



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS  
ÁREA DE PATOLOGIA DAS DOENÇAS TROPICAIS**

**MARIA DAS GRAÇAS CARVALHO ALMEIDA**

**DETECÇÃO DO *Mycobacterium leprae* PELA REAÇÃO EM CADEIA DA  
POLIMERASE (PCR) EM AMOSTRAS DE TECIDO E SWAB PÓS - BIÓPSIA DE  
PACIENTES PORTADORES DA HANSENÍASE**

**BELÉM – PARÁ  
2007**

**MARIA DAS GRAÇAS CARVALHO ALMEIDA**

**DETECÇÃO DO *Mycobacterium leprae* PELA REACÇÃO EM CADEIA DA  
POLIMERASE (PCR) EM AMOSTRAS DE TECIDO E SWAB PÓS - BIÓPSIA DE  
PACIENTES PORTADORES DA HANSENÍASE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina Tropical na área de Patologia das Doenças Tropicais, orientada pela Profa. Dra. Edna Aoba Yassui Ishikawa

**BELÉM – PARÁ  
2007**

**MARIA DAS GRAÇAS CARVALHO ALMEIDA**

**DETECÇÃO DO *Mycobacterium leprae* PELA REACÇÃO EM CADEIA DA  
POLIMERASE (PCR) EM AMOSTRAS DE TECIDO E SWAB PÓS- BIÓPSIA DE  
PACIENTES PORTADORES DA HANSENÍASE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina Tropical na área de Patologia das Doenças Tropicais, orientada pela Profa. Dra. Edna Aoba Yassui Ishikawa

**Data da aprovação: 01 de dezembro de 2007.**

**BANCA EXAMINADORA**

Orientadora: \_\_\_\_\_

Profª. Drª. Edna Aoba Yassui Ishikawa  
Núcleo de Medicina Tropical – UFPA

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Juarez Antonio Simões Quaresma  
Núcleo de Medicina Tropical – UFPA

\_\_\_\_\_  
Profª. Drª. Marília Xavier Brasil  
Núcleo de Medicina Tropical - UFPA

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. José Maria dos Santos Vieira  
Curso de Farmácia- UFPA

**BELÉM – PARÁ  
2007**

Aos meus pais Antonio Carvalho e Esterlita Carvalho "in memoriam" e aos meus filhos Marcelo Andrey, Fabrício Anderson, Patrícia Alyne e Leticia Ayla Carvalho Almeida, pelo incentivo permanente e amor incondicional.

## **AGRADECIMENTOS**

Á Deus por me conceder vida, saúde e sabedoria para escolher caminhos e encontrar saídas;

Aos meus pais, Antonio Carvalho e Esterlita Carvalho “in memoriam”, meus exemplos de vida, meu alicerce, a quem devo minha existência e minhas conquistas;

Aos meus filhos, pedras preciosas que precisam ser lapidadas com os meus exemplos, razão do meu viver;

A Profa Dra. Edna Aoba Yassui Ishikawa, mais que professora orientadora, professora amiga e companheira, pelos ensinamentos, dedicação e condução desta jornada e que sem sua contribuição nada teria sido possível, meu agradecimento especial;

Ao Prof. Dr. Juarez Antonio Simões Quaresma, pela colaboração na execução dos exames histopatológicos, pelo incentivo e apóio que foram fundamentais;

A profa. Dra. Marília Xavier Brasil pela grande contribuição na seleção clínica dos pacientes do Núcleo de Medicina Tropical;

A Profa. Dra. Silvia Rodrigues Muller pela seleção de pacientes e coleta de material dos pacientes de Itaituba;

A Profa. Dra. Maria da Conceição Nascimento Pinheiro pelo incentivo e ensinamentos éticos na produção deste trabalho;

A Dra. Horenice Cabral, Secretária de Saúde do Município de Itaituba, as enfermeiras Flavia e Márcia e toda a equipe do Hospital Municipal de Itaituba, pelo compromisso com a saúde pública, acolhimento e apoio dispensado, fundamentais na realização desta pesquisa;

A Maria do Socorro Cardoso, secretária do Curso de Mestrado em Doenças Tropicais, pelo apoio e atenção dispensada ao longo de toda esta jornada;

A todos os pacientes do Ambulatório do Núcleo de Medicina Tropical e do Hospital Municipal de Itaituba, pessoas indispensáveis, que apesar do sofrimento, se dispuseram a participar da realização desta pesquisa;

Ao Prof. Msc. Jefferson Ferraz, Coordenador do Curso de Farmácia do CESUPA e a Prof<sup>a</sup> Alba Raithy, Chefe do Departamento de Patologia da UEPA, pelo incentivo e apoio irrestrito;

A. amiga, Sra. Jacira da Silva Nascimento, técnica do Laboratório de Análises Clínicas do CESUPA, pela colaboração na execução das baciloscopias e pela permanente torcida;

Ao Victor e Ana Paula Ricker, muito além de colegas de profissão, amigos sempre presentes do início ao fim desta jornada,

A Ana Rosa Botelho Ponte companheira de todas as horas na longa caminhada para desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

Ao Núcleo de medicina Tropical da UFPA, instituição que abriu as portas e me acolheu para que eu pudesse conquistar meu sonho;

A UEPA e ao CESUPA pelo apoio e incentivo ao crescimento intelectual,

Ao CNPq pelo aporte financeiro fundamental para a execução desta pesquisa;

A todos que direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

“O saber contra a ignorância, a saúde  
contra a doença, a vida contra a morte...  
Mil reflexos da batalha permanente em  
que estamos todos envolvidos...”

Oswaldo Cruz

## RESUMO

O DNA do *Mycobacterium leprae* das amostras de fragmentos de tecido e swab pós-biópsia conservados em solução tampão lise 2 e swab pós-biópsia conservados em solução tampão lise 1, retirados de lesões hansênicas de 20 pacientes com diferentes formas clínicas da doença, foi submetido à amplificação pela PCR, visando avaliar a sensibilidade deste método. A extração do DNA foi realizada pela técnica do fenol-clorofórmio modificada e foram usados para a amplificação três pares de iniciadores, LP1/LP2, R1/R2 e S13/S62 que amplificam fragmentos de 129pb, 372pb e 531pb, respectivamente. Dos pacientes em estudo, 55% eram paucibacilares e 45% multibacilares. A PCR com os marcadores LP1/LP2 detectou 40%, sendo 15% PB e 25% MB das amostras conservadas em lise 1 e, das conservadas em lise 2 foram 15%, sendo 5% PB e 10% MB; o primer R1/R2 detectou 15%, com 5% em PB e 10% em MB em lise 1, em lise 2 não houve amplificação; o primer S13/S62 não amplificou as amostras em lise 1 e amplificou apenas 10% em lise 2, sendo um de cada grupo. A baciloscopia de esfregaços dérmicos apresentou resultados positivos para 20% dos pacientes MB e foi negativa para todos PB; a histopatologia foi positiva para 30%, sendo 20 % para PB e 10% para MB. A PCR com o primer LP1/LP2 deixou de detectar DNA do *Mycobacterium leprae* em 60% das amostras, a baciloscopia em 80% e a histopatologia em 70%. Devido à reduzida sensibilidade da PCR nas amostras conservadas em lise 2, neste estudo os melhores resultados foram obtidos em amostras de swab pós-biópsia conservadas em solução tampão lise 1, com DNA extraído pelo método de fenol clorofórmio modificado e amplificado pelo primer LP1/LP2.

Palavras chaves: *Mycobacterium leprae*, Hanseníase, PCR, primer.



## ABSTRACT

The *Mycobacterium leprae* DNA of the samples of tissue fragments and swab pos biopsy conserved in lysis buffer solution 2 and swab pos biopsy conserved in lysis buffer solution 1, removed of leprosy lesions of 20 patients with different clinical forms of the illness, was submitted to the amplification for the PCR, aiming at to evaluate the sensitivity of this method. The extration of the DNA was carried through by the technique of modified phenol-chloroform and had been used for the amplification three pairs of primers, LP1/LP2, R1/R2 and S13/S62 that amplify fragments of 129pb, 372pb and 531pb, respectively. Of the patients in study, 55% were paucibacillary and multibacillary 45%. The PCR with primer LP1/LP2 detected 40%, being 15% PB and 25% MB of the samples conserved in lise 1 and, of the conserved ones in lise 2 had been 15%, being 5% PB and 10% MB; primer R1/R2 detected 15%, with 5% in PB and 10% in MB in lise 1, in lise 2 did not have amplification; primer S13/S62 did not amplify the samples in lise 1 and amplified only 10% in lise 2, being one of each group. The bacilloscopy of skin smears presented positives results for 20% patient dos MB and was negative for all PB; the histopathology was positive for 30%, being 20 % for PB and 10% for MB. The PCR with primer LP1/LP2 left to detect DNA of the *Mycobacterium leprae* in 60% of the samples, the bacilloscopy in 80% and the histopathology in 70%. Due to reduced sensitivity of the PCR in the samples conserved in lise 2, in this study the best ones resulted had been gotten in samples of swab pos biopsy conserved in lysis buffer solution 1, with DNA extracted for the phenol method chloroform modified and amplified for primer LP1/LP2.

Key words: *Mycobacterium leprae*, Leprosy, PCR, primer

## LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1	Rota da expressão da hanseníase no mundo	20
Figura 2	Bacilos de Hansen visto pela microscopia ótica em esfregaço cutâneo corados pelo Ziehl-Neelsen	23
Figura 3	<i>Mycobacterium leprae</i> (Bacilo de Hansen) visto pela microscopia eletrônica de varredura	23
Figura 4	Taxa de prevalência da hanseníase no mundo	25
Figura 5	Prevalência da hanseníase na América latina	26
Figura 6	Mapa da situação atual da hanseníase no Brasil	27
Figura 7	Representação diagramática da resposta imune da hanseníase	28
Figura 8	Hanseníase Indeterminada: Mácula hipocrômica e hipoestésica pelo acometimento dos ramúsculos nervosos com tropismo pela célula de Schwann	33
Figura 9	Hanseníase Tuberculóide: lesão circinada com bordas róseas, elevadas e granulosas; área central insensível ao toque e á dor e com alopecia	33
Figura 10	Hanseníase Dimorfa tuberculóide: Placa infiltrada bem delimitada com superfície levemente escamosa e anestésica	34
Figura 11	Hanseníase Dimorfa Dimorfa: Lesões em “queijo suíço” e áreas centrais anestésicas	34
Figura 12	Hanseníase Dimorfa Virchowiana: Numerosas placas disseminadas, lesões anulares, pápulas e máculas, com baixa perda de sensibilidade	35
Figura 13	Hanseníase Virchowiana: Acentuada infiltração difusa “fácies leonina”, madarose, perda de cílios	35
Figura 14	Representação diagramática do Índice Bacteriológico de esfregaços de pele de acordo com a escala de Ridley e Jopling	39
Figura 15	Hanseníase Indeterminada: Infiltrado inflamatório crônico inespecífico linfomonocitário em torno de vasos e filete nervoso	40

Figura 16	Hanseníase Tuberculóide: Granuloma epitelióides, com infiltrado linfocitário, eficiente na destruição dos bacilos	40
Figura 17	Hanseníase Dimorfa Virchowiana: Granuloma histiocitário com grande infiltrado de linfócitos e faixa clara sub-epidérmica	41
Figura 18	Hanseníase Virchowiana: Granuloma histiocitário com várias células gigantes e alguns linfócitos e plasmócitos difusamente espalhados, com faixa clara subepidérmica	41
Figura 19	Correlação entre baciloscopia e PCR com iniciadores LP1 e LP2 que amplificam 129pb em swab pós-biópsia conservados em solução de Lise 1	66
Figura 20	Correlação entre histopatologia com pesquisa de BAAR de fragmentos de pele e PCR com iniciadores LP1 e LP2 que amplificam 129pb em swab pós-biópsia conservados em solução de Lise 1	67

## LISTA DE TABELAS

	<b>Pág.</b>	
Tabela 1	Distribuição dos pacientes com hanseníase segundo a classificação operacional (PB= paucibacilar e MB= multibacilar) e as formas clínicas	<b>61</b>
Tabela 2	Resultados das baciloscopias dos esfregaços dérmico de acordo com a forma clínica dos pacientes com hanseníase.	<b>61</b>
Tabela 3	Resultados das baciloscopias de esfregaços dérmicos, segundo a classificação operacional dos pacientes com hanseníase	<b>62</b>
Tabela 4	Resultado da histopatologia com pesquisa de BAAR em fragmentos de tecido, segundo a classificação operacional de pacientes com hanseníase.	<b>62</b>
Tabela 5	Resultados da PCR com iniciadores LP1 e LP2 que amplificam seqüência de 129pb em swab pós-biópsia conservados em Lise 1, de pacientes com hanseníase, para detecção de DNA do <i>Mycobacterium leprae</i> , relacionados com a classificação operacional	<b>63</b>
Tabela 6	Resultados da PCR com iniciadores LP1 e LP2 que amplificam uma seqüência de 129pb em swab pós-biópsia, conservados em Lise 2, de pacientes com hanseníase para detecção de DNA do <i>Mycobacterium leprae</i> relacionados com a classificação operacional	<b>64</b>
Tabela 7	Resultados da baciloscopia dos esfregaços dérmicos e da PCR com iniciadores LP1 e LP2 que amplificam 129pb em swab pós-biópsia conservados em Lise 1 de pacientes com hanseníase para detecção de DNA do <i>Mycobacterium leprae</i>	<b>65</b>
Tabela 8	Resultados da histopatologia com pesquisa de BAAR em fragmentos de pele e da PCR com iniciadores LP1 e LP2 que amplificam 129pb em swab pós-biópsia conservados em Lise 1 de pacientes com hanseníase para detecção de DNA do <i>Mycobacterium leprae</i>	<b>66</b>
Tabela 9	Resultados da baciloscopia dos esfregaços dérmicos e da PCR que amplificam 372pb em swab pós-biópsia conservados em Lise 1 e Lise 2 de pacientes com hanseníase para detecção de DNA do <i>Mycobacterium leprae</i> .	<b>68</b>

Tabela 10	Resultados da baciloscopia dos esfregaços dérmicos e da PCR 531pb em swab pós-biópsia conservados em Lise 1 e Lise 2 de pacientes hansenianos para detecção de DNA do <i>Mycobacterium leprae</i> .	69
Tabela 11	Resultados das PCR em fragmento de pele conservado em Lise 2 de pacientes com hanseníase para detecção de DNA do <i>Mycobacterium leprae</i> .	70
Tabela 12	Resultados das PCR em Swab pós-biópsia conservados em Lise 1 e Lise 2 de pacientes com hanseníase para detecção do DNA do <i>Mycobacterium leprae</i> .	71
Tabela 13	Resultado da baciloscopia dos esfregaços dérmico, da biópsia de pele, PCR 129pb em swab pós-biópsia de lesão de pacientes com hanseníase para detecção do DNA do <i>Mycobacterium leprae</i> de acordo com a classificação operacional	72
Tabela 14	Teste de diferenciação de proporções entre os resultados de baciloscopia de lesão de pele, PCR 129pb em lise 1 e lise 2, segundo a classificação operacional de pacientes com hanseníase.	72

## LISTA DE ABREVIATURAS

a.C	antes de Cristo
BAAR	Bacilo Álcool Ácido Resistente
BB	Bordeline bordeline
BCG	Bacilo Calmette Guérin
BL	Borderline lepromatosa
BT	Borderline tuberculóide
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	Deoxinucleotídeos
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetra-acético
ENH	Eritema Nodoso Hansênico
et. al.	Colaboradores
g	grama
HB	Hanseníase bordeleine
HCL	Ácido clorídrico
HD	Hanseníase dimorfa
HI	Hanseníase indeterminada
HL	Hanseníase lepromatosa
HLA	Antígeno Leucocitário Humano (Human lymphocyte antigens)
HLA-DQ	Antígeno leucocitário humano de classe II, alelo DQ
HLA-DR	Antígeno leucocitário humano de classe II, alelo DR
HT	Hanseníase tuberculóide
HV	Hanseníase virchowiana

I	Indeterminada
IB	Índice bacteriológico
IFN- $\gamma$	Interferon <i>gama</i>
IgM	Imunoglobulina M
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
KCl	Cloreto de potássio
L	Lepromatosa
LL	Lepromatosa
M	Molar
mg	miligrama
MB	Multibacilar
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
mL	mililitro
ML-LBP21	<i>Mycobacterium leprae</i> -laminin binding protein 21
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
NK	Células natural <i>killer</i>
OD	Lóbulo da orelha direita
OE	Lóbulo da orelha esquerda
OPAS	Organização Panamericana da Saúde
OMS	Organização Mundial da saúde

pb	Pares de base
PB	Paucibacilar
PCR	Reação em cadeia mediada pela polimerase
PDIM	Fticerol Dimicocerosado
PGL-1	Glicolípídeo – fenólico 1
pH	Potencial de hidrogênio
RR	Reação Reversa
SDS	Sulfato duodecil de sódio
SVS	Secretaria de vigilância á saúde
Swab	Cotonete
TBE	Tris/Borato/EDTA
TCLE	Termo de consentimento Livre e esclarecido
TE	Tampão Tris - EDTA
TGF- $\beta$	Fator transformador do crescimento-beta
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral - alfa
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol
TT	Tuberculóide
UV	Radiação Ultravioleta
WHO	Organização mundial da saúde
$\kappa$ Da	Quilo Daltons
$\eta$ g	nanograma
$\mu$ L	Microlitro
$\mu$ M	Micromol
$\mu$ g	Micrograma



