprosy patients. **Leprosy review**, v. 80, n. 3, p. 302–15, set. 2009.

FONTES, A. N. B. et al. Genotyping of *Mycobacterium leprae* present on Ziehl-Neelsen-stained microscopic slides and in skin biopsy samples from leprosy patients in different geographic regions of Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, p. 143–9, dez. 2012.

FONTES, A. N. B. et al. Genotyping of *Mycobacterium leprae* for better understanding of leprosy transmission in Fortaleza, Northeastern Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 12, p. e0006117, 15 dez. 2017.

FOSS, N. T. Hanseníase: aspectos clínicos, imunológicos e terapêuticos. **Anais brasileiros de imunologia**, v. 74, n. 2, 1999.

FRADE, M. A. C. et al. Unexpectedly high leprosy seroprevalence detected using a random surveillance strategy in midwestern Brazil: A comparison of ELISA and a rapid diagnostic test. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 2, p. e0005375, 23 fev. 2017.

FROTA, C. C. et al. *Mycobacterium leprae* in six-banded (*Euphractus sexcinctus*) and nine-banded armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in Northeast Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107 Suppl, p. 209–13, dez. 2012.

GARDNER, A. L. **Mammals of South America. Volume 1, Marsupials, xenarthrans, shrews, and bats.** [s.l.] University of Chicago Press, 2008.

GELUK, A. Challenges in immunodiagnostic tests for leprosy. **Expert Opinion on Medical Diagnostics**, v. 7, n. 3, p. 265–274, 28 maio 2013.

GROATHOUSE, N. A. et al. Multiple polymorphic loci for molecular typing of strains of *Mycobacterium leprae*. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 4, p. 1666–72, abr. 2004.

GROSSI, M. A. DE F. et al. A influência do teste sorológico ML Flow na classificação da hanseníase. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. suppl 2, p. 34–38, 2008.

HAMPSON, S. J. et al. DNA probes demonstrate a single highly conserved strain of *Mycobacterium avium* infecting aids patients. **The Lancet**, v. 333, n. 8629, p. 65–68, 14 jan. 1989.

HAN, X. Y. et al. A New *Mycobacterium* Species Causing Diffuse Lepromatous Leprosy. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 130, n. 6, p. 856–864, 1 dez. 2008.

HAN, X. Y. et al. The leprosy agents *Mycobacterium lepromatosis* and *Mycobacterium leprae* in Mexico. **International journal of dermatology**, v. 51, n. 8, p. 952–9, ago. 2012.

HAN, X. Y.; JESSURUN, J. Severe Leprosy Reactions Due to *Mycobacterium lepromatosis*. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 345, n. 1, p. 65–69, jan. 2013.

HANSEN, G. Investigations concerning the etiology of leprosy. **Norsk Mag Laegervidenskaben**. Steen: Christiania, 1874.

HE, Z.-X. et al. Development of a Lateral Flow Immunoassay for the Rapid Diagnosis of Invasive Candidiasis. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1451, 13 set. 2016.

HOFFMANN, C. et al. Disclosure of the mycobacterial outer membrane: cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 10, p. 3963–7, 11 mar. 2008.

HONAP, T. P. et al. *Mycobacterium leprae* genomes from naturally infected nonhuman primates. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 1, p. e0006190, 2018.

HOUSMAN, G. et al. Validation of qPCR Methods for the Detection of *Mycobacterium* in New World Animal Reservoirs. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 11, p. e0004198, nov. 2015.

HUNGRIA, E. M. et al. Can baseline ML Flow test results predict leprosy reactions? An investigation in a cohort of patients enrolled in the uniform multidrug therapy clinical trial for leprosy patients in Brazil. **Infectious diseases of poverty**, v. 5, n. 1, p. 110, 6 dez. 2016.

HUNTER, P. R.; GASTON, M. A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. **Journal of clinical microbiology**, v. 26, n. 11, p. 2465–6, nov. 1988.

ILLARRAMENDI, X. et al. Cutaneous lesions sensory impairment recovery and nerve regeneration in leprosy patients. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. suppl 1, p. 68–73, dez. 2012.

JAGIELSKI, T. et al. Methodological and Clinical Aspects of the Molecular Epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* and Other *Mycobacteria*. **Clinical microbiology reviews**, v. 29, n. 2, p. 239–90, abr. 2016.



JOB, C. K. Developments in experimental leprosy. **Indian journal of leprosy**, v. 72, n. 1, p. 143–54, 2000.

JOB, C. K. et al. Transmission of leprosy: a study of skin and nasal secretions of household contacts of leprosy patients using PCR. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 78, n. 3, p. 518–21, mar. 2008.

JOSEPH, B. Z.; YODER, L. J.; JACOBSON, R. R. Hansen's disease in native-born citizens of the United States. **Public health reports (Washington, D.C. : 1974)**, v. 100, n. 6, p. 666–71, 1985.

KAMPIRAPAP, K. et al. DNA amplification for detection of leprosy and assessment of efficacy of leprosy chemotherapy. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association**, v. 66, n. 1, p. 16–21, mar. 1998.

KAPLAN, G.; COHN, Z. A. Regulation of cell-mediated immunity in lepromatous leprosy. **Leprosy review**, v. 57 Suppl 2, p. 199–202, dez. 1986.

KATOCH, V. M. Newer diagnostic techniques for tuberculosis. **The Indian journal of medical research**, v. 120, n. 4, p. 418–28, out. 2004.

KEIM, P. et al. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. **Journal of bacteriology**, v. 182, n. 10, p. 2928–36, maio 2000.

KERR-PONTES, L. R. et al. Socioeconomic, environmental, and behavioural risk factors for leprosy in North-east Brazil: results of a case–control study. **International Journal of Epidemiology**, v. 35, n. 4, p. 994–1000, 1 ago. 2006.

KERR, L. et al. Human-armadillo interaction in Ceará, Brazil: Potential for transmission of *Mycobacterium leprae*. **Acta tropica**, v. 152, p. 74–79, dez. 2015.

KIMURA, M. et al. Rapid variable-number tandem-repeat genotyping for *Mycobacterium leprae* clinical specimens. **Journal of clinical microbiology**, v. 47, n. 6, p. 1757–66, jun. 2009.

KIRCHHEIMER, W. F.; STORRS, E. E. Attempts to establish the armadillo (*Dasypus novemcinctus* Linn.) as a model for the study of leprosy. I. Report of lepromatoid leprosy in an experimentally infected armadillo. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association**, v. 39, n. 3, p. 693–702, 1971.

KLEVYTSKA, A. M. et al. Identification and characterization of variable-number tandem repeats in the *Yersinia pestis* genome. **Journal of clinical microbiology**, v. 39, n. 9, p. 3179–85, set. 2001.