## SUMÁRIO

<b>1. CONSIDERAÇÕES GERAIS-----</b>	<b>19</b>
1.1 RESUMO HISTÓRICO DA HANSENÍASE-----	19
1.2 ETIOLOGIA E ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA HANSENÍASE-----	22
1.3 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA HANSENÍASE-----	28
1.4 ASPECTOS CLÍNICOS DA HANSENÍASE-----	33
1.4.1 Classificação das Formas Clínicas da Hanseníase-----	37
<b>2. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA HANSENÍASE-----</b>	<b>43</b>
<b>3. OBJETIVOS-----</b>	<b>51</b>
3.1 OBJETIVO GERAL-----	51
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS-----	51
<b>4. METODOLOGIA-----</b>	<b>52</b>
<b>4.1 CASUÍSTICAS E MÉTODOS-----</b>	<b>52</b>
<b>4.1.1 Tipo de Estudo-----</b>	<b>52</b>
<b>4.1.2 População de Estudo-----</b>	<b>52</b>
<b>4.1.3 Critérios de Inclusão-----</b>	<b>53</b>
<b>4.1.4 Critérios de Exclusão-----</b>	<b>53</b>
<b>4.1.5 Coleta de Dados e Aspectos Éticos-----</b>	<b>53</b>
<b>4.2 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA HANSENÍASE-----</b>	<b>54</b>
<b>4.2.1 Amostras Biológicas-----</b>	<b>54</b>
4.2.1.1 Raspado Dérmico-----	54
4.2.1.2 Amostra de Tecido-----	55
4.2.1.3 Swab Pós-Biópsia-----	55

4.2.2	Extração do DNA DO <i>Mycobacterium leprae</i> -----	56
4.2.3	Amplificação do DNA do <i>Mycobacterium leprae</i> pela Reação em cadeia de polimerase (PCR)-----	58
4.2.4	Análises dos dados-----	60
5.	RESULTADOS-----	61
6.	DISCUSSÃO -----	73
7.	CONCLUSÃO-----	79
8.	REFERENCIA BIBLIOGRAFICAS -----	81
	APÊNDICES-----	89
	ANEXOS-----	91

## **1 CONSIDERAÇÕES GERAIS**

### **1.1 RESUMO HISTÓRICO DA HANSENÍASE**

A hanseníase é uma doença infecto-contagiosa considerada uma das mais antigas já ocorridas no homem, cuja origem ainda não está bem estabelecida. As mais remotas referências escritas são oriundas da Índia e datam de 600 a.C.. Acredita-se que seu berço tenha sido a Índia e a China, pois a mais autêntica descrição desta doença encontra-se na literatura chinesa que narra a hanseníase como doença que provoca perda de sensibilidade e deformidades (OPROMOLLA, 2000).

Referências à lepra são também realizadas na Bíblia no capítulo 13 e 14 do Levítico, onde se encontra o termo hebreu Tzara'ath, para designar afecções impuras que são associadas a imagens de deformidades, uma das principais origens que determina a conotação estigmatizante que é presente até os dias de hoje (YAWALKAR, 2002).

A evidência da hanseníase na Ásia foi referida em um dos livros sagrados da Índia o Regveda Samhita no ano de 1.500 a.C. Esta doença não era conhecida na Europa, na época de 457 a.C., entretanto, admite-se que as tropas de Alexandre “O grande” ao retornarem, após a conquista do mundo, trouxeram indivíduos portadores da lepra, contaminados nas campanhas na Índia. E precisamente na Grécia, em 150 a.C., foi introduzido por Galeno o termo “facies leonina” para o aspecto infiltrado da face do paciente (OPROMOLLA, 2000).

Na África, a ocorrência da hanseníase se deu ao longo das rotas comerciais, durante a Idade Média. Há referências desta doença, no Egito, desde 1350 a.C. e que provavelmente foi introduzida pelos escravos negros do Sudão (MUIR, 1947). Nas Américas, foi introduzida na metade do século XVI por imigrantes europeus e escravos africanos, especialmente no Brasil. Os casos registrados, atualmente, nos Estados Unidos, são de veteranos da II guerra mundial e de imigrantes recentes, principalmente, dos países asiáticos (YAWALKAR, 2002).

Embora haja muitas contradições sobre a origem da hanseníase, a rota de expressão (Figura 1) indica seu início na Ásia o que posteriormente se estendeu para Europa, África e Américas, especialmente no Brasil.

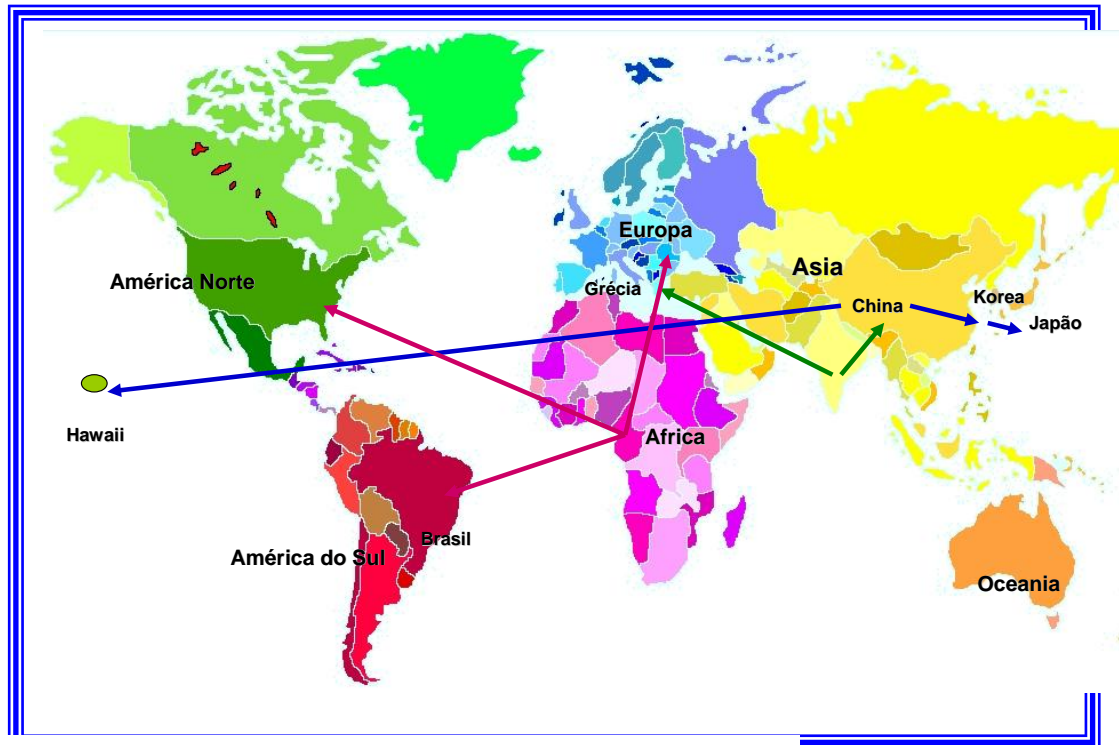


Figura 1: Rota da expressão da Hanseníase no mundo

O registro da existência da hanseníase no Brasil data de 1600, na cidade do Rio de Janeiro, onde mais tarde seria criado o primeiro "Lazareto" (abrigo dos leprosos). Os documentos antigos que referenciam a existência da hanseníase em São Paulo datam de 1765 e 1768. Através de censos, foi observada a elevação do número de pacientes ano a ano, devido ao pleno desenvolvimento do Estado que provocava um intenso movimento migratório. No início da década de 30, o Estado de São Paulo adotou o modelo de isolamento compulsório, com objetivo de eliminar a doença que até então não tinha tratamento (OPROMOLLA, 2000).

A distribuição geográfica da hanseníase no Brasil não é diferente da encontrada nos anos 40, sobretudo na alta endemicidade observada na região Norte. As medidas preventivas que foram adotadas nas décadas de 40 e 50, não eram diferentes do que ocorria em outros países. Vários estados brasileiros fizeram uso de preventórios, como: Maranhão, Ceará, Paraíba e Santa Catarina, dentre outros. O Estado do Pará também adotou os leprosários, preventórios e dispensários. Na

capital havia os leprosários Hospital de Tucunduba (1816), Asilo Santa Terezinha (1931) e o preventório Educandário Eunice Weaver e o dispensário de Belém. No interior do estado havia os leprosários Lazarópolis do Prata (1924), Colônia de Marituba (1937), Lazarópolis do Tocantins (1938) e o Leprosário Asilo Frei Gil Vila Nova (1938) (SANTOS, 2003; MACIEL et al., 2003).

Com essa medida previa-se o declínio da doença em 10 anos e a eliminação nos anos 50, o que não ocorreu. Nesta mesma década, por recomendação da Organização Mundial de Saúde (OMS), teve início o declínio do modelo isolacionista no Brasil, a exemplo de outros países e foi implantado o tratamento domiciliar de todos os doentes e a vigilância dos comunicantes. A lei do isolamento compulsório (nº 610) foi revogada pelo Decreto federal nº 868 de 07/05/1962. Em 1967, o Brasil, através do Professor Abraão Rotberg, pioneiramente, substitui o termo lepra por hanseníase, com objetivo de reduzir o estigma existente em relação à doença, o que não foi suficiente para eliminar o preconceito e os problemas psicossociais ainda hoje relacionados com a doença (OPROMOLLA, 2000; OLIVEIRA et al., 2003).

A hanseníase existe em todo território paraense, com distribuição heterogênea e em expansão nas regiões sul e sudeste, onde são bastante elevadas as taxas de prevalência (SVS, 2007).

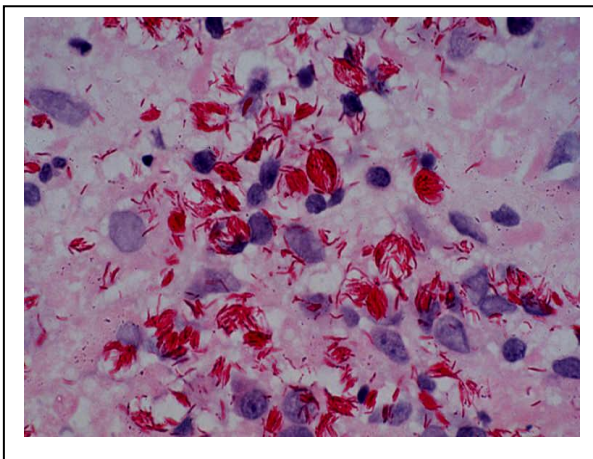
## 1.2 ETIOLOGIA E ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICO DA HANSENÍASE

A hanseníase é uma doença infecciosa causada pelo *Mycobacterium leprae*, também chamado Bacilo de Hansen, por ter sido descoberto pelo físico norueguês Gerhard Henrik Armauer Hansen, em 1873, quando por microscopia, observava em preparações não fixadas oriundas de nódulos de pacientes hanseníacos, a presença de microorganismos em forma de bastonetes retos ou ligeiramente encurvados, medindo aproximadamente de 1,5 a 8 micras de comprimento por 0,2 a 0,5 micra de diâmetro, vistos isolados ou em agrupamentos ou arranjos especiais chamados de globias, formações sólidas devido à união dos bacilos devido a uma substância chamada gléia (GOULART et al., 2002; ARAÚJO, 2003).

O *M. leprae* apresenta crescimento lento com tempo de geração em média, de 12 a 21 dias,

intracelular obrigatório das células do sistema fagocítico-mononuclear predominantemente em macrófagos, o que imprime característica de doença crônica a hanseníase. Esta bactéria é aeróbia com tropismo para a célula de Schwann, onde induz necrose caseosa, causa principal das deformidades características desta doença, apresenta reprodução por fissão binária, álcool-ácido resistência e se mantém viável, fora do organismo, por até 10 dias a 4°C. Em fragmentos de biopsias e/ou suspensão; em secreções nasais, podem sobreviver por até 7 dias a 20,6 °C e umidade de 43,7%, entretanto, o aumento da temperatura e da umidade leva a diminuição de sua viabilidade (MADEIRA, 2000; ARAÚJO 2003).

Este microorganismo se prolifera seletivamente em áreas frias (menos 37°C) do corpo: pele, trato respiratório superior, estrutura anterior dos olhos e segmentos superficiais dos nervos periféricos, determinando, nestes locais, lesões hansênicas. Para que os BAAR, sejam observados, na microscopia, em esfregaços de linfa/raspado celular e tecidos corados, se faz necessário que a amostra apresente concentração de aproximadamente  $10^4$  /mL, o que justifica a baixa sensibilidade da baciloscopia (Figura 2 e 3) (MADEIRA, 2000; ARAÚJO 2003).



**Figura 2:** Bacilos de Hansen visto pela microscopia ótica em esfregaço cutâneo corados pelo Ziehl-Neelsen



**Figura 3:** *M. leprae* (Bacilo de Hansen) visto pela microscopia eletrônica de varredura

Fonte: LEIKER & NUNZI, 1981

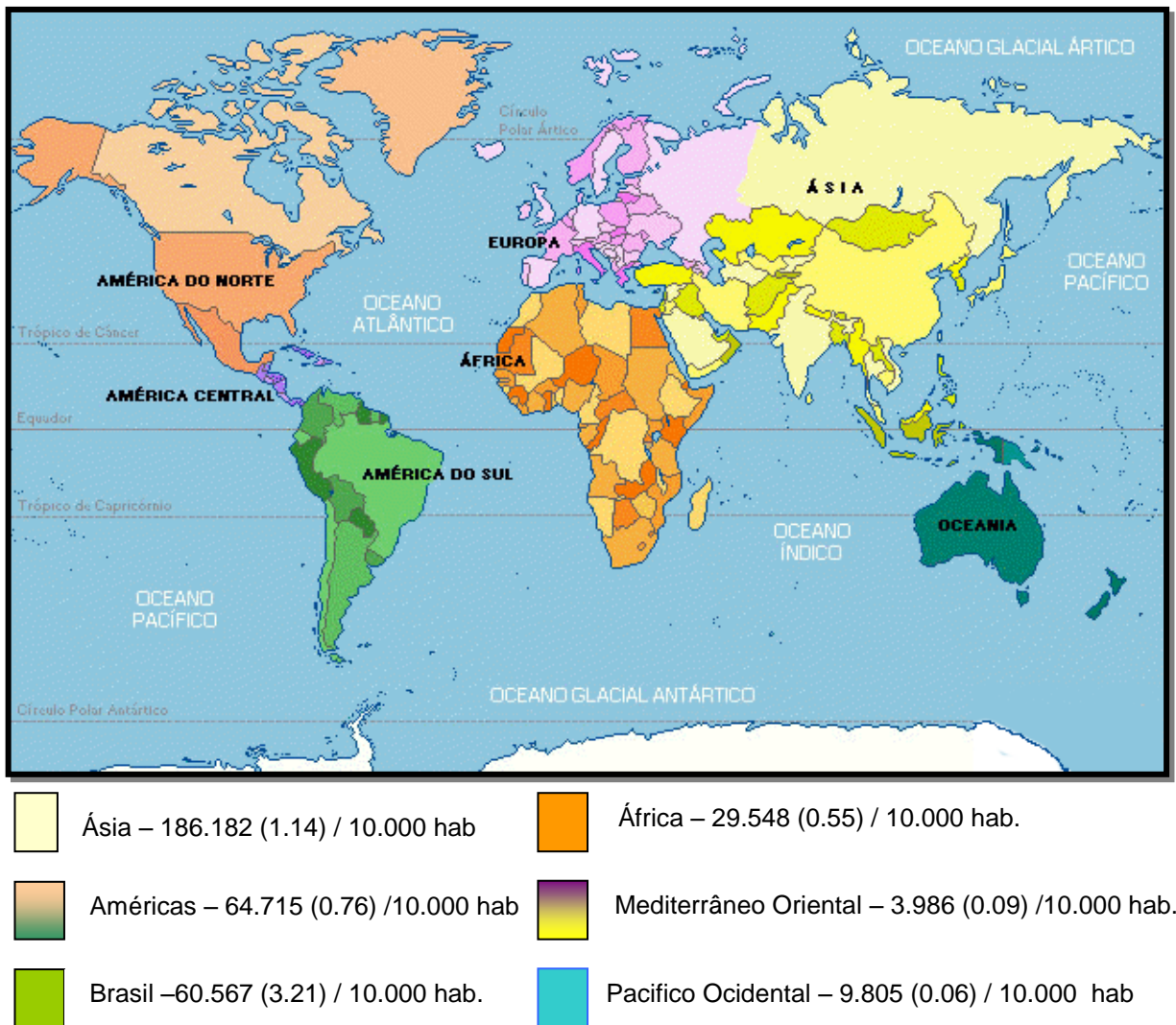
como seu | Fonte: OPROMOLLA, 2000 missão ocorre por

contato interpessoal, principalmente pelas vias aéreas superiores e a infecção subclínica ocorre em grande proporção de pessoas e apresenta período de incubação longo, devido ao seu crescimento lento, em média, de cinco anos, o que proporciona evolução insidiosa do comprometimento neural, causando deformidades que desfiguram o paciente, aumentando o preconceito em relação aos

portadores desta doença e elevando sobremaneira o risco de transmissão. A transmissão silenciosa desta bactéria, a recidiva e o longo período de incubação são os principais desafios para o controle desta doença o que poderá reverter o quadro de “eliminação” proposta e em andamento para uma situação de alta endemicidade. Assim, é que o diagnóstico da hanseníase além de ser determinante na interrupção da transmissão, pode aumentar a detecção de casos novos em regiões endêmicas (ALMEIDA et al., 2004).

Em estudos soro-epidemiológicos têm sido demonstrados que, 15% das crianças entre cinco a dez anos, em região endêmica de hanseníase, apresentam anticorpos específicos ao *M. leprae*, sem evidências clínica da doença, em um período de observação de cinco anos (GOULART et al., 2002; SMITH et al., 2004).

O número de novos casos de Hanseníase detectados e registrados no mundo em 2006, segundo a OMS, foi de 259.017, sendo o Sudeste da Ásia, o maior detentor de casos, com 174.118 (10,51), seguido pelas Américas com 47.612 (5,58), África com 27.902 (5,15), Pacífico Ocidental com 6.124 (0,35), e o Leste mediterrâneo com 3.261 (0,71) (Figura 4) (WHO, 2007).

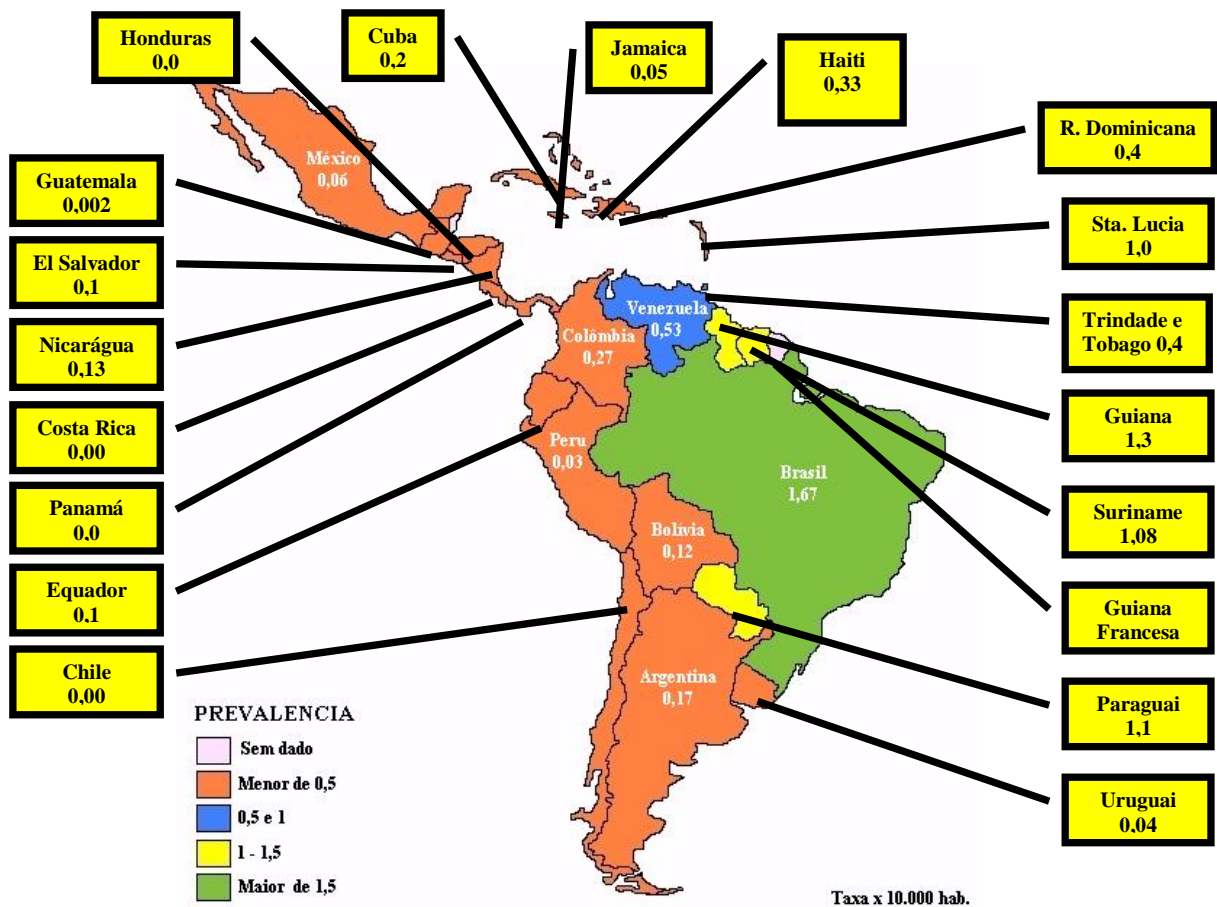


**Figura 4:** Taxa de prevalência da hanseníase no mundo.

Fonte: WHO, 2007

Os casos registrados nas Américas, em sua maioria, referem-se a América do Sul. Na atualidade todos os países sul-americanos têm hanseníase com exceção do Chile. O Brasil é o que apresenta a mais alta prevalência, sendo o segundo país do mundo em número absoluto de casos, superado apenas pela Índia (82.801), considerado pela OMS como área de alta endemicidade (Figura 5) (WHO, 2007).





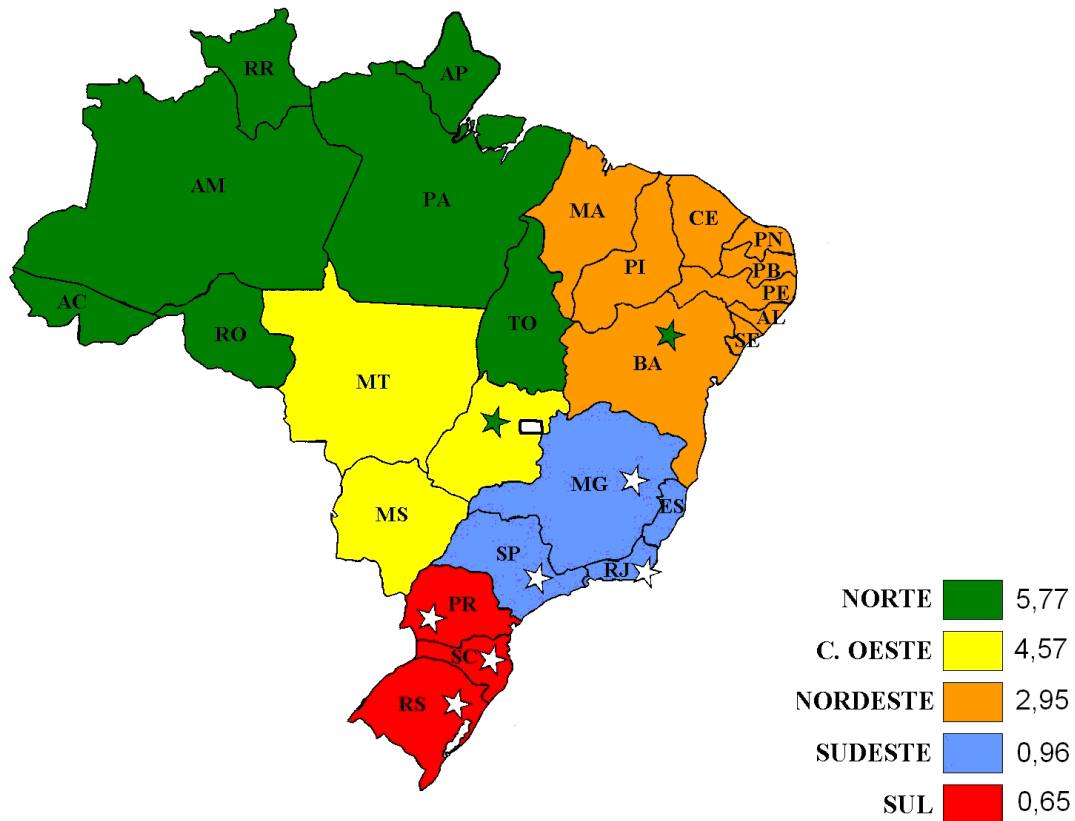
**Figura 5:** Prevalência da Hanseníase na América Latina

Fonte: Adaptado de OPAS, 2007

Segundo os dados do Ministério da Saúde até o ano de 2006, temos os Estados do Rio Grande do Sul (0,17), Santa Catarina (0,31), São Paulo (0,48), Rio Grande do Norte (0,86) e Distrito Federal (0,99) exibindo menos de um caso em cada 10.000 habitantes. Mato Grosso (10,47) e Roraima (10,07), com taxa de detecção acima de dez para cada 10.000 habitantes. Os outros estados brasileiros apresentam taxas de detecção que variam de um a dez casos/10.000 habitantes (Figura 6) (SVS, 2007).

O Estado Pará é o primeiro do Brasil em números absolutos de casos (4.282) no ano de 2006, e detém o maior número de casos de hanseníase na região Norte, apresentando um contexto hiper-epidêmico da doença, considerado como um grande problema de saúde pública, principalmente na região Sudeste do Pará, nos municípios de Jacundá e Eldorado dos Carajás, aonde o número de casos vem aumentando a cada ano devido ao elevado fluxo migratório de garimpeiros e

trabalhadores rurais vindos do nordeste do País (SVS, 2007).



**Figura 6:** Mapa da situação atual da hanseníase no Brasil (Coeficiente de detecção de casos novos em cada 10.000 hab.)

Fonte: SVS, 2007

### 1.3 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA HANSENÍASE

O hospedeiro exerce sua defesa contra o *M. leprae* pelas barreiras inespecíficas (Imunidade Inata) e específicas (Imunidade Adaptativa). A resposta adaptativa se dá tanto pela imunidade celular quanto pela humoral. O *M. leprae* se liga à célula do hospedeiro através de adesinas bacterianas, de antígenos de superfície, como o PGL-1 (Glicolípido fenólico 1) e ML-LBP21 (*M. leprae*-Laminin binding protein 21) e receptores da célula hospedeira, especialmente o  $\alpha$ -dístroglicano, que serve como receptor da Célula de Schwann para o *M. leprae*. Mas, também pode ser indiretamente por absorção sobre a superfície bacteriana atravessando a molécula da célula original do hospedeiro

(RAMBUKANA et al., 1998; SAMPAIO et al., 2002).

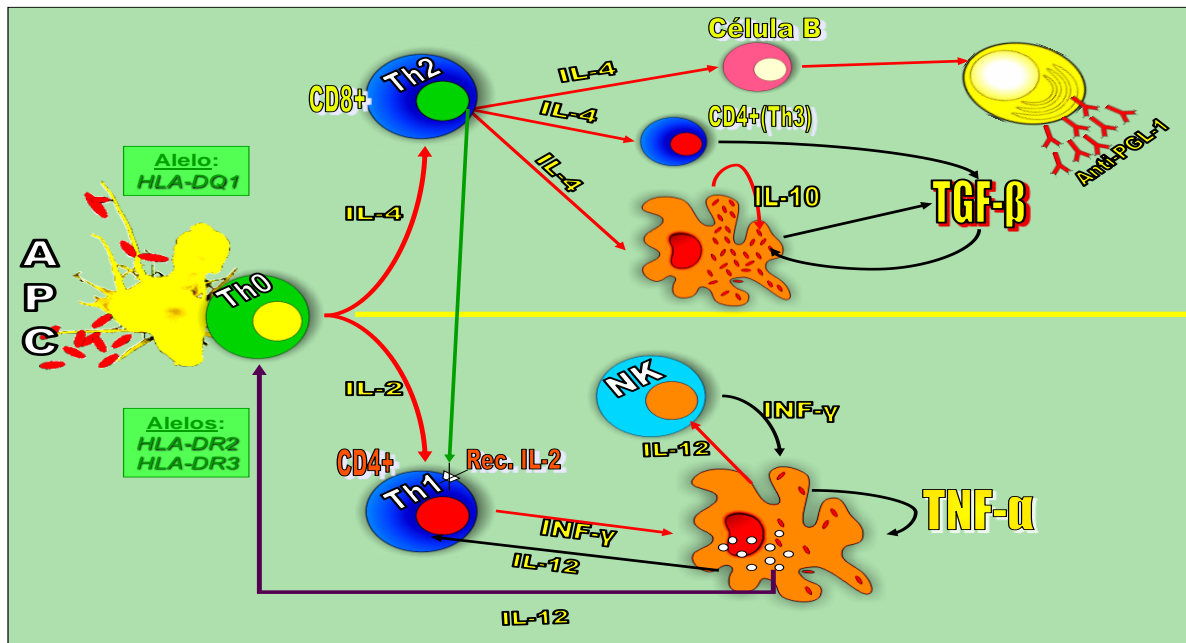


Figura 7: Representação diagramática da resposta imune da hanseníase

A interação celular através da ação de macrófagos ocorre após estes serem ativados pela presença de bacilos no seu interior, quando passam a expressar citocinas como IL-1 (Interleucina 1),  $TNF\alpha$  (Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$ ) e IL-12 (Interleucina 12) que atuam sobre os linfócitos T, geralmente a população de fenótipo CD4+ (Helper), ativando-os e tornando-os capazes de produzir citocinas, como a Interleucina 2 (IL2) que estimula diretamente a célula Natural Killer (NK) induzindo a produção de IFN  $\gamma$  (Interferon  $\gamma$ ). Este age sobre os macrófagos estimulando a fagocitose e os mecanismos de ativação celular com conseqüente produção de  $TNF\alpha$ , que possui o poder de incrementar a ativação macrofágica (TALHARI & NEVES, 1997; GOULART et al., 2002).

A resposta Th2 se contrapõe a resposta Th1, quando expressa a Interleucina 4 (IL-4), Interleucina 10 (IL-10) e fator transformador do crescimento beta ( $TGF\beta$ ), pois enquanto na resposta Th1 ocorre produção do fator de necrose tumoral ( $TNF\alpha$ ) que promove a ativação dos macrófagos para destruição intracelular da célula bacteriana, o  $TGF\beta$  desativa o macrófago permitindo a proliferação bacteriana, auxiliado pela IL-4 que também regula os níveis de anticorpos específicos (GOULART et al., 2002; FOSS, 1997).

A resposta humoral é inefetiva para eliminação dos bacilos e pode ser avaliada pela detecção de anticorpos específicos (anti- PGL1), para o glicolípido fenólico da parede do *M. leprae*. Não apresenta reação cruzada com outras espécies e em altas concentrações no sangue periférico denuncia à acentuada carga bacilar, encontrada nas formas borderline lepromatosas (BL) e lepromatosas (L), diferente dos pacientes tuberculóides que apresentam títulos semelhantes aos controles sadios (ABULAFIA & VIGNALE, 2001).

O padrão clínico da doença está associado aos genes ligados ao HLA, pois há evidências, ainda não comprovadas, que sugerem que os indivíduos suscetíveis aos alelos HLA-DR2 e HLA-DR3, apresentam mais resistência à doença e desenvolvem com mais frequência Hanseníase tuberculóide (HT), enquanto que os com HLA-DQ1 apresentam mais susceptibilidade à doença e desenvolvem Hanseníase lepromatosa (HL) (GOULART et al., 2002; ARAÚJO, 2003).

As reações imunológicas envolvendo os linfócitos T podem produzir danos na Hanseníase tuberculóide (HT), enquanto os complexos imunes intravasculares podem ser responsáveis pela deterioração neural na Hanseníase lepromatosa (HL), especialmente durante episódios reacionais do tipo Eritema Nodoso Hansênico (ENH). O dano neural, causado por esta bactéria é atribuído a sua proliferação ou a resposta imune do hospedeiro. (ABBAS et al, 2003). A destruição dos nervos na Hanseníase se deve principalmente pela interferência bioquímica do bacilo com o metabolismo da célula hospedeira; destruição mecânica, devido ao intenso fluxo de células e fluidos e/ou deterioração imunológica. Quanto ao aspecto imunológico, temos o mediador químico TNF $\alpha$  como a principal citocina envolvida neste processo e foi detectada no soro de pacientes multibacilares (MB) com reação tipo II ou Eritema Nodoso Hansênico (ENH) e reação tipo I ou reação reversa (RR) e em pacientes paucibacilares (PB) com neurite isolada, entretanto como esperado, em índices mais baixos que no ENH (Figura 7) (SAMPAIO et al., 2002).

O bacilo de Hansen possui na superfície externa grande quantidade de componentes lipídicos. Entre eles, os mais importantes são o Ftiocerol dimicocerosado (PDIM), quimicamente distinto dos encontrados nas outras espécies de micobactérias; e o Glicolípido Fenólico I (PGL-I) que apresenta um grupo fenólico glicosilado com um trissacarídeo característico e aparentemente

único para o *M. leprae*. Estes lipídios podem ser encontrados nos tecidos de humanos e de tatus infectados, mesmo após a eliminação da bactéria, indicando sua permanência por longos períodos. A especificidade da resposta humoral, durante a infecção é devido à porção terminal 3,6-di-O-metil glucose do PGL-1, e que ainda não foi detectado em nenhuma outra molécula natural (FOSS & CALLERA, 1993; MADEIRA, 2000; YAWALKAR, 2002).