KURUWA, S.; VISSA, V.; MISTRY, N. Distribution of *Mycobacterium leprae* Strains among Cases in a Rural and Urban Population of Maharashtra, India. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 1406–1411, 1 abr. 2012.

LAGUNA, A. F. **El cachicamo sabanero : aspectos de su biología y ecología**. Caracas: Fondo Editorial Acta Científica Venezolana, 1984.

LAHIRI, R.; RANDHAWA, B.; KRAHENBUHL, J.. Application of a viability-staining method for *Mycobacterium leprae* derived from the athymic (nu/nu) mouse foot pad. **Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 54, n. 3, p. 235–242, 2005.

LANCEFIELD, R. C. The antigenic complex of *Streptococcus haemolyticus*: i. Demonstration of a type-specific substance in extracts of *Streptococcus haemolyticus*. **The Journal of experimental medicine**, v. 47, n. 1, p. 91–103, 1 jan. 1928.

LASTÓRIA, J. C. et al. Leprosy: review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects - Part 1. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 89, n. 2, p. 205–218, abr. 2014.

LAVANIA, M. et al. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA from soil samples by PCR targeting RLEP sequences. **The Journal of communicable diseases**, v. 38, n. 3, p. 269–73, mar. 2006.

LAVANIA, M. et al. Predominance of three copies of tandem repeats in rpoT gene of *Mycobacterium leprae* from Northern India. **Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 7, n. 5, p. 627–31, set. 2007.

LAVANIA, M. et al. Detection of viable *Mycobacterium leprae* in soil samples: insights into possible sources of transmission of leprosy. **Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 8, n. 5, p. 627–631, 2008.

LAVANIA, M. et al. Molecular typing of *Mycobacterium leprae* strains from northern India using short tandem repeats. **The Indian journal of medical research**, v. 133, p. 618–26, jun. 2011.

LAVANIA, M. et al. Genotyping of *Mycobacterium leprae* strains from a region of high endemic leprosy prevalence in India. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 36, p. 256–261, dez. 2015.

LIMA, L. N. C. et al. Genotyping comparison of *Mycobacterium leprae* isolates by VNTR analysis from nasal samples in a Brazilian endemic region. **Pathogens and Global Health**, v. 112, n. 2, p. 79–85, 17 fev. 2018.

LOBATO, L. S. et al. Statins increase rifampin mycobactericidal effect. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 10, p. 5766–74, out. 2014.

LOW, D. A. et al. Isolation and comparison of *Escherichia coli* strains from canine and human patients with urinary tract infections. **Infection and immunity**, v. 56, n. 10, p. 2601–9, out. 1988.

MAIDEN, M. C. et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 6, p. 3140–5, 17 mar. 1998.

MANUEL ABBA, A.; SUPERINA, M. The 2009/2010 Armadillo Red List Assessment. **Edentata**, v. 12, n. 2, p. 135–184, 1 dez. 2010.

MARÇAL, P. H. F. et al. Utility of immunoglobulin isotypes against LID-1 and NDO-LID for, particularly IgG1, confirming the diagnosis of multibacillary leprosy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 5, p. e170467, 26 fev. 2018.

MARTELLI, C. M. et al. Single lesion paucibacillary leprosy: baseline profile of the Brazilian Multicenter Cohort Study. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association**, v. 68, n. 3, p. 247–57, set. 2000.

MARTINEZ, A. N. et al. Evaluation of Real-Time and Conventional PCR Targeting Complex 85 Genes for Detection of *Mycobacterium leprae* DNA in Skin Biopsy Samples from Patients Diagnosed with Leprosy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 9, p. 3154–3159, 1 set. 2006.

MARTINEZ, A. N. et al. Molecular Determination of *Mycobacterium leprae* Viability by Use of Real-Time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 7, p. 2124–2130, 1 jul. 2009.

MARTINEZ, A. N. et al. Evaluation of qPCR-Based assays for leprosy diagnosis directly in clinical specimens. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 10, 2011.

MARTINEZ, A. N. et al. PCR-based techniques for leprosy diagnosis: from the laboratory to the clinic. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 4, p. e2655, abr. 2014.

MARTINS, K. et al. *Trypanosoma cruzi* III causing the indeterminate form of Chagas disease in a semi-arid region of Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 39, p. 68–75, out. 2015.

MATSUOKA, M. et al. *Mycobacterium leprae* typing by genomic diversity and global distribution of genotypes. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association**, v. 68, n. 2, p. 121–8, 2000.

MCBEE, K.; BAKER, R. J. *Dasypus novemcinctus*. **Mammalian Species**, n. 162, p. 1, 25 maio 1982.

MEDRI, Í. M. Ecologia e história natural do tatu-peba, *Euphractus sexcinctus* (Linnaeus, 1758), no Pantanal da Nhecolândia, Mato Grosso do Sul. 2008.

MEDRI, Í. M. et al. Ticks (Acari: Ixodidae) from yellow armadillo, *Euphractus sexcinctus* (Cingulata: Dasypodidae), in Brazil's Pantanal wetlands. **Neotropical Entomology**, v. 39, n. 5, p. 823–825, out. 2010.

MILKMAN, R. Electrophoretic variation in *Escherichia coli* from natural sources. **Science (New York, N.Y.)**, v. 182, n. 4116, p. 1024–6, 7 dez. 1973.

MOHANTY, P. et al. Viability of *Mycobacterium leprae* in the environment and its role in leprosy dissemination. **Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology**, v. 82, n. 1, p. 23, 2016.

MONOT, M. et al. On the origin of leprosy. **Science (New York, N.Y.)**, v. 308, n. 5724, p. 1040–2, 13 maio 2005.

MONOT, M. et al. Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. **Nature genetics**, v. 41, n. 12, p. 1282–9, 1 dez. 2009.

MORENO, C. M. DA C.; ENDERS, B. C.; SIMPSON, C. A. Avaliação das capacitações de hanseníase: opinião de médicos e enfermeiros das equipes de saúde da família. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 61, n. spe, p. 671–675, nov. 2008.

MOURA, R. S. DE et al. Leprosy serology using PGL-I: a systematic review. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41 Suppl 2, p. 11–8, 2008.

NAVES, M. M. et al. Contribution of Nasal Biopsy to Leprosy Diagnosis. **American Journal of Rhinology & Allergy**, v. 23, n. 2, p. 177–180, mar. 2009.

NOBRE, M. L. et al. Human migration, railways and the geographic distribution of leprosy in Rio Grande do Norte State--Brazil. **Leprosy review**, v. 86, n. 4, p. 335–44, dez. 2015.

OLI, M. K. et al. Dynamics of leprosy in nine-banded armadillos: Net reproductive number and effects on host population dynamics. **Ecological Modelling**, v. 350, p. 100–108, 24 abr. 2017.

OPROMOLLA, PA, MARTELLI, A. Terminology related to Hansen's disease. . **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v 80, n 3, p.293-294, 2005.