Os níveis de anticorpos, em acordo com o índice bacterioscópico aumentam das formas tuberculóides às formas lepromatosas (TT a LL). Desta forma a sorologia pode ser utilizada como mais um instrumento na classificação de pacientes hansenianos, pois demonstra que cerca de 85% a 100% dos pacientes multibacilares (MB) e 5% a 34% de pacientes paucibacilares (PB) são soropositivos (BÜHRER, 2000; BÜHRER et al., 2001; BÜHRER et al., 2003).

Os testes sorológicos realizados apresentam aproximadamente 98% de especificidade e sensibilidade para detecção de pacientes multibacilares de 80 a 100% e de 30 a 60 % para detecção de pacientes paucibacilares (BÜHRER, 1998; BÜHRER et al., 2001).

A profilaxia da hanseníase se baseia fundamentalmente em ações de controle e vigilância epidemiológica centradas na educação e saúde, nos exames periódicos dos contatos, na vacinação com BCG (Bacilo de Calmette e Guérin) e na prevenção e tratamento das incapacidades físicas (OPROMOLLA, 2000; WHO, 2002).

Além do exame sistemático dos contatos de pacientes hansenianos, as medidas imunoproláticas deveriam ser realizadas, através da administração da vacina BCG id, nos contatos sadios de pacientes hansenianos, pois está comprovada em diversos trabalhos de investigação sua eficácia na proteção de indivíduos sadios das formas graves da hanseníase (OMS/OPAS, 1989; URA, 2000).

Devido a inabilidade desta bactéria crescer "*in vitro*", fato que dificulta a disponibilidade da vacina específica considerando que é preparada com bactérias mortas ou atenuadas. A vacinação pelo BCG foi desenvolvida por Albert Calmette e Camille Guérin e confere proteção contra a tuberculose e a hanseníase. Através da portaria 01\89 DNDS\MS (Divisão Nacional de Dermatologia

Sanitária da Saúde\Ministério da Saúde) foi determinado a vacinação de todos os novos casos de hanseníase, independente da forma clínica do caso índice (YAWALKAR, 2002).

Recentemente estudos realizados avaliaram a correlação entre BCG id e os níveis de anticorpos IgM anti-PGL-1 em pacientes hansenianos e seus contatos, onde demonstra redução de anticorpos específicos independente do nível da forma clínica, demonstrando associação da capacidade desta vacina de induzir ativação da resposta imunológica tanto de pacientes quanto de seus contatos a queda de anticorpos anti-PGL-1 (LOMBARDI et al., 1995).

#### 1.4 ASPECTOS CLÍNICOS DA HANSENÍASE

Os aspectos clínicos na hanseníase estão diretamente relacionados com a resposta imunológica que varia de indivíduo para indivíduo e depende da carga bacteriana, do percurso do bacilo e da natureza da célula apresentadora de antígeno. As manifestações clínicas caracterizam-se pelo comprometimento neural e/ou cutâneo. Na forma clínica Indeterminada (HI), forma inicial, o paciente apresenta uma ou várias manchas hipocrômicas, planas e com bordas, em geral, imprecisas. Estas máculas apresentam distúrbios da sensibilidade do tipo ramuscular, anidrose ou hipohidrose e pode ocorrer alopecia local. Não há comprometimento de troncos nervosos e, por isso, não ocorrem alterações motoras ou sensitivas que possam causar incapacidade (Figura 8) (OMS/OPAS, 1989; YAWALKAR, 2002).



Fonte: SILVA, 2007

Esta forma inicial, não tratada, pode evoluir para a forma tuberculóide (HT), com lesões tuberculóides maduras planas ou elevadas formando placas bem individualizadas, com limites com a pele normal bem nítido e não apresenta tendência a disseminação e alguns casos podem evoluir para a cura espontânea. Nesta forma clínica observam-se alterações da sensibilidade térmica, dolorosa e, nas lesões mais antigas, também a tátil, além de alopecia, hipohidrose ou anidrose e de dor nos nervos periféricos, que são em geral unilaterais (Figura 9) (TALHARI & NEVES, 1997; YAWALKAR, 2002).



Fonte: SILVA, 2007

Fonte: SILVA, 2007

A forma clínica inicial (HI), com resistência imunológica, evolui para hanseníase dimorfa ou “borderline” (HD ou HB), é muito instável e as lesões se apresentam, geralmente, como placas, faixas, nódulos, etc... (Figura 10). As placas apresentam contornos irregulares, com limites pouco precisos e tonalidade ferruginosa quando não estão em reação. As lesões característica dessa forma clínica apresentam área central circular, hipocrômica, plana, bem delimitada e com a periferia infiltrada formando um bordo espesso que se difunde gradativamente para a pele aparentemente sã circunvizinha. Os nervos periféricos podem estar comprometidos de maneira extensa e intensa principalmente quando sofrem reagudização da doença, denominada de reação tipo I ou reação reversa (VAN BEERS et al., 1999; YAWALKAR, 2002).

A forma clínica Indeterminada, sem resistência imunológica, evolui para a forma Virchowiana e que suas lesões podem se manifestar como um surto de eritema nodoso ou uma infiltração difusa com formação de pápulas, tubérculos, nódulos e placas, denominadas genericamente de hansenomas, que ocorrem por total ausência de resistência ao bacilo. Há infiltração nasal, lesões amigdalíneas da mucosa bucal, palato mole, palato duro, pilares e língua e o comprometimento neural nos casos iniciais é discreto, podendo agravar-se com a evolução da doença (Figura 11,12 e 13) (TALHARI & NEVES, 1997; YAWALKAR, 2002).





**Figura 12**

**Hanseníase Dimorfa Virchowiana:** Numerosas placas disseminadas, lesões anulares, pápulas e máculas, com baixa perda de sensibilidade.

Fonte: SILVA, 2007



**Figura 13**

**Hanseníase Virchowiana:** Acentuada infiltração difusa "fácies leonina", madarose, perda de cílios.

Fonte: GUINTO et al., 1990

A resposta individual ao bacilo de Hansen pode ser avaliada pela reação de Mitsuda que avalia a capacidade de resposta imune, após injeção intradérmica de uma suspensão de *M. leprae* mortos. A reação positiva é observada pela formação de pápula infiltrada, e negativa quando não há alteração cutânea. A reação de Mitsuda associada ao índice baciloscópico, realizado pela pesquisa de Bacilos Álcool Ácido Resistente (BAAR) na lesão e linfa em sítios definidos, demonstram que os pacientes suscetíveis, apresentam menor resistência ao bacilo e carga bacilar elevada com Mitsuda negativo e os pacientes resistentes ao bacilo apresentam hiperreatividade imunológica e carga bacilar negativa. As formas clínicas e imunológicas intermediárias nesses espectros podem apresentar um equilíbrio entre estes dois fatores (FOSS, 1997; TRAO, 1997).

A complicação maior desta doença se faz pela deterioração neural, assim é que, o diagnóstico histopatológico está baseado na detecção dos bacilos ou do dano que ele induz em nervos cutâneos ou periféricos. Este dano pode ocorrer em todo o espectro da doença, sendo que na forma Indeterminada ocorre nos ramúsculos nervosos da pele e é raríssimo nos troncos nervosos periféricos normalmente comprometidos a partir da forma tuberculóide. A destruição dos nervos periféricos provoca a perda da sensibilidade e/ou paralisia motora, cujos efeitos podem progredir com

infecções freqüentes, osteomielite, reabsorção óssea com perda de dígitos ou deformidades resultantes de traumas devido à perda da sensibilidade (SAMPAIO et al., 2002).

O tratamento precoce da hanseníase reduz significativamente a extensão neural e em conseqüência o aparecimento das deformidades que desfiguram o paciente, pois o longo processo de doença é a maior causa do dano funcional dos nervos (TRAO, 1997).

Os pacientes que recebem alta depois de completado o tratamento com multidrogaterapia e com ausência de bacilos viáveis na microscopia de raspado celular, apresentam neurite persistente e comprometimento neural pós-cura que pode ser devido à morte bacteriana ou tentativa do hospedeiro na realização do “clareamento” bacteriano ou de seus componentes, porém isso ainda não está muito claro (SAMPAIO et al., 2002).

Até bem pouco tempo, o controle da hanseníase nas populações se fazia de forma segregadora, e isto ocorria por falta de conhecimento científico de tratamento e de opções de tratamento e para completar a crueldade das medidas ainda existia o estigma em relação aos doentes. A recomendação da polioquimioterapia proposta de OMS (Organização Mundial de Saúde) na década de 80, melhorou consideravelmente a situação dos doentes de hanseníase, em conjunto com as medidas profiláticas (OMS/OPAS, 1989; WHO, 2002).

A hanseníase, devido a todo o comprometimento neural é considerada uma doença incapacitante, que marginaliza e leva a diminuição ou a interrupção da capacidade produtiva de milhares de pacientes (WHO, 2000).

#### **1.4.1 Classificação das Formas Clínicas da Hanseníase**

Várias classificações foram propostas ao longo dos anos, sendo as seguintes, as mais importantes e mais utilizadas:

- **Classificação de Madri:** Durante o VI Congresso Internacional de Leprologia, realizado em Madri, em 1953, foi proposta esta classificação baseada em 4 critérios: Clínico. Imunológico, histológico e o bacteriológico. É a mais utilizada nos serviços de saúde pública do Brasil para

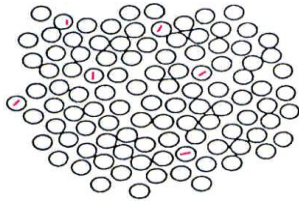
diagnóstico e organiza esta doença em duas formas polares imunologicamente estáveis – forma tuberculóide (HT) e forma virchowiana (HV) – e dois grupos imunologicamente instáveis – o grupo indeterminado (HI) e o grupo dimorfa (HD) (OMS e OPAS, 1989).

- **Classificação Ridley e Jopling:** Realizada pelos médicos Ingleses, Ridley e Jopling, em 1966, que apesar de considerar os critérios acima, está baseada, eminentemente, no critério histopatológico e sugere a possibilidade das formas evoluírem no espectro da doença, ora ao pólo de resistência (TT), ora ao pólo anérgico (LL), com 4 grupos imunologicamente instáveis: I – BT – BB – BL.
- **Classificação da OMS (Organização Mundial de Saúde):** Proposta em 1982 e tem fundamento nos aspectos clínicos através do número de lesões apresentados. Pacientes com 6 ou mais lesões serão considerados multibacilares (MB - formas HD e HV) e os com menos de 6 lesões serão considerados paucibacilares (PB) - HI e HT (WHO, 1982).
- **A classificação pelo Índice Baciloscópico:** Ridley, em 1971, avalia a densidade dos bacilos vivos e mortos nos esfregaços de lesões cutâneas corados pelo método de Ziehl-Neelsen, usando a escala logarítmica de Ridley, que é baseada no número de bacilos vivos, observados em campos microscópicos através da objetiva de imersão (WHO, 2002).

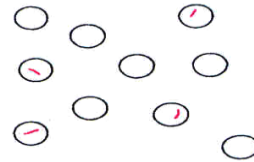
A baciloscopia do raspado celular é realizada em indivíduos que apresentam sinais e/ou sintomas dermatoneurológicos compatíveis com hanseníase, e que deve ser coletado de quatro sítios, segundo recomendações do Ministério da Saúde: lóbulo da orelha direita (OD); lóbulo da orelha esquerda (OE); cotovelo direito ou esquerdo e lesão (OMS&OPAS, 1989; YAWALKAR, 2002).

**Figura 14:** Representação diagramática do Índice Bacteriológico de esfregaços dérmicos de acordo com a escala de Ridley e Jopling.

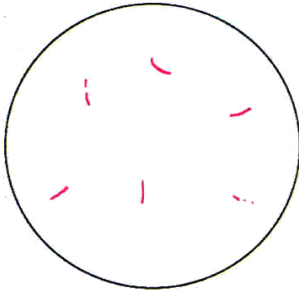
**IB 1 + = 1-10 bacilos em média em 100 campos examinados e visualizados com objetiva de 100 x (imersão)**



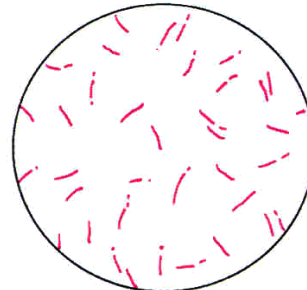
**IB 2 + = 1-10 bacilos em média em 10 campos examinados e visualizados com objetiva de 100 x (imersão)**



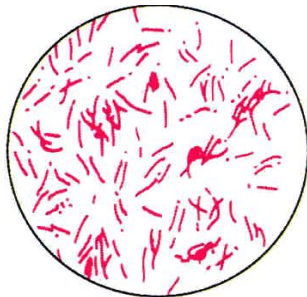
**IB 3+ = 1-10 bacilos, em média por campo, examinado e visualizados com objetiva de 100 x (imersão)**



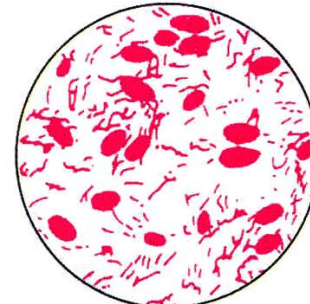
**IB 4+ = 10-100 bacilos, em média por campo, examinado e visualizados com objetiva de 100 x (imersão)**



**IB 5+ = 100-1000 bacilos, em média por campo, examinado e visualizados com objetiva de 100 x (imersão)**



**IB 6+ = Mais de 1000 bacilos, em média por campo, examinado e visualizados com objetiva de 100 x (imersão)**



Fonte: MS, 2002

Os esfregaços são corados pelo método de Ziehl-Neelsen. Este exame é muito útil para diagnóstico e classificação dos pacientes para fins de tratamento em multibacilares, formas clínicas Dimorfa e Virchowiana, que apresentam Índice baciloscópico diferente de zero em qualquer um dos sítios de coleta, e paucibacilares, formas clínicas Indeterminada e Tuberculóide com índice baciloscópico igual a zero em qualquer dos sítios examinados. A multidrogaterapia é administrada durante 12 meses para os pacientes Multibacilares e de seis meses para os paucibacilares (Figura14)

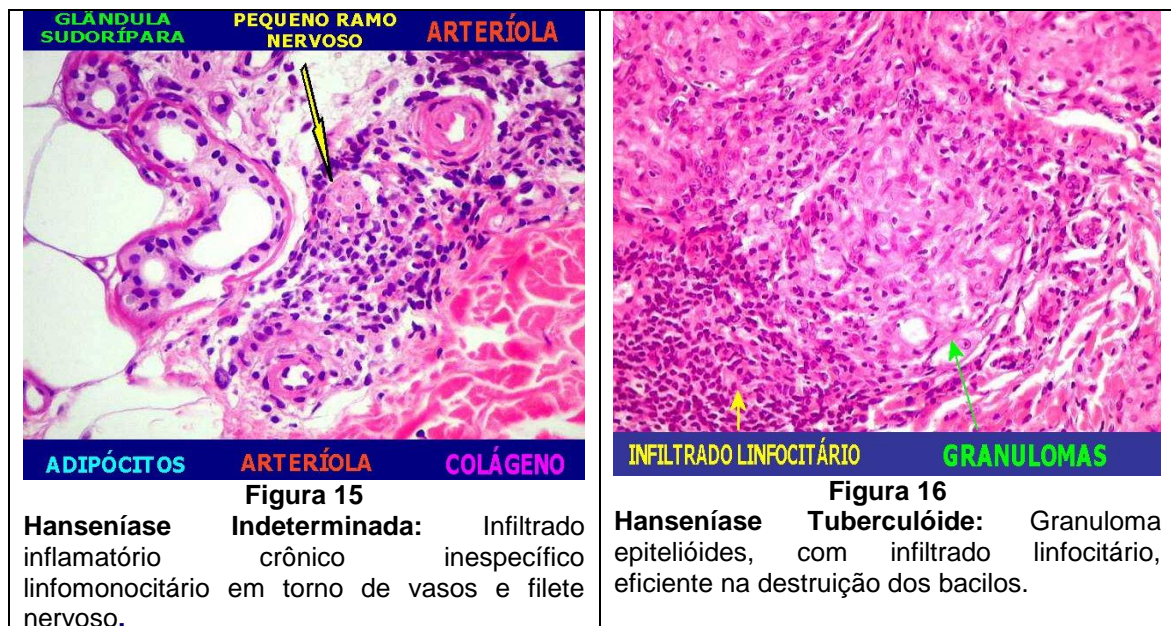
(OMS & OPAS, 1989; YAWALKAR, 2002).

Baseada em critérios histológicos, a classificação proposta por Ridley e Jopling em 1962, originariamente planejada para fins de pesquisa explicita as transformações que correm no tecido dos pacientes portadores de qualquer forma de hanseníase.