PEDRINI, S. C. B. et al. Search for *Mycobacterium leprae* in wild mammals. **The Brazilian journal of infectious diseases: an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 47–53, 2010.

PHETSUKSIRI, B. et al. SNP genotypes of *Mycobacterium leprae* isolates in Thailand and their combination with rpoT and TTC genotyping for analysis of leprosy distribution and transmission. **Japanese journal of infectious diseases**, v. 65, n. 1, p. 52–6, 2012.

PLIKAYTIS, B. B.; GELBER, R. H.; SHINNICK, T. M. Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium leprae* using a nested-primer gene amplification assay. **Journal of clinical microbiology**, v. 28, n. 9, p. 1913–7, set. 1990.

REECE, S. T. et al. ML0405 and ML2331 Are Antigens of *Mycobacterium leprae* with Potential for Diagnosis of Leprosy. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 13, n. 3, p. 333–340, 1 mar. 2006.

REES, R.J.W. The microbiology of leprosy. In: HASTING, R.C (ED.). New York: Churchill Livingstone, p.31-52, 1985

REIS, N. R. NELIO R. et al. Mamíferos do Brasil. Londrina, p.347-406, 2006.

RICHARDUS, J. H. et al. Incidence of acute nerve function impairment and reactions in leprosy: a prospective cohort analysis after 5 years of follow-up. **International Journal of Epidemiology**, v. 33, n. 2, p. 337–343, 1 abr. 2004.

- RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association**, v. 34, n. 3, p. 255–73, 1966.
- ROBBINS, G. et al. Ancient Skeletal Evidence for Leprosy in India (2000 B.C.). **PLoS ONE**, v. 4, n. 5, p. e5669, 27 maio 2009.
- ROUSE, J.W., R.H. Haas, J.A. Schell, and D.W. Deering, Monitoring vegetation systems in the Great Plains with ERTS, In: S.C. Freden, E.P. Mercanti, and M. Becker (eds) Third Earth Resources Technology Satellite–1 Symposium. Volume I: Technical Presentations, NASA SP-351, NASA, Washington, D.C., pp. 309-317, 1974.
- ROSNER, B. Fundamentals of biostatistics (7th ed.). Boston, MA: Brooks/Cole, 2011.
- SAEED, A. F.; WANG, R.; WANG, S. Microsatellites in Pursuit of Microbial Genome Evolution. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1462, 5 jan. 2016.
- SAKAMURI, R. M. et al. A continuation: study and characterisation of *Mycobacterium leprae* short tandem repeat genotypes and transmission of leprosy in Cebu, Philippines. **Leprosy review**, v. 80, n. 3, p. 272–9, set. 2009a.
- SAKAMURI, R. M. et al. Population-Based Molecular Epidemiology of Leprosy in Cebu, Philippines. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 9, p. 2844–2854, 1 set. 2009b.
- SALGADO, C. G. et al. High anti-phenolic glycolipid-I IgM titers and hidden leprosy cases, Amazon region. **Emerging infectious diseases**, v. 18, n. 5, p. 889–90, maio 2012.
- SALIPANTE, S. J.; HALL, B. G. Towards the molecular epidemiology of *Mycobacterium leprae*: Strategies, successes, and shortcomings. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, n. 7, p. 1505–1513, out. 2011a.
- SALIPANTE, S. J.; HALL, B. G. Inadequacies of Minimum Spanning Trees in Molecular Epidemiology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 10, p. 3568–3575, 1 out. 2011b.
- SANI, M. et al. Direct visualization by cryo-EM of the mycobacterial capsular layer: a labile structure containing ESX-1-secreted proteins. **PLoS pathogens**, v. 6, n. 3, p. e1000794, 5 mar. 2010.
- SANTOS, A. R. et al. Method for high yield preparation in large and small scale of nucleic acids from mycobacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 15, n. 2, p. 83–94, 1 abr. 1992.
- SCHMITT, J. V. et al. Armadillo meat intake was not associated with leprosy in a case control study, Curitiba (Brazil). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 7, p. 857–862, nov. 2010.
- SCHUENEMANN, V. J. et al. Genome-Wide Comparison of Medieval and Modern *Mycobacterium leprae*. **Science**, v. 341, n. 6142, 2013.
- SCOLLARD, D. M. et al. The continuing challenges of leprosy. **Clinical microbiology reviews**, v. 19, n. 2, p. 338–81, 1 abr. 2006.

SHARMA, R. et al. The armadillo: a model for the neuropathy of leprosy and potentially other neurodegenerative diseases. **Disease models & mechanisms**, v. 6, n. 1, p. 19–24, jan. 2013.

SHARMA, R. et al. Zoonotic Leprosy in the Southeastern United States. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 12, p. 2127–34, dez. 2015.

SHARMA, R. et al. Differential growth of *Mycobacterium leprae* strains (SNP genotypes) in armadillos. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 62, p. 20–26, ago. 2018.

SHEPARD, C. C. The Experimental Disease That Follows The Injection Of Human Leprosy Bacilli Into Foot-Pads Of Mice. **The Journal of experimental medicine**, v. 112, n. 3, p. 445–54, 1 set. 1960.

SHEPARD, C. C. Multiplication of *Mycobacterium leprae* in the foot-pad of the mouse. **International journal of Leprosy**, v. 30, p. 291–306, 1962.

SHEPARD, C. C. Temperature optimum of *Mycobacterium leprae* in mice. **Journal of bacteriology**, v. 90, n. 5, p. 1271–5, nov. 1965.

SHIMIZU, Y. Liver in systemic disease. **World journal of gastroenterology**, v. 14, n. 26, p. 4111–9, 14 jul. 2008.

SHINDE, V. et al. VNTR typing of *Mycobacterium leprae* in South Indian leprosy patients. **Leprosy review**, v. 80, n. 3, p. 290–301, set. 2009.

SILVA, D. R. X. et al. [Hansen's disease, social conditions, and deforestation in the Brazilian Amazon]. **Revista panamericana de salud publica = Pan American journal of public health**, v. 27, n. 4, p. 268–75, abr. 2010.

SILVA, A. B. S. DA et al. Hepatic steatosis in six-banded armadillo (*Euphractus sexcinctus* Linnaeus, 1758). **Biota Neotropica**, v. 18, n. 1, 1 fev. 2018.

SINGH, P. et al. Insight into the evolution and origin of leprosy bacilli from the genome sequence of *Mycobacterium lepromatosis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 14, p. 4459–64, 7 abr. 2015.

SINGH, P.; COLE, S. T. *Mycobacterium leprae*: genes, pseudogenes and genetic diversity. **Future microbiology**, v. 6, n. 1, p. 57–71, jan. 2011.