Fonte: UNICAMP, 2007

Fonte: UNICAMP, 2007

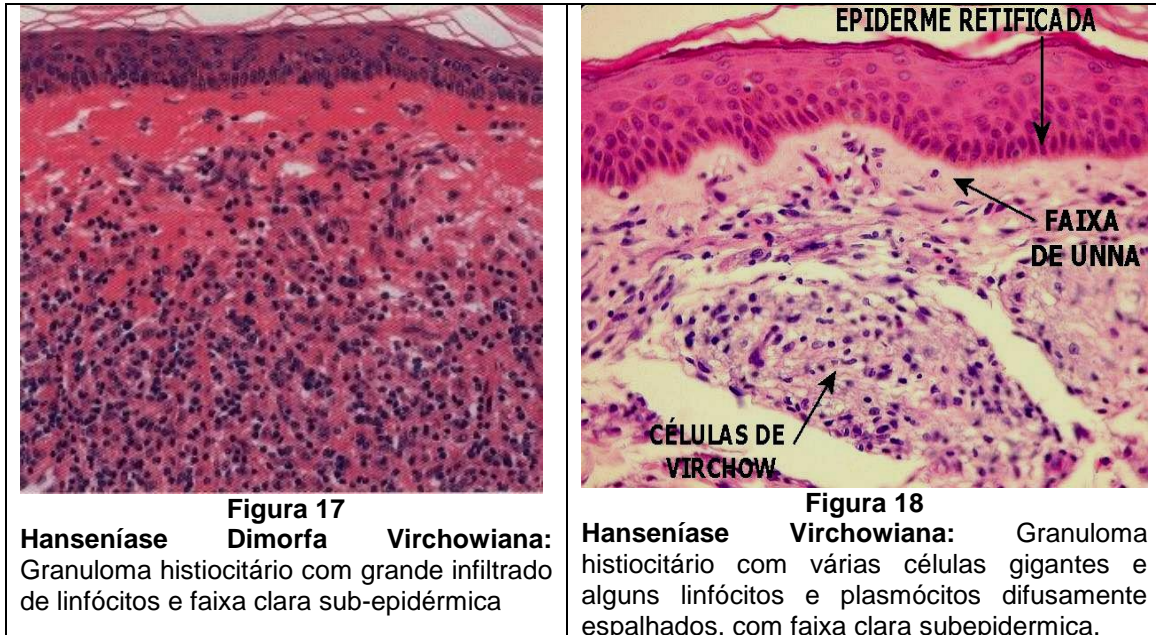
Na forma Indeterminada, os bacilos de Hansen estão ausentes ou em pequenas quantidades no infiltrado celular incipiente, formado somente de linfócitos em torno de ramos nervosos e anexos da pele (Figura 15). Na Tuberculóide (TT), os BAAR (bacilos álcool ácido resistente) quase nunca são encontrados no infiltrado que consiste de ilhas de células epitelióides rodeado por uma densa massa de linfócitos, os quais pressionam a epiderme mostrando ausência de zona livre sub-epidérmica, com presença das células gigantes de langerhans com infiltração e destruição dos ramos nervosos, o que dificulta o seu reconhecimento (Figura 16).



A forma Borderline Tuberculóide (BT) apresenta infiltrado que está parcialmente ou completamente separado da epiderme por uma zona livre de infiltração rica em colágeno, constituído



de células epitelióides e um número menor de linfócitos que no TT, e as células gigantes de Langerhans podem ou não estar presentes.



Fon  
te:

GUINTO et. al., 1990

Fonte: UNICAMP, 2007

Na forma Borderline Borderline (BB) há um número bem reduzido de bacilos presentes nos histiócitos e o infiltrado é visivelmente separado da epiderme por uma zona livre e consiste de células epitelióides semelhantes a histiócitos (OMS & OPAS, 1989; YAWALKAR, 2002).

A forma Borderline-lepromatosa (BL) apresenta infiltrado de pequenos macrófagos vacuolizados com grande número de bacilos no seu interior e linfócitos dispersos, sem, entretanto formar globias (Figura 17). Na forma Lepromatosa (LL) se caracteriza por apresentar um grande número de bacilos no infiltrado celular com macrófagos dispersos com a presença de raros linfócitos, epiderme retificada pela atrofia da epiderme, em geral devido a compressão exercida pelos hansenomas na derme, além da freqüente observação da faixa de Unna que se caracteriza pela fina camada de colágeno sub-epidérmica sem a presença de células de virchow (Figura 18) (OMS & OPAS, 1989; YAWALKAR, 2002).

## 2 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA HANSENÍASE

Os testes laboratoriais são de extrema importância em países endêmicos, pois, além de auxiliar no diagnóstico da hanseníase, contribuem para a classificação da forma clínica e em consequência na administração correta do esquema terapêutico, além de subsidiar o controle de indivíduos sadios com alto risco de desenvolver formas graves de hanseníase. Não há um padrão ouro para o diagnóstico da hanseníase, que em geral é baseado em critérios clínicos como a presença de placas avermelhadas ou hipopigmentadas com perda de sensibilidade, espessamento dos nervos periféricos e a presença de bacilos álcool ácido resistente nos raspados celulares de pele e em biópsias (KURABACHEW et al., 1998).

A identificação do *M. leprae* é dificultada, em parte, pela inabilidade de ser isolado “*in vitro*”. Entretanto o diagnóstico da hanseníase pode ser bem estabelecido na maioria dos casos, pelos métodos tradicionais: exame clínico, baciloscópico e histopatológico (TORRES et al., 2003).

O diagnóstico mais utilizado na rotina está baseado na detecção microscópica do bacilo no raspado celular da pele em combinação com o histopatológico e a evolução clínica. Para o achado deste patógeno, nestes métodos laboratoriais, é necessária a presença de  $10^4$  organismos por grama de pele, o que determina sua baixa sensibilidade, principalmente para os pacientes acometidos com as formas paucibacilares da hanseníase, ou seja, com baixo número de bacilos (KURABACHEW et al., 1998; ALMEIDA et al., 2004).

Além do uso rotineiro da baciloscopia, exame laboratorial prioritariamente recomendado pela Organização Mundial de Saúde e Ministério da Saúde do Brasil para diagnóstico da hanseníase, também são usados o histopatológico de lesões de pele para determinar a categoria da doença, considerado padrão ouro, além dos testes sorológicos e métodos moleculares (FIALLO et al., 1992; KLASTER et al., 1996).

Os testes sorológicos baseados no antígeno específicos do *M. leprae*, principalmente o glicolípido fenólico 1, tem aberto novos métodos de monitoramento da infecção desde que os níveis

de anticorpos estejam associados com a intensidade de exposição e envolvimento sistêmico desta bactéria. O desenvolvimento de ensaios simples usando esses novos glicolipídeos mostra serem adequados para uso em condições de campo, como por exemplo, a pesquisa de anticorpos IgM para PGL-I pela técnica da fita (ML Dispstick) e técnica do fluxo lateral de 10 minutos (ML Flow) (BÜHRER, 1998).

Estudos envolvendo testes imunológicos para identificação sub-clínica tem se revelado inconclusivo, por apresentarem baixa sensibilidade. Mesmo com detecção imunológica satisfatória, existe possibilidade de indivíduos estarem soropositivos por causa de infecções anteriores, não fornecendo informações seguras sobre o status bacteriológico atual (DE WIT et al., 1991).

Durante o tratamento, os níveis de anticorpos tendem a diminuir devido a redução do Índice Bacteriológico – IB, e a carga inicial dessa bactéria presente no organismo determinam o grau dessa diminuição. Assim é que, pacientes que apresentam carga bacteriana elevada antes do tratamento persistem com níveis elevados de anticorpos por muitos anos após a terapia. O aumento dos níveis de anticorpos em contatos de pacientes hansenianos é um indicativo do desenvolvimento de doença clínica. A sorologia dos contatos de novos casos índices multibacilar - MB, identifica os infectados que podem estar no período de incubação, sendo, portanto, potencial fonte de futuras transmissões (VAN BEERS et al., 1999; BÜHRER et al., 2001; BÜHRER et al., 2003).

Na atualidade os testes cutâneos e sorológicos disponíveis não apresentam sensibilidade e especificidade necessárias para como métodos diagnósticos serem capazes de detectarem e quantificarem o *M. leprae* (MARTELLI et al., 2002).

A Biologia molecular, através do avanço dos estudos, tem contribuído significativamente para o entendimento de várias etiologias das doenças humanas. As técnicas de recombinação dos ácidos nucléicos têm permitido a identificação de vários genes responsáveis por doenças hereditárias, dos agentes infecciosos e seus mecanismos de ação. Assim como, tem apresentado também aplicação bastante expressiva na pesquisa de marcadores genéticos úteis ao diagnóstico laboratorial (HIRATA & HIRATA, 1998).



Atualmente, métodos na Biologia molecular têm sido desenvolvidos para diagnóstico confiável e sensível ferramenta de identificação de muitas doenças infecciosas como a específica amplificação do *M. leprae* pela PCR. Esta técnica é a mais usada no diagnóstico da hanseníase devido a sensibilidade, especificidade e rapidez na detecção do microorganismo, mesmo em baixos números, em diversos espécimes clínicos, como raspado celular, linfa, sangue, biopsia de pele e de nervos e swab nasal, tanto de pacientes hansenianos quanto dos contatos saudáveis. Muitas informações existem na literatura considerando a utilidade de diferentes e específicas seqüências alvos para PCR e sonda de DNA para *M. leprae* (FIALLO et al., 1992; KLASTAR et al., 1993; TORRES et al., 2003).

As seqüências alvos para PCR e sondas específicas de DNA do *M. leprae* tal com genes codificando os antígenos protéicos 65 kDa, 18 kDa e 36 kDa, e seqüências repetidas desta bactéria são detectadas em espécimes biológicos e são mais sensíveis e específicas que os métodos tradicionais de pesquisa do bacilo (ALMEIDA et al., 2004).

Esta técnica pode também ser aplicada no estudo da transmissão da hanseníase e manutenção da infecção nos reservatórios para detecção do DNA de *M. leprae* na cavidade nasal, pois esta rota está envolvida na disseminação deste microorganismo e o nariz é também considerado a porta de entrada para este bacilo (TORRES et al., 2003). Em estudo realizado em países endêmicos por Smith et al (2004), foi detectado o DNA do *M. leprae* em swab nasal de indivíduos saudáveis, confirmando a transmissão pelas vias aéreas, desta bactéria.

A avaliação da aplicação clínica da técnica de PCR para detecção do DNA do bacilo de Hansen em biopsias da mucosa nasal de pacientes hansenianos não tratados e de seus contatos obteve especificidade de 89,9%, sensibilidade de 69,2% e uma acurácia de 82,8%, em pesquisa realizada em Uberlândia, Minas gerais, demonstrando que o bacilo invade a mucosa nasal (PATROCÍNIO et al., 2005).

Outro estudo, realizado na Índia com 39 pacientes, evidenciou que a PCR apresenta maior sensibilidade que o exame clínico e o histopatológico, quando detectou em 11 dos pacientes o DNA da bactéria, enquanto que no histopatológico foi positivo para apenas dois dos pacientes estudados

(JOB et al., 1997). Também através desta técnica, foi detectado a presença da proteína 36 kDa na urina de 36,4% (4/11) pacientes com hanseníase multibacilar e 40% (2/5) em paciente com hanseníase paucibacilar (YOON et al., 1993; PARKASH et al., 2004).

A detecção do DNA do agente etiológico da hanseníase pela técnica da PCR, realizado por Wichitwechkarn et al. (1995), em 31 pacientes multibacilares, mostrou positividade para 87,1% (27/31) de espécimes de biópsia e 41,9% (13/31) de esfregaços de pele e nos paciente paucibacilares foram encontrado 36,4% (8/22) nas biópsias de pele e 18,2% (4/22) em esfregaços de pele.

Nas amostras de biópsia de pele fixadas pela formalina neutra a amplificação do DNA do *M. leprae* foi positiva para 92% dos pacientes com baciloscopia positiva e, 61% para os pacientes com baciloscopia negativa, enquanto que em 100% das amostras de biópsia congeladas foram positivas para os pacientes com baciloscopia positiva e 56% para os com baciloscopia negativa (DE WIT et al., 1991). Em outro estudo também com espécimes de biópsias de pacientes hanseníacos, a PCR, obteve resultados positivos em aproximadamente de 61% em pacientes hansenianos com resultados negativos para pesquisa de BAAR, mostrando que a PCR é uma ferramenta bastante sensível e importante para o diagnóstico laboratorial dessa doença (YOON et al, 1993).

Pacientes paucibacilares tratados com a multidrogaterapia após um longo período de acompanhamento e com altos níveis de casos positivos pela PCR, sugerem que apesar de completado o tratamento até a cura, parte dos bacilos continuam circulando no sangue, sem aparentemente causar nenhum dano ao hospedeiro. Isto, junto com o fato de que somente um pequeno número de indivíduos infectados, atualmente, desenvolve a doença, sugere que os resultados da PCR devem estar sempre atrelados a evolução clínica e deva ser usada somente para confirmação de casos de difícil diagnóstico pelos métodos convencionais. (SANTOS et al., 2001).

Todos os estudos realizados usando a biópsia de pele têm confirmado que a técnica do PCR é capaz de aumentar a sensibilidade na detecção do *M. leprae*, sobrepondo-se na sensibilidade aos exames baciloscópico e histopatológico convencionais. Mas, apesar da alta especificidade,

sensibilidade e rapidez que a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase proporciona, ainda não está amplamente disponibilizada para a detecção do *M. leprae* em espécimes clínicos de pacientes hansenianos por apresentar alto custo e exigir tecnologia avançada, sendo usada apenas nos países desenvolvidos como ferramenta para elucidar os casos mais difíceis de diagnosticar pelas técnicas convencionais e subsidiar o entendimento da epidemiologia deste e de outros patógenos (MARTELLI et al., 2002).

Muitos locais do Brasil, assim como em outros países endêmicos, são adotados programas de controle vertical, porém é necessário atentar que as implicações destas ações são imprevisíveis em longo prazo, devido a eliminação da hanseníase como um problema de saúde pública depender menos dos fatos científicos e muito mais das questões operacionais.

O controle da hanseníase sempre foi um grande desafio para a saúde pública por ser uma doença insidiosa que apresenta um longo período de incubação em decorrência do desenvolvimento lento do seu agente etiológico, com riscos elevados de transmissão, de recidiva e de eminente comprometimento neural, além do estigma imputado aos seus portadores, o que implica na real necessidade de diagnóstico precoce para, principalmente, promover ações que possam interromper a cadeia de transmissão.

Os profissionais bem treinados e instrumentalizados para realizar diagnóstico precoce, monitorar a eficácia da quimioterapia, a incidência de recidivas, identificação de pacientes com alto risco de desenvolver reações após o tratamento e, até mesmo, controlar pessoas sadias que possuem alto risco de desenvolver formas graves de hanseníase, é tudo que se faz necessário para o controle da hanseníase e futura eliminação desta doença. Em 2006, o Estado do Pará, detectou 4.282 casos novos o que representa 9,64% de todos os casos detectados no Brasil, e que evidencia a atuação dos profissionais de saúde comprometidos com a saúde coletiva e com o programa de controle desta doença, além das pesquisas realizadas que fornecem aporte científico que possibilitam proposição de medidas mais adequadas ao problema.

Nos países endêmicos é de fundamental importância que se disponha de um teste

laboratorial com sensibilidade e especificidade para auxiliar na classificação correta das formas clínicas da hanseníase, na administração da terapia adequada a forma clínica apresentada pelo paciente, no controle dos indivíduos sadios com risco de desenvolver formas graves.

O desenvolvimento deste estudo tem como expectativa contribuir para a detecção do *M. leprae* através do uso da PCR como ferramenta de diagnóstico laboratorial de alta sensibilidade e especificidade, o que possibilita a identificação deste agente etiológico de forma mais rápida e eficiente, principalmente nas formas de baixa eliminação bacilar e assim proporcionar tratamento adequado e medidas de controle efetivas que possam contribuir para o controle e a eliminação da hanseníase no Estado do Pará.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a sensibilidade do método de PCR na detecção do *M. leprae* em espécimes clínicos (fragmentos de tecido e fluido sanguíneo) coletados de lesões hansênicas, em pacientes portadores de hanseníase nas diferentes formas clínicas.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar a sensibilidade da PCR na detecção do *M. leprae* nas diferentes formas clínicas
- Correlacionar o resultado da PCR com os métodos convencionais de diagnóstico e com a forma clínica da hanseníase desenvolvida pelo paciente.
- Identificar o melhor método de conservação das amostras e de procedimentos de extração do DNA, além dos marcadores usados para a realização do PCR.

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 CASUÍSTICA E MÉTODOS**

#### **4.1.1 Tipo de Estudo**

Foi realizado um estudo transversal para avaliar a sensibilidade da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) na detecção do DNA do *M. leprae* em fragmentos de tecido e fluído sanguíneo, retirados de lesões hansênicas de pacientes portadores de hanseníase nas diversas formas clínicas e com tempo variado de tratamento, segundo a classificação de Ridley e Jopling (1966) (T, BT, BB, BV e V), comparando com outros métodos convencionais de diagnóstico laboratorial, como baciloscopia e histopatologia e com as formas clínicas.