SMITH, J. H. et al. Leprosy in wild armadillos (*Dasypus novemcinctus*) of the Texas Gulf Coast: epidemiology and mycobacteriology. **Journal of the Reticuloendothelial Society**, v. 34, n. 2, p. 75–88, ago. 1983.

SOUZA-FILHO, C. R. O relevo das Américas como nunca antes visto. MundoGEO. Disponível em: <https://mundogeo.com/blog/2003/12/18/o-relevo-das-americas-como-nunca-antes-visto/> 18 de dezembro de 2003. Acesso em: 22 abr. 2019

SPENCER, J. S. et al. Identification of serological biomarkers of infection, disease progression and treatment efficacy for leprosy. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107 Suppl 1, p. 79–89, dez. 2012.

SRISUNGNAM, S. et al. Molecular epidemiology of leprosy based on VNTR typing in Thailand. **Leprosy review**, v. 80, n. 3, p. 280–9, set. 2009.

STEFANI, M. M. DE A. Challenges in the post genomic era for the development of tests for leprosy diagnosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41 Suppl 2, p. 89–94, 2008.

STEFANI, M. M. A. et al. Leprosy survey among rural communities and wild armadillos from Amazonas state, Northern Brazil. **PLOS ONE**, v. 14, n. 1, p. e0209491, 10 jan. 2019.

SUPPLY, P. et al. Proposal for Standardization of Optimized Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable-Number Tandem Repeat Typing of Mycobacterium tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 12, p. 4498–4510, 1 dez. 2006.

TEIXEIRA, A. S. et al. Not Seeing the Forest for the Trees: Size of the Minimum Spanning Trees (MSTs) Forest and Branch Significance in MST-Based Phylogenetic Analysis. **PLOS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0119315, 23 mar. 2015.

THIRUNAVUKKARASU, S. et al. Applying the One Health Concept to Mycobacterial Research - Overcoming Parochialism. **Zoonoses and Public Health**, v. 64, n. 6, p. 401–422, set. 2017.

TIÓ-COMA, M. et al. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA in soil: multiple needles in the haystack. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 3165, 28 dez. 2019.

TOLEDO-PINTO, T. **Instituto Oswaldo Cruz Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <[https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/12065/1/thiago\\_pinto\\_ioc\\_mest\\_2013.pdf](https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/12065/1/thiago_pinto_ioc_mest_2013.pdf)>. Acesso em: 6 abr. 2019.

TRAUTMAN, J. R. A brief history of Hansen's disease. **Bulletin of the New York Academy of Medicine**, v. 60, n. 7, p. 689–95, set. 1984.

TRUMAN, R. W. et al. Evaluation of the origin of *Mycobacterium leprae* infections in the wild armadillo, *Dasypus novemcinctus*. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 35, n. 3, p. 588–93, maio 1986a.

TRUMAN, R. W. et al. Evaluation of monitoring antibodies to PGL-I in armadillos experimentally infected with *M. leprae*. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association**, v. 54, n. 4, p. 556–9, dez. 1986b.

TRUMAN, R. W.; JOB, C. K.; HASTINGS, R. C. Antibodies to the phenolic glycolipid-1 antigen for epidemiologic investigations of enzootic leprosy in armadillos (*Dasypus novemcinctus*). **Leprosy review**, v. 61, n. 1, p. 19–24, mar. 1990.

TRUMAN, R. W. et al. Seasonal and spatial trends in the detectability of leprosy in wild armadillos. **Epidemiology and infection**, v. 106, n. 3, p. 549–60, jun. 1991.

TRUMAN RW, SANCHEZ RM. Armadillos: models for leprosy. **Laboratory Animal** 22: 28-32, 1993.

TRUMAN, R. W.; KRAHENBUHL, J. L. Viable *M. leprae* as a research reagent. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association**, v. 69, n. 1, p. 1–12, mar. 2001.

TRUMAN, R. et al. Genotypic variation and stability of four variable-number tandem repeats and their suitability for discriminating strains of *Mycobacterium leprae*. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 6, p. 2558–65, jun. 2004.

TRUMAN, R. Armadillos as a Source of Infection for Leprosy. **Southern Medical Journal**, v. 101, n. 6, p. 581–582, jun. 2008.

TRUMAN, R.; FINE, P. E. M. “Environmental” sources of *Mycobacterium leprae*: issues and evidence. **Leprosy review**, v. 81, n. 2, p. 89–95, jun. 2010.

TRUMAN, R. W. et al. Enumeration of *Mycobacterium leprae* Using Real-Time PCR. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 11, p. e328, 4 nov. 2008.

TRUMAN, R. W. et al. Probable Zoonotic Leprosy in the Southern United States. **New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 17, p. 1626–1633, 28 abr. 2011.

TRYLAND, M. et al. Persistence of antibodies in blood and body fluids in decaying fox carcasses, as exemplified by antibodies against *Microsporium canis*. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 48, n. 1, p. 10, 21 jun. 2006.

TURANKAR, R. et al. Presence of viable *Mycobacterium leprae* in environmental specimens around houses of leprosy patients. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 34, n. 3, p. 315, 2016.

TURANKAR, R. P. et al. Dynamics of *Mycobacterium leprae* transmission in environmental context: Deciphering the role of environment as a potential reservoir. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 1, p. 121–126, jan. 2012.

TURANKAR, R. P. et al. Single nucleotide polymorphism-based molecular typing of *M. leprae* from multicase families of leprosy patients and their surroundings to understand the transmission of leprosy. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 3, p. O142–O149, mar. 2014.

TURANKAR, R. P. et al. Comparative evaluation of PCR amplification of RLEP, 16S rRNA, rpoT and Sod A gene targets for detection of *M. leprae* DNA from clinical and environmental samples. **International Journal of Mycobacteriology**, v. 4, n. 1, p. 54–59, mar. 2015.

VAN DER ZANDEN, A. G. et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex in paraffin wax embedded tissues and in stained microscopic preparations. **Molecular pathology : MP**, v. 51, n. 4, p. 209–14, ago. 1998.

VAN EMBDEN, J. D. et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. **Journal of clinical microbiology**, v. 31, n. 2, p. 406–9, fev. 1993.



VERA-CABRERA, L. et al. Case of diffuse lepromatous leprosy associated with *Mycobacterium lepromatosis* ; **Journal of clinical microbiology**, v. 49, n. 12, p. 4366–8, dez. 2011.

VINEIS, P. Commentary: First steps in molecular epidemiology: Lower et al. 1979. **International Journal of Epidemiology**, v. 36, n. 1, p. 20–22, 1 fev. 2007.

WALSH, G. P. et al. Leprosy-like disease occurring naturally in armadillos. **Journal of the Reticuloendothelial Society**, v. 18, n. 6, p. 347–51, dez. 1975.

WALSH, G. P.; MEYERS, W. M.; BINFORD, C. H. Naturally acquired leprosy in the nine-banded armadillo: a decade of experience 1975-1985. **Journal of leukocyte biology**, v. 40, n. 5, p. 645–56, nov. 1986.

WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic acids research**, v. 18, n. 24, p. 7213–8, 25 dez. 1990.

WENG, X. et al. Identification and distribution of *Mycobacterium leprae* genotypes in a region of high leprosy prevalence in China: a 3-year molecular epidemiological study. **Journal of clinical microbiology**, v. 45, n. 6, p. 1728–34, 1 jun. 2007.

WENG, X. et al. Transmission of leprosy in Qiubei County, Yunnan, China: insights from an 8-year molecular epidemiology investigation. **Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 11, n. 2, p. 363–74, mar. 2011.

WENG, X. et al. Molecular, ethno-spatial epidemiology of leprosy in China: novel insights for tracing leprosy in endemic and non endemic provinces. **Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 14, p. 361–8, mar. 2013.

WHEAT, W. H. et al. Long-term survival and virulence of *Mycobacterium leprae* in amoebal cysts. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 12, p. e3405, dez. 2014.

WHO, 2016. **Global Leprosy Strategy 2016–2020**.

WHO, 2018. WHO | Weekly Epidemiological Record, 31 August 2018, vol. 93, 35 (pp. 444–456). **WHO**, 2018.

WOODS, S. A.; COLE, S. T. A family of dispersed repeats in *Mycobacterium leprae*. **Molecular microbiology**, v. 4, n. 10, p. 1745–51, out. 1990.

XING, Y. et al. VNTR typing studies of *Mycobacterium leprae* in China: assessment of methods and stability of markers during treatment. **Leprosy review**, v. 80, n. 3, p. 261–71, set. 2009.

YAN, W. et al. Application of RLEP Real-Time PCR for Detection of *M. leprae* DNA in Paraffin-Embedded Skin Biopsy Specimens for Diagnosis of Paucibacillary Leprosy. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 3, p. 524, 2014.

YOUNG, S. K. et al. Use of short tandem repeat sequences to study *Mycobacterium leprae* in leprosy patients in Malawi and India. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 2, n. 4, p. e214, 9 abr. 2008.

ZUMARRAGA, M. J. et al. PCR-restriction fragment length polymorphism analysis (PRA) of *Mycobacterium leprae* from human lepromas and from a natural case of an armadillo of Corrientes, Argentina. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association**, v. 69, n. 1, p. 21–5, mar. 2001.

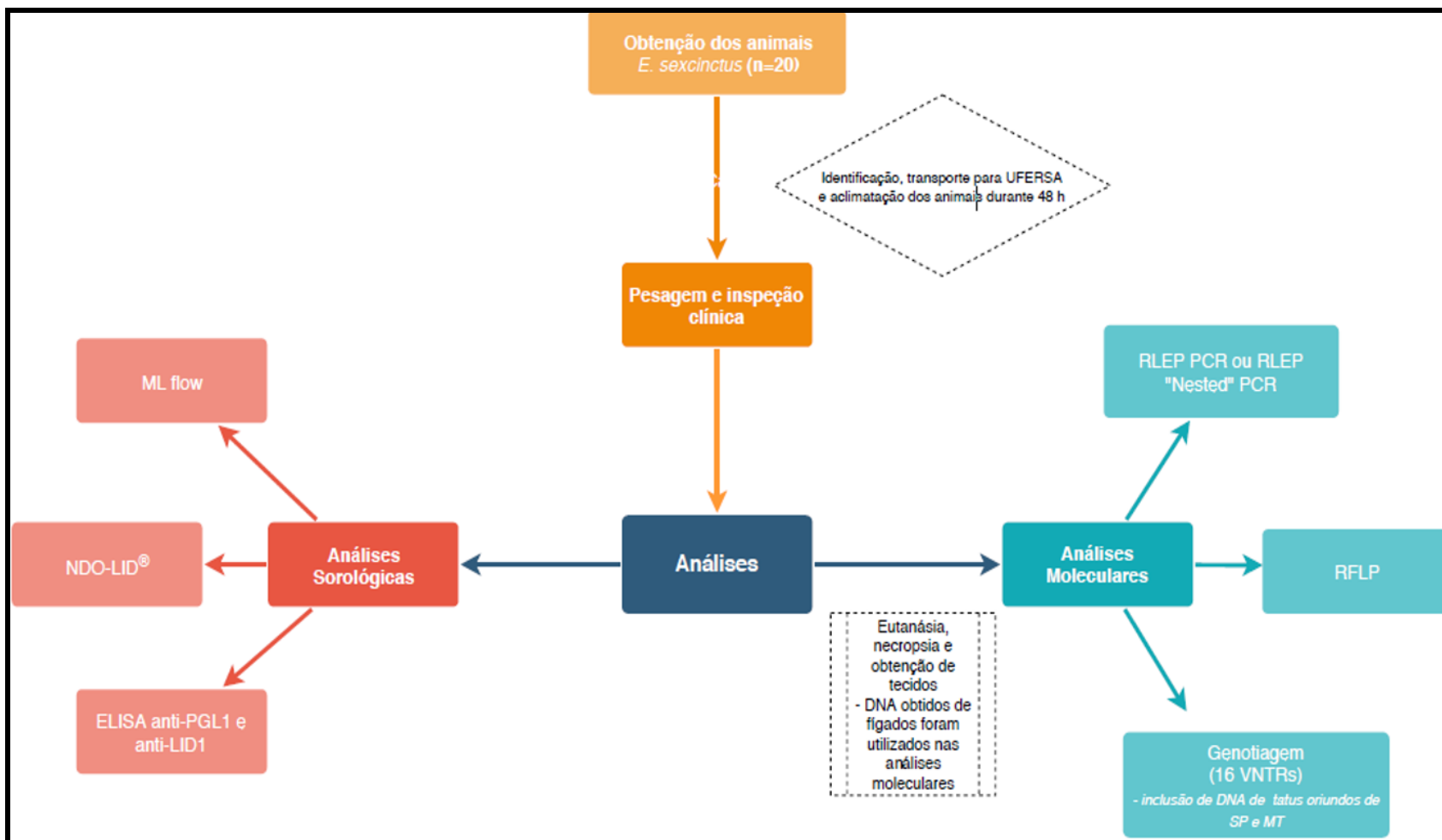
# ANEXOS

**A – Tabela de municípios e localidades de coleta dos tatus *Euphractus sexcinctus***

**Tabela 13:** Municípios e localidades de coletas dos tatus analisados no estudo. A localização de cada ponto de obtenção individual dos animais (n = 20) é fornecida na forma de coordenadas em graus, minutos, segundos (GMS). As coletas foram realizadas em duas ocasiões separadas em 2016 com um intervalo de um mês entre as capturas.