A carga bacilar foi avaliada pela baciloscopia dos raspados dérmicos retirados dos lóbulos das orelhas direita e esquerda, cotovelos direito e esquerdo e corados pelo método de Ziehl-Neelsen e a diagnóstico histopatológico dos fragmentos de tecido retirados de lesões hansênicas do paciente foi realizado segundo a classificação de Ridley e Jopling e a baciloscopia da biópsia que se apresentam como ausência e presença de Bacilos Álcool Ácido Resistentes.

#### **4.1.2 População de Estudo**

O estudo foi realizado em 20 pacientes diagnosticados, segundo critérios clínicos e laboratoriais preconizados pelo Ministério da Saúde do Brasil, com quaisquer das formas clínicas da hanseníase, com ou sem terapêutica específica anterior e que foram atendidos no Ambulatório de Dermatologia do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará e no Hospital Municipal de Itaituba - Pará, selecionados no período de agosto de 2006 a setembro de 2007.

#### **4.1.3 Critérios de Inclusão**

- Pacientes maiores de 15 anos de ambos os sexos, procedentes de qualquer município do Estado do Pará e de outros Estados brasileiros, com diagnóstico de hanseníase, segundo os critérios clínicos e laboratoriais do Ministério da Saúde do Brasil, através de Histopatologia com pesquisa de BAAR e Baciloscopia do raspado dérmico e que concordarem em participar da pesquisa assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE.

#### **4.1.4 Critérios de Exclusão**

- Pacientes menores de 15 anos, diabéticos, doentes mentais, grávidas, com reação hansênicas, portadores de outras doenças neurológicas e com co-morbidades que envolvam a imunodeficiência e os que não concordarem em participar da pesquisa (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE).

#### **4.1.5 Coleta de Dados e Aspectos Éticos**

Os pacientes selecionados clinicamente para este estudo foram devidamente informados sobre a pesquisa de forma clara e objetiva, e posteriormente convidados a assinar de livre e espontânea vontade o Termo de Compromisso Livre e Esclarecido (Apêndice I) em acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, possibilitando de forma ética a coleta de material biológico e o acesso aos dados registrados em seus prontuários.

Este estudo foi submetido a avaliação e aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Núcleo de Medicina Tropical (CEP/NMT) da Universidade Federal do Pará (UFPA) sob o protocolo nº 11/2006-CEP/NMT (Anexo I).

## **4.2 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL**

### **4.2.1 Amostras Biológicas**

As amostras foram obtidas por biópsia de tecido, swab pós-biópsia e raspado dérmico de pacientes selecionados clinicamente como portadores de hanseníase.

#### 4.2.1.1. Raspado Dérmico

Após incisão realizada com bisturi em cada lóbulo da orelha do paciente, foram coletados raspados celulares para preparação de esfregaços posteriormente corados pelo método de Ziehl-Neelsen para pesquisa de Bacilos Álcool Ácido Resistentes, realizadas no Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Ensino Superior do Pará.

#### 4.2.1.2 Amostra de Tecido

A coleta das amostras de tecido foi realizada em todos os pacientes com lesões sugestivas de hanseníase, após anti-sepsia com álcool iodado, seguida de anestesia com lidocaína a 2% no local das lesões ativas selecionadas e, com auxílio de punch nº 3 foi retirado fragmento de tecido.

Após a coleta, o fragmento de tecido sofreu cortes para obtenção de fragmentos de 5 µm de espessura. Uma parte deste fragmento de tecido foi acondicionado em formalina a 10% e enviado ao laboratório de histopatologia do Núcleo de Medicina Tropical, para a classificação histopatológica da forma clínica do paciente e a outra parte foi colocada em 400 µl de tampão de LISE 2 (10 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1 mM Tris, 1% SDS) mantida em temperatura ambiente e transportada ao laboratório de Biologia Molecular e Celular do Núcleo de Medicina Tropical.

#### 4.2.1.3 Swab pós-biopsia

As amostras de fluido sanguíneo foram obtidas com auxílio de swabs esterilizados introduzidos nas incisões após biópsia. O fluido sanguíneo foi retirado do swab através de movimentos rotatórios após sua imersão em 400 µL de solução de LISE 1 (1mg/mL de proteinase K em 100 mM de Tris-HCl, pH 8,5, 0,05% Tween 20) e de solução de LISE 2 (10 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1 mM Tris, 1% SDS).

As amostras de fluido sanguíneo conservadas em solução de Lise 1 foram refrigerados imediatamente enquanto que as amostras conservadas em Lise2 foram mantidas em temperatura ambiente e ambas foram transportadas ao laboratório de Biologia molecular do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará.

Também foram colhidos raspados dérmicos, biópsias de tecido e swab pós-biópsia de pacientes lepromatosos, utilizando os métodos descritos acima, com a finalidade de uso como controle positivo na reação de PCR.

#### **4.2.2 Extração do DNA do *M. leprae***

Foram aplicados três protocolos de extração de DNA com o objetivo de identificar o melhor para o diagnóstico da hanseníase pela técnica da PCR, um para amostras conservadas em tampão de Lise 1 e outro para as amostras em Lise 2.

a- Fragmentos de tecido e fluido sanguíneo conservados em solução tampão de LISE 2

Protocolo1:

Nas amostras de biópsia de tecido conservadas em solução de LISE 2 foram adicionadas proteinase K (numa concentração final de 50 µg/mL), seguida de incubação a 42 °C durante 2 horas. O DNA foi obtido por meio de extração utilizando o fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1), conforme Sambrook et al. (1989) e precipitado com 1/10 do seu volume pela adição de solução de acetato de sódio 3M, pH 7,0 e 2 ½ volumes de etanol absoluto gelado. Foi mantido a -20°C por 8 horas ou mais e então o material foi centrifugado a 10.000 x g por 10 minutos à temperatura



ambiente. Todo o sobrenadante foi desprezado e o sedimento seco, depois suspenso em 30  $\mu$ L de tampão TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) e mantido a 4°C até o momento do uso. Dois microlitros (2 $\mu$ L) da amostra foram utilizados em cada reação de PCR.

b- Flúido sanguíneo conservados em solução tampão LISE 1

Protocolo 2:

As amostras de fluido sanguíneo conservados em solução de LISE 1 foram incubadas sob óleo mineral a 60°C durante toda noite. A proteinase K foi então inativada por incubação a 97°C por 15 minutos, conforme Jadhav et al. (2001). Posteriormente, foi submetida à centrifugação por 10 segundos a 10.000 x g. Dois microlitros (2 $\mu$ L) da amostra foram utilizados em cada reação de PCR.

Protocolo 3:

As amostras de fluido sanguíneo conservados em solução de LISE 1 foram incubadas sob óleo mineral a 60°C durante toda noite. A proteinase K foi então inativada por incubação a 97°C por 15 minutos, conforme Jadhav et al. (2001). Posteriormente, foi submetida à centrifugação por 10 segundos a 10.000 x g. O DNA foi obtido por meio de extração utilizando o fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1), conforme Sambrook *et al.* (1989) e precipitado com 1/10 do seu volume pela adição de solução de acetato de sódio 3M, pH 7,0 e 2 ½ volumes de etanol absoluto gelado. Foi mantido a -20°C por 8 horas ou mais e então o material foi centrifugado a 10.000 x g por 10 minutos à temperatura ambiente. Todo o sobrenadante foi desprezado e o sedimento seco, depois suspenso em 30  $\mu$ L de tampão TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) e mantido a 4°C até o momento do uso. Dois microlitros (2 $\mu$ L) da amostra foram utilizados em cada reação de PCR.

#### **4.2.3 Amplificação do DNA do *M. leprae* pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**

As amostras foram testadas com diferentes pares de iniciadores que foram preparados pela Invitrogen:

- a) **S13** (5' – CTC CAC CTG GAC CGG CGA T – 3') e **S62** (5'– GAC TAG CCT GCC AAG TCG – 3'), que amplificam parte do gene codificador de antígeno rico em prolina “*pra*” do *M. leprae*, um fragmento de 531 pb, desenhado por Hartskeerl e colaboradores em 1989 (De WIT et al., 1993).
- b) **R1** (5' – CGG CCG GAT CCT CGA TGC AC – 3') e **R2** (5' – GCA CGT AAG CTT GTC GGT GG-3'), que amplificam um fragmento de 372pb de seqüências repetitivas (WOODS & COLE, 1989, 1990).
- c) **LP1** (5' - TGC ATG TCA TGG CCT TGA GG- 3') e **LP2** (5' – CAC CGA TAC CAG CGG CAG AA – 3'), que amplificam fragmento de 129 pb. (DONOGHUE et al, 2001).

Para a PCR, cada reação de amplificação foi feita em um volume final de 25 µL contendo 2,5 U/µL de *Taq* DNA polimerase (GIBCO), 200 µM de cada dNTPs, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 50 mM de KCl, 100 mM de Tris-HCl, pH 8,5, com 50 ηg dos oligonucleotídeos sintéticos (iniciadores) por reação e 2 µL de DNA extraído.

As reações em cadeia de polimerase foram realizadas em termociclador (Eppendorf Mastercycler personal), em condições específicas para cada par de iniciador conforme descrito abaixo (Quadro 1).

**Quadro 1:** Condições da PCR para detecção do DNA do *M. leprae*

Iniciadores	Condições para a PCR
S13 e S62	95°C por 3 minutos; seguido de 03 ciclos de 94°C por 2 minutos; 55°C por 2 minutos e 72°C por 3 minutos; e 30 ciclos de 94 °C por 1 min; 55 °C por 1 min e 72°C por 1 min.
R1 e R2	95°C por 3 minutos; seguido de 32 ciclos de 94°C por 1 minuto; 60°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto; e 72°C por 10 minutos
LP1 e LP2	95°C por 5 minutos, 58°C por 2 minutos e 72°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos; 58°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto; e 72°C por 10 minutos

O produto da PCR foi fracionado em eletroforese horizontal em gel de agarose a 1% em tampão TBE. O fragmento amplificado DNA foi corado com brometo de etídio em concentração final de 0,5  $\mu\text{g/ml}$  e as bandas visualizadas em transluminador de UV e fotografadas com filme Polaroid 665.

#### **4.2.4 - Análise dos Dados**

Os dados obtidos foram analisados no Programa BIOSTAT 3,0 (Ayres et al 2003), através de testes paramétricos e não paramétricos com limite de significância estatística adotado menor ou igual a 0,05. Os testes não paramétricos utilizados foram Teste Exato de Fischer para avaliar em que classificação operacional da hanseníase ocorreu mais resultados positivos em relação ao conservante e os iniciadores; o Teste de Cochran que testou a probabilidade de resultados positivos em cada iniciador, e o teste paramétrico Correlação Linear de Pearson para medir o grau de dependência entre duas variáveis (iniciador x baciloscopia e iniciador x histopatologia).

## 5- RESULTADOS

Dos 20 pacientes selecionados para a realização deste estudo, 55% foram classificados com formas clínicas da hanseníase do pólo tuberculóide e 45% apresentavam formas clínicas do pólo virchoviano, sendo 30% da forma clínica bordeleine bordeleine (Tabela 1).

**Tabela 1:** Distribuição dos pacientes com hanseníase segundo a classificação operacional (PB= paucibacilar e MB= multibacilar) e as formas clínicas

Formas clínicas	Classificação operacional					
	PB		MB		Total	
	N <sup>o</sup>	%	N <sup>o</sup>	%	N <sup>o</sup>	%
BV	0	0	2	10	2	10
BB	0	0	6	30	6	30
VV	0	0	1	5	1	5
TT	11	55	0	0	11	55
<b>Total</b>	<b>11</b>	<b>55</b>	<b>09</b>	<b>45</b>	<b>20</b>	<b>100</b>

BV (bordeleine virchoviana); BB (bordeleine borderleine); VV (virchoviana virchoviana), TT (tuberculoide)

**Tabela 2:** Resultados das baciloscopias dos esfregaços dérmico de acordo com a forma clínica dos pacientes com hanseníase.

Formas clínicas	Índice baciloscópico dos esfregaços dérmicos					
	Positivo		Negativo		Total	
	N <sup>o</sup>	%	N <sup>o</sup>	%	N <sup>o</sup>	%
BV	2	10	0	0	2	10
BB	1	5	5	25	6	30
VV	1	5	0	0	1	5
TT	0	0	11	55	11	55
<b>Total</b>	<b>4</b>	<b>20</b>	<b>16</b>	<b>80</b>	<b>20</b>	<b>100</b>

Na tabela 2, observa-se que em 25 % (5/20) dos pacientes apresentavam com forma clínica BV (bordeleine virchoviana); BB (bordeleine borderleine); VV (virchoviana virchoviana), BB cuja b: TT (tuberculoide)

Dentre os pacientes classificados como paucibacilares as baciloscopia dos esfregaços dérmicos foram 100% (11/11) negativas e nos multibacilares a positividade foi em 20% (4/9). A sensibilidade da baciloscopia foi de 20% no total (4/20) e de 44,4% (4/9) para as formas multibacilares (Tabela 3).

**Tabela 3:** Resultados das baciloscopias de esfregaços dérmicos, segundo a classificação operacional dos pacientes com hanseníase

Classificação operacional	Índice baciloscópico dos esfregaços dérmicos					
	Positivo		Negativo		Total	
	N <sup>o</sup>	%	N <sup>o</sup>	%	N <sup>o</sup>	%
<b>PB</b>	0	0	11	55	11	55
<b>MB</b>	4	20	5	25	9	45
<b>Total</b>	<b>4</b>	<b>20</b>	<b>16</b>	<b>80</b>	<b>20</b>	<b>100</b>

PB: Paucibacilar; MB: Multibacilar

**Tabela 4:** Resultados da histopatologia com pesquisa de BAAR em fragmentos de tecido, segundo a classificação operacional de pacientes com hanseníase.

Classificação operacional	Histopatologia com pesquisa de BAAR em fragmentos de tecido					
	Positivo		Negativo		TOTAL	
	N <sup>o</sup>	%	N <sup>o</sup>	%	N <sup>o</sup>	%
<b>PB</b>	4	20	7	35	11	55
<b>MB</b>	2	10	7	35	9	45
<b>Total</b>	<b>6</b>	<b>30</b>	<b>14</b>	<b>70</b>	<b>20</b>	<b>100</b>

PB: Paucibacilar MB: Multibacilar

A presença de BAAR nos histopatológicos de fragmentos de tecido foi detectada em 30 % (6/20) dos pacientes com hanseníase, sendo que 22,22% (2/9) foram das formas multibacilares e 36,37% (4/11) das formas paucibacilares (Tabela 4).

**Tabela 5:** Resultados da PCR com iniciadores LP1 e LP2 que amplificam uma seqüência de 129pb em swab pós-biópsia conservados em Lise 1, de pacientes com hanseníase, para detecção de DNA do *M. leprae*, relacionados com a classificação operacional

Classificação operacional	PCR com iniciadores LP1 e LP2 (129pb)					
	Swab pós-biópsia em Lise 1					
	Positivo		Negativo		Total	
	N <sup>o</sup>	%	N <sup>o</sup>	%	N <sup>o</sup>	%
<b>PB</b>	3	15	8	40	11	55
<b>MB</b>	5	25	4	20	9	45
<b>Total</b>	<b>8</b>	<b>40</b>	<b>12</b>	<b>60</b>	<b>20</b>	<b>100</b>

PB: Paucibacilar; MB: Multibacilar; Teste Exato de Fisher:  $\alpha = 0,05$   $p(\text{valor}) = 0,3618$

Observa-se na tabela 5 que a PCR com iniciadores LP1 e LP2 que amplificam seqüência de 129pb, detectou o DNA do *M. leprae* em swab pós-biópsia em 25% (5/20) e 15% (3/20) dos pacientes com hanseníase nas formas multibacilares e paucibacilares, respectivamente. A distribuição de positividade foi de 55,56% (5/9) para multibacilares 27,27% (3/11) para paucibacilares. Do total de pacientes 60 % (12/20) apresentaram resultados negativos A sensibilidade obtida na PCR foi de 40%.

Para verificar se havia diferenças no resultado da PCR considerando duas variáveis, o conservante Lise 1 e as formas clínicas distribuídas na classificação operacional, aplicou-se o Teste Exato de Fisher que demonstrou que o número resultados positivos é o mesmo em ambas as categorias, ou seja, estatisticamente insignificante com  $p(\text{valor}) = 0,3618$  (Tabela 5).

Na tabela 6, observa-se que a PCR com iniciadores LP1 e LP2 que amplificam uma seqüência de 120pb, detectou o DNA do *M. leprae* em swab pós-biópsia conservados em Lise 2 em 15% (3/20), com 22,22% (2/9) e 9,09% (1/20) nas formas multibacilares e paucibacilares, respectivamente. Neste conservante a PCR apresentou sensibilidade de 15%.

Para verificar se havia diferenças no resultado da PCR considerando duas variáveis, o conservante Lise 2 e as formas clínicas distribuídas na classificação operacional, aplicou-se o Teste Exato de Fisher que demonstrou que o número resultados positivos é o mesmo em ambas as categorias, ou seja, considerou os resultados estatisticamente insignificante com  $p(\text{valor}) = 0,5658$ . (Tabela 6)

**Tabela 6:** Resultados da PCR com iniciadores LP1 e LP2 que amplificam uma seqüência de 129pb em swab pós-biópsia, conservados em Lise 2, de pacientes com hanseníase para detecção de DNA do *M. leprae* relacionados com a classificação operacional.