<b>Municípios do Rio Grande do Norte</b>		<b>Coordenadas</b>	<b>Coordenadas</b>
<b>1ª expedição</b>			
<b>Pendências (mulungu)</b>	<b>T01</b>	5°19'24.1"S 36°32'05.3"W	<b>T02</b> 5°18'58.1"S 36°32'11.4"W
<b>Afonso Bezerra</b>	<b>T03</b>	5°28'47.0"S 36°31'17.9"W	<b>T04</b> 5°28'36.0"S 36°31'19.3"W
<b>Macau</b>	<b>T05</b>	5°12'31.6"S 36°33'51.9"W	<b>T06</b> 5°09'46.9"S 36°35'27.5"W
<b>Pedro Avelino</b>	<b>T07</b>	5°29'32.2"S 36°17'41.0"W	<b>T08</b> 5°29'31.1"S 36°19'03.3"W
<b>Macau</b>	<b>T09</b>	5°14'50.2"S 36°22'27.9"W	
<b>Guamaré (Baixa do meio)</b>	<b>T10</b>	5°14'36.9"S 36°21'50.6"W	
<b>Municípios do Rio Grande do Norte</b>		<b>Coordenadas</b>	<b>Coordenadas</b>
<b>2ª Expedição</b>			
<b>Pendências (mulungu)</b>	<b>T11</b>	5°18'22.7"S 36°32'32.6"W	
<b>Macau</b>	<b>T12</b>	5°15'27.4"S 36°32'12.8"W	
<b>Afonso Bezerra</b>	<b>T13</b>	5°28'05.5"S 36°32'04.1"W	<b>T14</b> 5°27'33.4"S 36°32'13.4"W
<b>Macau</b>	<b>T15</b>	5°09'34.0"S 36°35'30.5"W	<b>T16</b> 5°09'22.3"S 36°36'14.1"W
<b>Pedro Avelino</b>	<b>T17</b>	5°29'01.6"S 36°17'06.2"W	<b>T18</b> 5°29'54.4"S 36°16'21.1"W
<b>Guamaré (Baixa do meio)</b>	<b>T19</b>	5°14'09.0"S 36°21'42.2"W	<b>T20</b> 5°13'41.3"S 36°21'10.9"W

**B – Fluxograma dos procedimentos e análises realizadas com os animais, bem como com seus fragmentos de tecido (fígado)**



**Figura 37:** Fluxograma dos procedimentos e análises realizadas com os animais, bem como com seus fragmentos de tecido (fígado).

C – Fluxograma dos procedimentos de genotipagem com base em VNTRs e SNPs.

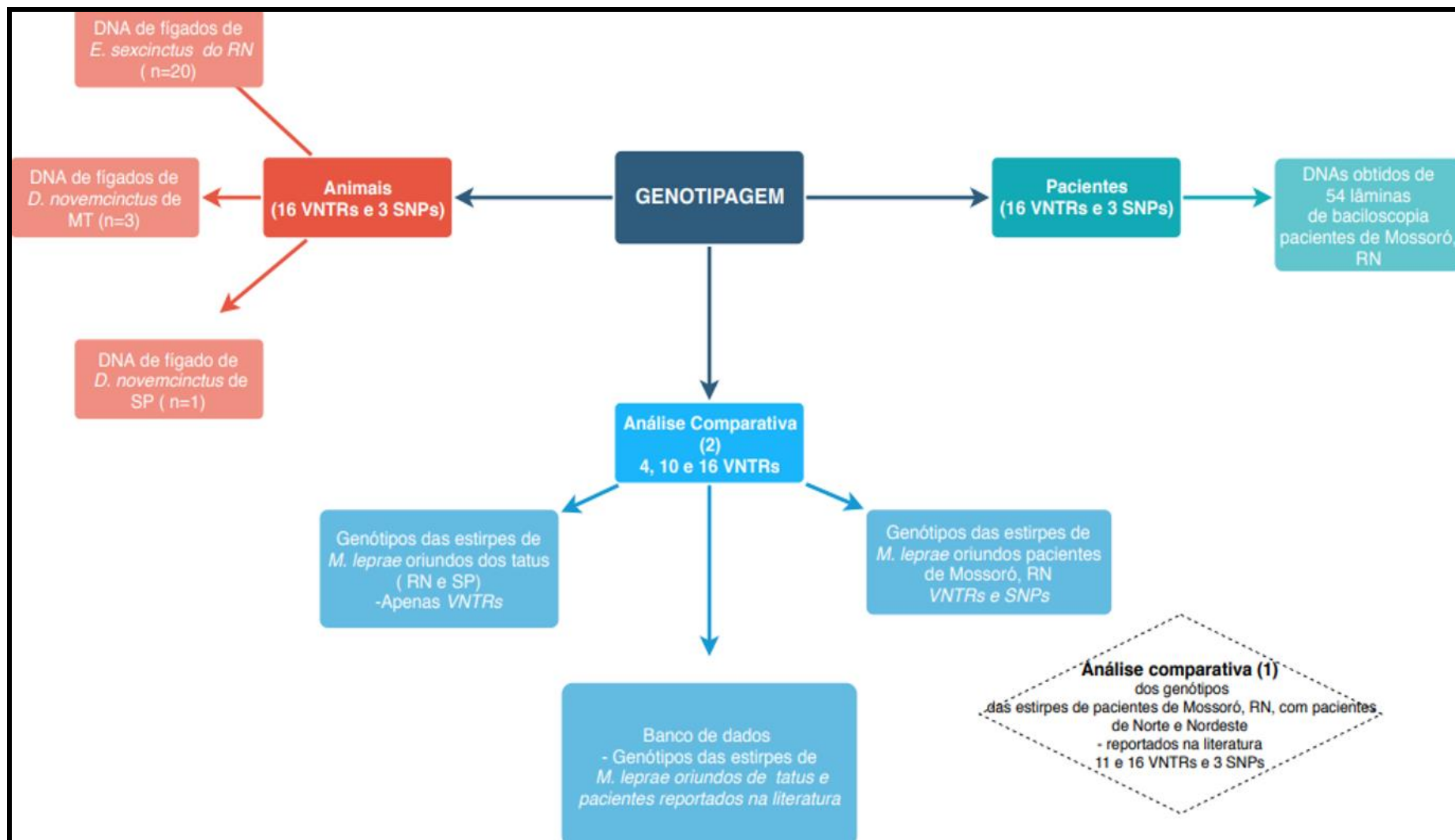


Figura 38 - Fluxograma dos procedimentos de genotipagem com base em VNTRs e SNPs.

**D – Genotipagem de isolados de *Mycobacterium leprae* de pacientes do município de Mossoró, Rio Grande Norte, Brasil, através de 16 VNTRs e 3 SNPs**

**Tabela 14:** Genotipagem de isolados de *Mycobacterium leprae* de pacientes do município de Mossoró, Rio Grande Norte, Brasil, através de 16 VNTRs e 3 SNPs (continua).

AMOSTRA	AC8b	GTA9	GGT5	AT17	6-3	21-3	AC9	AT15	AC8a	27-5	6-7	TA18	GAA21	23-3	12-5	18-8	SNP	Total de marcadores
<b>BRRNLP1<sup>a</sup></b>	7	9	4	14	3	2	8	15	9	5	6	21	12	2	4	3	4	16
<b>BRRNLP2<sup>a</sup></b>	7	10	4	13	3	2	8		9	4	6	21	11	2	5	8	3	15
<b>BRRNLP3</b>		9	4		3		8		10				12					6
<b>BRRNLP5<sup>a</sup></b>	7	11	4	11	3	2	8		11	5	6	21	13	2	4	3	4	15
<b>BRRNLP6<sup>a</sup></b>	7	9	4	12	3	2	8	15	9	5	6	22	12	2	4	3	4	16
<b>BRRNLP7<sup>a</sup></b>	7	11	4	15	3	2	8	15	9	4	6	25	11	2	4	8	3	16
<b>BRRNLP8<sup>a</sup></b>	7	11	4	11	3	2	8	24	12	5	6	20	13	2	4	3	4	16
<b>BRRNLP13<sup>a</sup></b>	7	9	4	12	3	2	8	16	8	5	6	21	14	2	4	3	4	16
<b>BRRNLP15<sup>a</sup></b>	7		4	16	3	2	7	17	8	5	6	30	15	2	4	3	4	15
<b>BRRNLP16<sup>a</sup></b>	7	9	4	12	3	2	8	17	9	5	6	22	12	2	4	3	4	16
<b>BRRNLP17</b>					3				10									2
<b>BRRNLP18</b>					3		8					26	12					4
<b>BRRNLP19<sup>a</sup></b>	7	9	4	13	3	2	8	17	9	5	6	20	12	2	4	3	4	16
<b>BRRNLP20<sup>a</sup></b>	7	13	4	14	3	2	7	17	8	5	6	23	15	2	4	3	4	16
<b>BRRNLP21</b>					3				8/9				16	2				4
<b>BRRNLP22<sup>a</sup></b>	7	11	4	13	3	2	8	16	9	4	6	18	12	2	5	8	3	16
<b>BRRNLP23<sup>a</sup></b>	8	9	4	13	3	2	7	20	8	5	6	20	15	2	4	3	4	16
<b>BRRNLP24<sup>a</sup></b>			4		3	2	8		9		6	26	13	2	4			10
<b>BRRNLP25</b>												26						1
<b>BRRNLP27<sup>a</sup></b>	7	10	4	14	3	2	7		8	5	6		12	2	4	3	4	14

**Tabela 14: Continuação**

AMOSTRA	AC8b	GTA9	GGT5	AT17	6-3	21-3	AC9	AT15	AC8a	27-5	6-7	TA18	GAA21	23-3	12-5	18-8	SNP	Total de marcadores
<b>BRRNLP28<sup>a</sup></b>		12	4	14	3	2	8		8	4	6	17	11	2			3	13
<b>BRRNLP29</b>				14	3													2
<b>BRRNLP30<sup>a</sup></b>		11		15	3	2	8	19	9			20	11	2			3	11
<b>BRRNLP31<sup>a</sup></b>		10	4	17	3	2	7		8	5	6	30	14	2	4	3	4	15
<b>BRRNLP32<sup>a</sup></b>	7	8	4	12	3	2	8	14	9				11	2	5	8	3	14
<b>BRRNLP33<sup>a</sup></b>			4	13	3	2	8		9				12	2	4	3		10
<b>BRRNLP34<sup>a</sup></b>		10	4	17	3	2	8	17	8				17	2			4	11
<b>BRRNLP35</b>													17					1
<b>BRRNLP37<sup>a</sup></b>		11	4	13	3	2	8		9	4	6	18	11	2			3	12
<b>BRRNLP38<sup>a</sup></b>	7		4	14	3	2	8	21	9	5	6	26	12	2	4	3	4	15
<b>BRRNLP39<sup>a</sup></b>		9	4	10	3	2	8		11				13		4	3	4	10
<b>BRRNLP40<sup>a</sup></b>	7	9	4	11	3	2	8	20	10				11				4	10
<b>BRRNLP41</b>				13	3				9				12					4
<b>BRRNLP43</b>					3				9					2				3
<b>BRRNLP45<sup>a</sup></b>	7	8	4	11	3	2	8	18	12			16	13	2	4	3	4	14
<b>BRRNLP46<sup>a</sup></b>		9	4	13	3	2	8	18	10	5	7	22/23	12	1	5		1/2	14
<b>BRRNLP47</b>					3	2			9							3	3	4
<b>BRRNLP48<sup>a</sup></b>		9		11	3	2	8		9			21	12	2			4	10
<b>BRRNLP49<sup>a</sup></b>		11	4	13	3	2	8		9		6	19	11	2			3	11
<b>BRRNLP50</b>		11		11	3		8		11	5			13	2			4	8
<b>BRRNLP51<sup>a</sup></b>		10	4	17	3	2	7	15	8	5	6		14	2	4	3	4	14
<b>BRRNLP52</b>			4	13	3	2	9		9			22	11				3	8
<b>BRRNLP53<sup>a</sup></b>		9	4	15	3	2	8	16	9	5	6	19	12	2	4	3	4	15
<b>BRRNLP54<sup>a</sup></b>	8	10	4	16	3	2	7	17	8	5	6	29	15	2	4	3	4	16

<sup>a</sup> Isolados selecionados para análise comparativa (cinza).

As amostras que não apresentaram nenhum marcador amplificado foram excluídas da tabela: BRRNLP 4, 9, 10, 11, 12, 14, 26, 36, 42 e 44.



## E - Aprovação no Comitê de Ética no Uso de Animais (UFRRJ)



**Comissão de Ética no  
Uso de Animais**  
Instituto de Veterinária



### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Investigação da possibilidade de transmissão zoonótica da hanseníase entre tatus (*Euphractus sexcinctus* e *Dasyplus novemcinctus*) e humanos através de ferramentas moleculares", protocolada sob o CEUA nº 8068280716 (ID 000440), sob a responsabilidade de **Douglas McIntosh e equipe; Jessica da Silva Ferreira** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) na reunião de 22/11/2016.