Classificação operacional	PCR com iniciadores LP1 e LP2 que amplificam (129pb)					
	Swab pós-biópsia em Lise 2					
	Positivo		Negativo		Total	
	N <sup>o</sup>	%	N <sup>o</sup>	%	N <sup>o</sup>	%
PB	1	5	10	50	11	45

<b>MB</b>	2	10	7	35	9	55
<b>Total</b>	<b>3</b>	<b>15</b>	<b>17</b>	<b>85</b>	<b>20</b>	<b>100</b>

Teste Exato de Fisher:  $\alpha= 0,05$ ; p (valor) = 0, 5658; PB: paucibacilar; MB: Multibacilar.

Comparando-se a eficácia da PCR com iniciadores LP1 e LP2 que amplificam uma seqüência de 129pb com a baciloscopia de esfregaços dérmicos observou-se que a PCR detectou 31,25% (5/16) nos pacientes com baciloscopia negativa dos esfregaços dérmicos e que houve concordância dos casos em 75% (3/4) (Tabela 7).

Para avaliar a relação entre os resultados da baciloscopia e da PCR em swab pós-biopsia conservados em solução de Lise 1, aplicou-se o teste paramétrico de Correlação Linear de Pearson que considerou a correlação entre as duas variáveis negativa, ou seja, os dados obtidos não apresentam significância estatística ao nível  $\alpha= 0,05$  ( $r$  (Pearson) = 0, 3572 e  $p= 0, 1220$ ). (Tabela 7) (Figura 19)

**Tabela 7:** Resultados da baciloscopia dos esfregaços dérmicos e da PCR com iniciadores LP1 e LP2 que amplificam 129pb em swab pós-biopsia conservados em Lise 1 de pacientes com hanseníase para detecção de DNA do *M. leprae*

Baciloscopia	PCR com iniciadores LP1 e LP2 que amplificam 129pb					
	Swab pós-biopsia em lise 1				Total	
	Negativo		Positivo			
	N <sup>o</sup>	%	N <sup>o</sup>	%	N <sup>o</sup>	%
<b>NEGATIVO</b>	11	55	5	25	16	80
<b>POSITIVO</b>	1	5	3	15	4	20
<b>Total</b>	<b>12</b>	<b>60</b>	<b>08</b>	<b>40</b>	<b>20</b>	<b>100</b>

Teste de correlação de Pearson:  $\alpha= 0,05$ ;  $p= 0, 1220$ ;  $r$  (Pearson) = 0, 3572.

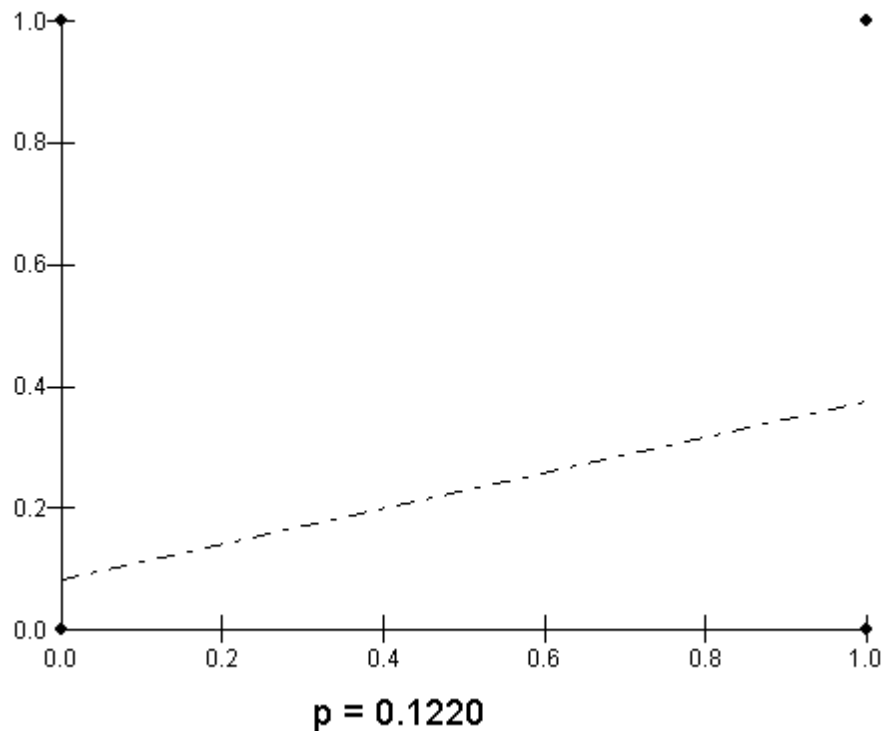


Figura 19:

Correlação entre baciloscopia e PCR com iniciadores LP1 e LP2  
que amplificam 129pb em swab pós-biópsia conservados em  
solução de Lise 1

**Tabela 8:** Resultados da histopatologia com pesquisa de BAAR em fragmentos de tecido e da PCR com iniciadores LP1 e LP2 que amplificam 129pb em swab pós-biópsia conservados em Lise 1 de pacientes com hanseníase para detecção de DNA do *M. leprae*

Histopatologia	PCR com iniciadores LP1 e LP2 que amplificam 129pb					
	Swab pós-biópsia em lise 1					
	Negativo		Positivo		Total	
	N <sup>o</sup>	%	N <sup>o</sup>	%	N <sup>o</sup>	%
<b>NEGATIVO</b>	14	70	2	10	16	80
<b>POSITIVO</b>	3	15	1	5	04	20
<b>Total</b>	<b>17</b>	<b>85</b>	<b>03</b>	<b>15</b>	<b>20</b>	<b>100</b>

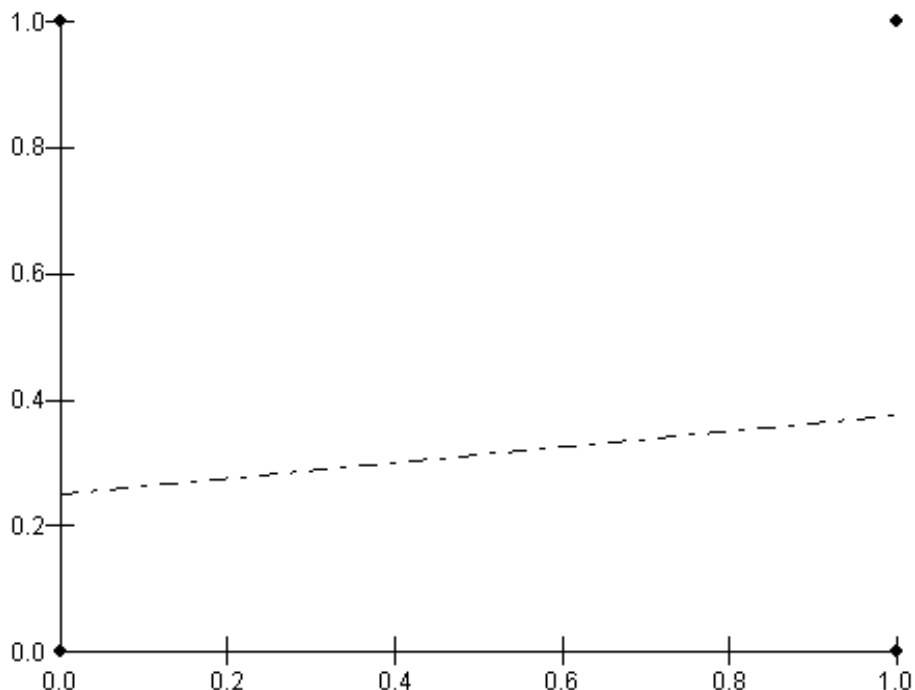
Teste de Correlação de Pearson:  $\alpha = 0,05$ ,  $p = 0,5743$ ,  $r(\text{Pearson}) = 0,1336$ .

Comparando-se a eficiência da PCR com iniciadores LP1 e LP2 que amplificam 129pb com a histopatologia, observou-se que a PCR detectou o DNA do *M. leprae* 12,5% (2/16) de pacientes com histopatologia negativa, apresentando sensibilidade de 15% (3/5) e concordância de 25% (1/4).

(Tabela 8)



Para avaliar a relação entre os resultados da histopatologia e da PCR em swab pós-biopsia conservados em solução de Lise 1, aplicou-se o teste paramétrico de Correlação Linear de Pearson que considerou a correlação entre as duas variáveis negativa, ou seja, os dados obtidos não apresentam significância estatística ao nível  $\alpha = 0,05$  ( $r$  (Pearson) = 0,1336 e  $p = 0,5743$ ). (Tabela 8) (Figura 20)



**Figura 20:** Correlação entre histopatologia com pesquisa de BAAR de fragmentos de tecido e PCR com iniciadores LP1 e LP2 que amplificam 129pb em swab pós-biopsia conservados em solução de Lise 1

Na tabela 9, observa-se que a PCR com iniciadores R1 e R2 que amplificam 372pb detectou o DNA do *M. leprae* em apenas 9.09% (1/11) dos swabs pós-biopsia de pacientes multibacilares e 22,22% (2/9) dos paucibacilares, quando conservados em Lise 1, com sensibilidade de 15% (3/20). Não houve detecção do DNA pela PCR com iniciadores que amplificam 372pb nos swabs pós-biopsia quando conservados em Lise2.

**Tabela 9:** Resultados da PCR R1 e R2 que amplificam 372pb em swab pós-biopsia conservados em Lise 1 e Lise 2 de pacientes com hanseníase para detecção de DNA do *M. leprae*.

Classificação operacional	Lise 1				Lise 2			
	Positivo		Negativo		Positivo		Negativo	
	N <sup>o</sup>	%	N <sup>o</sup>	%	N <sup>o</sup>	%	N <sup>o</sup>	%
<b>PB</b>	1	5	10	50	0	0	11	55
<b>MB</b>	2	10	7	35	0	0	9	45
<b>Total</b>	<b>3</b>	<b>15</b>	<b>17</b>	<b>85</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>20</b>	<b>100</b>

PB (Paucibacilar); MB (Multibacilar)

A PCR com iniciadores S13 e S62 que amplifica 531pb não detectou o DNA do *M. leprae* em swab pós-biópsia conservados em Lise 1. Apresentou 10% de sensibilidade quando conservados em Lise 2, com positividade de 9,09% (1/11) dos paucibacilares e 11.1% (1/9) dos multibacilares (Tabela 10).

**Tabela 10:** Resultados da PCR S13/S62 que amplificam 531pb em swab pós-biópsia conservados em Lise 1 e Lise 2 de pacientes hansenianos para detecção de DNA do *M. leprae*.

Classificação operacional	PCR S13/S62 531pb em swab pós-biópsia							
	Lise 1				Lise 2			
	Positivo		Negativo		Positivo		Negativo	
	N <sup>o</sup>	%	N <sup>o</sup>	%	N <sup>o</sup>	%	N <sup>o</sup>	%
<b>PB</b>	0	0	11	55	1	5	10	50
<b>MB</b>	0	0	9	45	1	5	8	40
<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>20</b>	<b>100</b>	<b>2</b>	<b>10</b>	<b>18</b>	<b>90</b>

PB: Paucibacilar MB: Multibacilar

Comparando-se a PCR 129pb com a PCR 372pb e PCR5 531pb em fragmentos de tecido conservados em Lise 2 observa-se maior sensibilidade de 25% (5/20) na PCR 129pb em relação a PCR 372 pb com 5% (1/20) e a PCR 531 pb com 15% (3/20). A PCR 129pb detectou 18,18% (2/11) nas formas paucibacilares e 27,27% (3/9) nas multibacilares, enquanto que a PCR 372pb detectou o

DNA do *M. leprae* apenas em 11,11% (1/9) das formas multibacilares e a PCR 531pb detectou 9,09% (1/11) nas paucibacilares e 22,2% (2/9) nas multibacilares. (Tabela 11)

O Teste Exato de Fisher foi aplicado para verificar a diferença entre os resultados positivos obtidos com os três iniciadores nos fragmentos de tecido conservados em Lise 2 em ambas as classificações operacionais, constatando que os resultados positivos não são diferentes entre as formas clínicas, considerado, portanto estatisticamente insignificante com valor de  $p=0,6169$ , ao nível  $\alpha=0,05$ . O teste não paramétrico Q de Cochran foi aplicado para verificar a probabilidade dos resultados serem os mesmos para cada iniciador e os resultados obtidos foram considerados diferentes, portanto estatisticamente significativo para os iniciadores LP1 e LP2 em fragmentos de tecido, com valor de  $p=0,0498$  ao nível  $\alpha=0,05$  (Tabela 11).

**Tabela 11:** Resultados das PCR em fragmento de tecido conservado em Lise 2 de pacientes com hanseníase para detecção de DNA do *Mycobacterium leprae*.

Classificação Operacional	PCR em fragmentos de tecido conservadas em Lise 2											
	LP1/LP2(129pb)				R1/R2 (372pb)				S13/S62 (531pb)			
	POSITIVO		NEGATIVO		POSITIVO		NEGATIVO		POSITIVO		NEGATIVO	
	N <sup>o</sup>	%	N <sup>o</sup>	%	N <sup>o</sup>	%	N <sup>o</sup>	%	N <sup>o</sup>	%	N <sup>o</sup>	%
<b>PB (n= 11)</b>	02	10	09	45	00	00	11	55	01	05	10	50
<b>MB (n= 9)</b>	03	15	06	30	01	05	08	40	02	10	07	35
<b>Total (n= 20)</b>	<b>05</b>	<b>25</b>	<b>15</b>	<b>75</b>	<b>01</b>	<b>05</b>	<b>19</b>	<b>95</b>	<b>03</b>	<b>15</b>	<b>17</b>	<b>85</b>

Teste Exato de Fisher:  $\alpha=0,05$   $p$  (valor)= 0,6169.

Teste Q de Cochran:  $\alpha=0,05$ ,  $p$  (valor)= 0,0498

Observou-se na tabela 12 que o iniciador LP1 e LP2 que amplificam 129 pb foi o que apresentou maior positividade na detecção do DNA do *M. leprae* em swabs pós-biópsia conservados em Lise 1, tanto para as formas paucibacilares quanto para as formas multibacilares. Para avaliar a probabilidade dos resultados positivos pela PCR em cada iniciador, aplicou-se o teste não paramétrico Q de Cochran que considerou os resultados obtidos altamente significantes para os iniciadores LP1 e LP2 em swab pós-biópsia em Lise 1 com valor de  $p=0,0043$ , e em Lise 2 os resultados não mostraram significância estatística o valor de  $p=0,0970$ . (Tabela 12)

**Tabela 12:** Resultados das PCR em Swab pós-biópsia conservados em Lise 1 e Lise 2 de pacientes com hanseníase para detecção do DNA do *M. leprae*.

PCR de Swab pós-biópsia												
CO	LP1/LP2 (129 pb)				S13/S62 (531 pb)				R1/R2 (372 pb)			
	Lise 1		Lise 2		Lise 1		Lise 2		Lise 1		Lise 2	
	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG
<b>PB</b>	3	8	1	10	0	11	1	10	1	10	0	11
<b>MB</b>	5	4	2	7	0	9	1	8	2	7	0	9
<b>Total</b>	<b>8</b>	<b>12</b>	<b>3</b>	<b>17</b>	<b>0</b>	<b>20</b>	<b>2</b>	<b>18</b>	<b>3</b>	<b>17</b>	<b>0</b>	<b>20</b>

CO: Classificação operacional; POS: Positivo; NEG: Negativo

Teste Q de Cochran:  $\alpha = 0,05$   $p$  (valor) = 0,0043 (Lise 1);  $p$  (valor) = 0,0970 (Lise 2);

Avaliando a sensibilidade dos três testes realizados para diagnóstico da hanseníase, observou-se que a PCR com os iniciadores LP1 e LP2 que amplificam 129pb na detecção do DNA do *M. leprae* apresentou menor positividade que a histopatologia no caso dos paucibacilares e na baciloscopia no caso dos multibacilares (Tabela 13). Nos pacientes paucibacilares, onde a baciloscopia do esfregaço dérmico foi negativa a PCR foi positiva para 27,27%, com positividade menor que a histopatologia (36,36%). Nas multibacilares a PCR foi positiva para 44,44% semelhante aos resultados obtidos pela baciloscopia e diferente em 50% da histopatologia (Tabela 12). A positividade da PCR quando comparada aos outros testes laboratoriais, através do teste de Correlação Linear de Pearson, mostrou-se estatisticamente sem significância com  $p$  (valor) = 0,1220 (PCR x Baciloscopia) e  $p$  (valor) = 0,5743 (PCR x histopatologia), ao nível  $\alpha = 0,05$  (Tabela 14).