We certify that the proposal "Investigation of zoonotic transmission of leprosy between armadillos (*Euphractus sexcinctus* and *Dasyplus novemcinctus*) and humans using molecular tools", utilizing 100 Brazilian wild species (males and females), protocol number CEUA 8068280716 (ID 000440), under the responsibility of **Douglas McIntosh and team; Jessica da Silva Ferreira** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Veterinary Institute of Rural Federal University of Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) in the meeting of 11/22/2016.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 12/2016 a 09/2019

Área: Biologia Animal

Origem:	Não aplicável biotério	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	24 a 36 meses	N:	50
Espécie:	Espécies silvestres brasileiras						
Linhagem:	<i>D. novemcinctus</i>			Peso:	1 a 3 kg		
Origem:	Não aplicável biotério	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	24 a 36 meses	N:	50
Espécie:	Espécies silvestres brasileiras						
Linhagem:	<i>E. sexcinctus</i>			Peso:	1 a 3 kg		

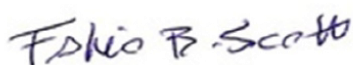
Registro IBAMA/Sisbio/Etc: Aspectos éticos: A utilização dos tatus selvagens no estudo está respalda nas licenças nos 47634-1 (Pará) e 50564-1 (Rio Grande do Norte) que consta no Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) e foi obtida mediante submissão do pedido de autorização ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA).

Método de Captura: Captura: A busca ativa de *Dasyplus novemcinctus* ocorrerá na parte da manhã, considerando que são mais ativos na manhã dos dias frios ou período crepuscular. Já a busca de *Euphractus sexcinctus* será realizada durante as horas mais quentes do dia. Os animais serão capturados através do

método de captura manual utilizando puçá, (cabo - 2,10 cm/circunferência - 53 cm de diâmetro, /profundidade da rede 76 cm ), o qual é utilizado com sucesso em diversos estudos (Breece & Dusi, 1985; Carter & Encarnação, 1983; McDonough et al., 1997; Bonato et al., 2002). Havendo dificuldade na captura manual dos animais, será implementada a captura através de armadilhas de madeira, as quais serão colocadas nos locais por onde os tatus costumam transitar (carreiros). As armadilhas que possuem fechamento automático dispõem de duas tampas nas extremidades, que permanecerão elevadas, e cairão assim que o animal estiver dentro dela em busca do alimento (isca), fechando-a. Através desses procedimentos os animais são capturados, em geral, sem grandes traumatismos. Vale ressaltar que fêmeas gestantes ou acompanhadas de filhotes serão imediatamente liberadas. A fim de se serem realizados os demais procedimentos, os animais serão transportados através de camionetes para o hospital de animais silvestres- UFERSA (Mossoró-RN) ou para a estrutura laboratorial montada no campo (demais regiões) em caixas que possuem tamanho compatível ao animal e ventilação adequada para reduzir o estresse do animal.

**Local do experimento:** Municípios de Igarapé Açu (PA) e Mossoró (RN). Em Mossoró será utilizada a estrutura do hospital de animais silvestres para a manipulação dos animais. No entanto, nas demais regiões será implementado a estruturação simples de um laboratório de campo. Laboratório de campo. Para a implementação do laboratório de campo, preconiza-se a escolha das áreas definidas para captura ou manipulação dos animais, sendo o máximo possível distante da circulação humana ou de outros animais domésticos e de coleções hídras. Em condições favoráveis de tempo, o processamento será realizado ao ar livre, possibilitando maior ventilação e exposição à luz ultravioleta natural. O uso de tendas será considerado na necessidade de haver proteção da chuva e da radiação solar intensa. A bancada de processamento, as superfícies de trabalho, serão de material não poroso, que possa ser facilmente desinfetado e limpo. Caso haja apenas superfícies de madeira, ela será coberta por material plástico para que facilite a descontaminação. Esta será realizada em matérias e superfícies utilizando o álcool a 70% ou o hipoclorito de sódio a 2,5%. A equipe realizará os procedimentos utilizando EPIs (Equipamentos de Proteção Individual).

Seropédica, 31 de outubro de 2018



Prof. Dr. Fabio Barbour Scott

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro



Prof. Dr. Jonimar Pereira Paiva

Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

## F – Autorização para atividades com finalidade científica (SISBIO)



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 50564-2	Data da Emissão: 14/09/2016 08:27	Data para Revalidação*: 14/10/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: João Marcelo Azevedo de Paula Antunes	CPF: 087.118.887-25
Título do Projeto: Investigação do envolvimento de tatus dos gêneros Dasypus e Euphractus na manutenção da endemia da hanseníase no Brasil	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO	CNPJ: 24.529.265/0001-40

#### Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de material biológico e processamento das amostras	10/2015	12/2016

#### Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico <a href="http://www.ibama.gov.br">www.ibama.gov.br</a> (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/ogen">www.mma.gov.br/ogen</a> .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

#### Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Amanda Nogueira Brum Fontes	Coordenar atividades no laboratório	086.791.337-10	112229067 IFF-RJ	Brasileira
2	Jessica da Silva Ferreira	Doutoranda	124.188.277-04	132307978 DETRAN-PR	Brasileira
3	Flavio Alves Lara	Pesquisador Principal da FIOGRUZ	036.881.537-40	103045811 IFF-RJ	Brasileira
4	Carlos Iberê Alves Freitas	Pesquisador Colaborador	774.420.327-53	2199152 SSP-BA	Brasileira

#### Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	MOSSORO	RN	Propriedades rurais do município	Fora de UC Federal

#### Atividades X Táxons

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 92465696



Página 1/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 50564-2	Data da Emissão: 14/09/2016 08:27	Data para Revalidação*: 14/10/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: João Marcelo Azevedo de Paula Antunes	CPF: 087.118.887-25
Título do Projeto: Investigação do envolvimento de tatus dos gêneros <i>Dasybus</i> e <i>Euphractus</i> na manutenção da endemia da hanseníase no Brasil	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO	CNPJ: 24.529.265/0001-40

#	Atividade	Taxons
1	Captura de animais silvestres in situ	<i>Dasybus novemcinctus</i> , <i>Euphractus sexcinctus</i>
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Dasybus novemcinctus</i> , <i>Euphractus sexcinctus</i>
3	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	<i>Euphractus sexcinctus</i> (*Qtde: 20), <i>Dasybus novemcinctus</i> (*Qtde: 20)

\* Quantidade de indivíduos por espécie, por localidade ou unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

#### Material e métodos

1	Amostras biológicas (Tatus)	Sangue, Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Fragmento de tecido/órgão, Ectoparasita
2	Método de captura/coleta (Tatus)	Coleta manual

#### Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 92465696



Página 2/3



### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 50564-2	Data da Emissão: 14/09/2016 08:27	Data para Revalidação*: 14/10/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: João Marcelo Azevedo de Paula Antunes	CPF: 087.118.887-25
Título do Projeto: Investigação do envolvimento de tatus dos gêneros <i>Dasybus</i> e <i>Euphractus</i> na manutenção da endemia da hanseníase no Brasil	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO	CNPJ: 24.529.265/0001-40

### Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº 03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

\* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 92465696



Página 3/3