**Tabela 13:** Resultado da baciloscopia dos esfregaços dérmico, da biópsia de pele, PCR 129pb em swab pós-biópsia de lesão de pacientes com hanseníase para detecção do DNA do *M. leprae* de acordo com a classificação operacional

Classificação Operacional	
PB (n=11)	MB (n=9)

Testes	Negativo		Positivo		Negativo		Positivo	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<b>IB esfregaço</b>	11	100	00	00	05	55,56	04	44,44
<b>IB biópsia</b>	07	63,63	04	36,37	07	77,78	02	22,22
<b>PCR129pb</b>	08	72,73	03	27,27	05	55,56	04	44,44

PB: paucibacilar, MB: Paucibacilar, IB: Índice baciloscópico.

**Tabela 14:** Teste de diferenciação de proporções entre os resultados de baciloscopia de lesão de pele, PCR 129pb em lise 1 e lise 2, segundo a classificação operacional de pacientes com hanseníase.

Classificação operacional	% de positividade				IBx129pb Lise 1	IBx129pb Lise 2
	IB	PCR 129pb				
		Lise 1	Lise 2			
<b>PB</b>	0,0	27,27	9,09			
<b>MB</b>	44,44	55,56	22,22	P= 0, 1220	p= 0, 5743	
<b>Positividade geral</b>	20% (4/20)	40% (8/20)	15% (3/20)			

Teste de Correlação Linear de Pearson:  $\alpha = 0,05$

## 6- DISCUSSÃO

As diversas manifestações clínicas da hanseníase resultam da interação entre o homem e o *M. leprae* que são expressas pelos mecanismos fisiológicos diversos e peculiaridades nos sinais e sintomas, na contagiosidade, na evolução e no prognóstico, resultando desde as primeiras referências da doença numerosas classificações. Pela inexistência de diagnóstico padrão, as diversas classificações baseiam-se nos exames clínico, histopatológicos e baciloscópico, porém com a introdução, pela OMS, da poliquimioterapia, surgiu a necessidade de alocar o paciente no correto esquema terapêutico, considerando a associação de drogas e duração do tratamento, assim é que as formas clínicas com índice baciloscópico igual a zero foram classificadas como paucibacilares e as que apresentavam índice baciloscópico maior que zero como multibacilares. E quando há dificuldades do estabelecimento de diagnóstico laboratorial baciloscópico de qualidade, a classificação do paciente com hanseníase se faz pelo número de lesões apresentadas, assim pacientes com mais de 5 lesões são considerados multibacilares e com menos de 5 lesões, paucibacilares (GALLO et al., 2003).

Os pacientes analisados, neste trabalho, fazem parte do grupo etário economicamente ativo, dado relevante, pois como fontes de infecção podem estar disseminando a doença entre seus contatos profissionais (BÜHRER-SÉKULA et al., 2003).

Dos 20 pacientes estudados, 55% (11/20) possuem forma clínica classificadas no pólo tuberculóide, com baciloscopia negativa, padrão típico das regiões endêmicas (CABALIER & PEREZ, 2003). E 45% dos pacientes apresentaram forma clínica multibacilar com baciloscopia positiva para 20% (4/20) demonstrando a baixa sensibilidade deste teste laboratorial, que requer  $10^4$  organismos por grama de material biológico. Esta baixa sensibilidade se acentua particularmente em pacientes paucibacilares onde os BAAR são raros ou ausentes nas amostras, além de não informar sobre a viabilidade e efetividade destes organismos (ALMEIDA et al., 2004; PATROCINIO, et al., 2005), Se neste estudo fosse considerado a baciloscopia como único critério para a alocação dos pacientes, segundo Andrade et al., 1996, teriam sido classificadas 25% dos pacientes multibacilares como paucibacilares, o que constituiria um erro no tratamento.

A histopatologia não é considerada padrão ouro no diagnóstico da hanseníase, porém ainda é o método convencional mais indicado para o estabelecimento do diagnóstico de hanseníase, pois identifica a presença de granulomas epitelióides típico das formas clínicas incluídas no pólo tuberculóide e granulomas macrofágicos próprio das formas do pólo virchoviano (TORRES et al., 2003).

A histopatologia de tecido revelou resultados positivos em 30% (6/20) dos pacientes, resultados similares aos encontrados pelo Narasimha et al. (2006), quando afirma que poucos são os pacientes multibacilares que apresentam índices baciloscópicos elevados em biópsias de pele e de nervos.

Vários estudos têm sido realizados com o uso da PCR para detectar o *M. leprae*, usando diversos nucleotídeos para a amplificação da seqüência alvo. Neste estudo foram usados os iniciadores R1 e R2 que amplificam um fragmento de 372pb de seqüências repetitivas (WOODS & COLE, 1989, 1990); LP1 e LP2, que amplificam fragmento de 129 pb. (DONOGHUE et al., 2001); e S13 e S62 amplificam parte do gene codificador de antígeno rico em prolina “*pra*” do *M. leprae*, que amplificam fragmento de 531 pb, desenhado por Hartskeerl e colaboradores em 1989 (De WIT et al., 1993), com o propósito de evidenciar o mais eficiente na detecção do DNA desta bactéria.

Observou-se que a detecção do DNA desta bactéria em swab pós-biópsia conservadas em Lise 1 usando os iniciadores LP1 e LP2, obteve-se sensibilidade total de 40%, detectando positividade maior nos casos multibacilares (25%) que para os paucibacilares (15%), resultados esperados, pois os multibacilares apresentam uma carga bacteriana maior que nos paucibacilares. Os resultados encontrados apresentam menor sensibilidade do que os encontrados no estudo realizados por Donoghue et al. (2001), que apresentaram alta sensibilidade, detectando até 3 microorganismos. Provavelmente, a sensibilidade, neste estudo, tenha sido menor devido uma grande parte dos pacientes estarem por longo tempo usando a quimioterapia específica ou em re-tratamento, pois segundo Wichitwechkarn et al. (1995), a positividade da PCR diminui gradativamente com o tratamento, isto é um sinal positivo, pois significa que a PCR pode calcular a redução

bacteriana durante o curso do tratamento, como também pode servir para avaliação médica desde que a PCR demonstre a viabilidade potencial da bactéria uma vez que a baciloscopia nem sempre pode diferenciar entre um bacilo vivo e o morto. Pode também indicar, de acordo com o paciente, a presença de resistência as drogas, persistência ou recaída, quando o número de bacilos viáveis aumenta outra vez após o início do tratamento e diminui durante o tratamento (WICHITWECHKARN et al., 1995). Comparando-se os resultados do raspado dérmico, onde 80% (16/20) dos pacientes estudados apresentaram índice baciloscópico igual a zero, mas com positividade de 25% (5/16) pela PCR, o que demonstrou claramente a maior sensibilidade desta sobre a baciloscopia, embora pelo Teste de Correlação de Pearson não tenha tido significância estatística ( $p=0,1220$ ;  $r(\text{Pearson}) = 0,3572$ ), concordando com os estudos de De Wit et al., 1991.

A detecção do DNA desta bactéria, em swab pós-biópsia foi de 15% quando conservadas em lise 1 e sem nenhum sucesso quando conservadas em lise 2, frente aos iniciadores R1/R2 (372pb); enquanto que com os iniciadores S13/S62 os resultados das amostras de swab pós-biópsia em lise 1 não detectaram o DNA do *M. lepra*, e em lise 2 apenas 10% apresentaram amplificação. Resultados diferentes da maioria dos estudos, como os encontrados no estudo desenvolvido por Wichitwechkarn et al., (1995), que detectou o DNA em 87,1% dos pacientes multibacilares e 36,4% nos paucibacilares, com os iniciadores S13/S62 além de que esta amplificação tem sido referida como específica para o *M. leprae* e tem sua detecção limitada a presença aproximada de 1 bactéria.

Comparando-se os resultados da histopatologia com os da PCR LP1/LP2 (129pb) observou-se que houve sensibilidade total de 15% (3/20), detecção de DNA em 12,5% (2/16) das histopatologias negativas com concordância de 25% (1/4), demonstrando a menor sensibilidade da PCR sobre a histopatologia, correlação sem significância estatística ( $p= 0,5743$ ;  $r(\text{Pearson}) = 0,1336$ , contrariando os estudos de Yoon et al., (1993), onde 70% das biopsias negativas mostraram-se positivas para PCR 372pb e entre 60 e 80% das baciloscopias positivas foram PCR positivos.

Comparando-se a PCR de LP1/LP2 (129 pb), PCR de R1/R2 (372 pb) e S13/ S62 (531 pb) de swab pós-biópsia tanto as conservadas em Lise 1 quanto em Lise 2 e os de fragmentos de tecido conservados em lise 2, observou-se que não houve concordância entre as técnicas, pois a PCR



usando os iniciadores LP1/LP2 obteve melhores resultados que com os outros iniciadores. Resultados que concordam com outros estudos como o de Kang et al. (2003), que fez comparações de iniciadores com pares de base diferentes e que também relatou superioridade dos iniciadores com menor número de bases, embora no estudo dele tenha sido realizadas comparações com apenas dois pares de iniciadores. Os resultados obtidos foram altamente significativos nas amostras de swab pós-biópsia conservadas em lise 1 ( $p=0,0043$ ) e significativo para as amostras de fragmento de tecido conservadas em lise 2 ( $p=0,0498$ ).

Os pacientes que tiveram resultados negativos nos três métodos são na maioria do grupo paucibacilar e a sensibilidade da PCR pode ter diminuído devido a exacerbada resposta celular, com presença de IFN  $\gamma$  e TNF  $\alpha$  em grandes quantidades *in situ*, ambos com sinergismo sobre a enzima óxido nítrico síntase induzível nos macrófagos que levariam a ativação da via do óxido nítrico com destruição bacilar, em consequência a degradação do DNA (GOULART et al., 2002). Isto provavelmente justifique a baixa detecção do DNA do *M. leprae*, pois as citocinas expressadas degradam o DNA.

A solução tampão de lise 2 tem sido utilizada com sucesso na PCR realizada em amostras de tecido de lesão leishmaniótica (DE BRUIJIN et al., 1992; SMYTH et al., 1992), entretanto, neste estudo, a PCR realizada em amostras de lesão hansênica conservadas em tampão de Lise 2 apresentou baixa positividade, possivelmente isto se deva a interferência de algum componente utilizado na solução. No entanto, há necessidade de novos testes para maiores esclarecimentos. A intenção em utilizar esta solução foi visando obter algo útil para transportar material de campo, especialmente quando este pode ser mantido em temperatura ambiente.

A PCR realizada com os iniciadores R1/R2, não detectou o DNA do *M. leprae* em maior número de amostras. A positividade só ocorreu nos pacientes do pólo virchoviano e em apenas um paucibacilar com apenas dois meses de tratamento. Como estes iniciadores amplificam um fragmento de 372pb, talvez seja necessário que os bacilos ainda estejam intactos ou pouco degradados.

Os marcadores S13/S62 que amplificam fragmentos de 531bp, apresentou positividade em

pacientes com mais de seis meses de tratamento. Após avaliação, detectou-se que estes iniciadores apresentavam ampliações inespecíficas para *M. leprae*. Apesar de Woods e Cole (1989 e 1990), referirem como bom marcador, não obtivemos a mesma conclusão.

## 7- CONCLUSÃO

- O Lp1/Lp2 que amplifica 129 pb foi o iniciador que apresentou maior sensibilidade, tanto nas amostras de swab pós-biópsia conservadas em lise 1 quanto nas de fragmentos de tecido quando conservadas em solução tampão de Lise 2.
- Neste estudo, a PCR apresentou maior positividade para os multibacilares e baixa sensibilidade para as formas paucibacilares.
- Os resultados deste estudo evidenciaram que as amostras conservadas em tampão de Lise 1 promoveu melhores resultados para PCR que as amostras conservadas em tampão de Lise 2.
- As amostras de swab pós-biópsia conservadas em Lise 1 apresentaram maior positividade que as amostras de fragmentos de pele e swab pós-biópsia conservadas em Lise 2.
- A solução de lise 2 usada na conservação das diversas amostras clínicas estudadas não expressou funcionalidade significativa.
- Entre os três protocolos de extração utilizados neste estudo, os melhores resultados foram apresentados quando realizada a extração pelo método modificado de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1), em tampão de Lise 1.
- A PCR apresentou maior positividade (25%) que a baciloscopia (20%), entretanto a histopatologia (30%) apresentou melhores resultados que a baciloscopia e a PCR

- Pela necessidade de padronização das técnicas, de técnicos bem treinados e de equipamentos sofisticados, a PCR, provavelmente não substituirá em curto prazo os métodos convencionais de exame clínico, baciloscópico e histopatológico, mas pode ser usada como ferramenta complementar para o diagnóstico de casos inconclusivos pelos métodos convencionais da rotina laboratorial, além de também poder ser usada para estudos epidemiológicos para determinar a distribuição do *M. leprae* em diferentes populações.

## 8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. N. **Imunologia celular e molecular**. Ed.4. Rio de Janeiro: Revinter editora. p. 3 – 38.2003.

ABULAFIA, J.; VIGNALE, R. A. Leprosy: accessory immune system as effectors of infectious, metabolic, and immunologic reactions. **International Journal of Dermatology**. v.40. p. 673-687. 2001.

ALMEIDA, E. C.; MARTINEZ, A. N.; MANIERO, V.; SALES, A. M.; DUPPRE, N. C.; SARNO, E. N.; SANTOS, A. R.; MORAES, M. O. Detection of *M. leprae* DNA by polymerase chain reaction in the blood and nasal secretion of Brazilian household contacts. **Memória Instituto Oswaldo Cruz**. v.99. n°5. p. 509-511. 2004.

ANDRADE, V. L. G.; MOREIRA, T. A.; AVELLEIRA J. C. R.; MARQUES, A. B.; BAYONA, M. Paucibacilar ou Multibacilar? Uma contribuição para os serviços de saúde. **Hansen Institute**. v. 21. n°2. p.6-13. 1996.

ARAUJO, M. G. Hanseníase no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 36. supl.3 . p. 373-102. 2003.

AYRES, M; AYRES, M. J; AYRES, D. L; SANTOS, A.S. Bioestat 3.0 - **Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Sociedade Civil Mamirauá MCT – CNPq. 2003.

BUHRER, S. The use of whole blood in a dipstick assay for detection of antibodies to *M. leprae*: a field evaluation. **Immunology Medical Microbiology**. Netherlands. v. 21. supl. 3. p. 197-201. 1998.

\_\_\_\_\_ Use of MI Dipstick as a tool to classify leprosy patients. **International Journal Leprosy Other Mycobacterial Diseases**. Unated States, v.68. supl. 4, p.456-63. 2000.

BUHRER, S.; CUNHA, M. G.; FOSS, N. T.; OSKAM, L.; FABER, W.R.; KLATSER, P.R. Dipstick assay to identify leprosy patients who have an increased risk of relapse. **Tropical medicine International Health**. England. v. 6. p. 317-326. 2001.

BUHRER, S. S.; SMITS, H. L.; GUSSENHOVEN, G. C.; LEEUWEN, J. V.; AMADOR, S.; FUJIWARA, T.; KLATSER, P. R.; OSKAM, L. A. A simple and fast lateral flow test for classification of leprosy patients and identification of contacts with risk of developing leprosy. **International Journal of Leprosy Other Mycobacterial Diseases**. United States. v.41. supl. 5. p.1991-95. 2003.

BÜHRER-SÉKULA, S.; SMITS, H. L.; GUSSENHOVEN, G. C.; VAN LEEUWEN, J.; AMADOR, S.; FUJIWARA, T.; KLATSER, P. R.; OSKAM, L. Simple and Fast Lateral Flow Test for Classification of Leprosy Patients and Identification of Contacts with High Risk of Developing Leprosy. **Journal of Clinical Microbiology** v.41. n°. 5. p. 1991-1995. 2003.

CABALIER, M. E. D., PÉREZ H. 22 años de lepra: histopatología. **Revista de la Facultad de Ciências Médicas de Córdoba**. v.53. n°. 5. p. 1991-1995. 2003.

DE BRUIJIN, M. H. L.; BARKER, D. C. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. **Acta Tropica**, v. 52. p. 45-58. 1992.

DE WIT, M. Y. L.; FABER, W. R.; KRIEG, S. R.; DOUGLAS, J. T.; LUCAS, S. B.; MONTREEWASUWAT. N.; PTTYN, S. R.; HUSSAIN, R.; PONNIGHAUS. J. M.; HARTSKEERL, R. A.; KLAster, P. R. Application of a Polymerase Chain Reaction for the Detection of *M. leprae* in Skin Tissues. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 29. nº 5. p. 906-910.1991.

DE WIT, M. Y. L.; DOUGLAS, J. T.; McFADDEN, J.; KLAster, P. R. Polymerase Chain Reaction for Detection of *M. leprae* in Nasal Swab Specimens. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 31. nº 3. p. 502-506.1993.

DONOGHUE, H. D.; HOLTON, J.; SPIGELMAN, M. PCR primers that can detect low levels of *M. leprae* DNA. **Journal of Medical Microbiology**. v. 50. p. 177-182. 2001.

FIALLO, P.; WILLIAMS, D. L.; CHAN, G. P.; GILLIS, T. P. Effects of fixation on Polymerase chain reaction detection of *M. leprae*. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 30. nº 12. p. 3.095- 3.098.1992.

FOSS, N. T.; CALLERA, F. L. Anti-PGL1 levels in leprosy patients and their contacts. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.26. p.43-51. 1993.

FOSS, N. T. Imunologia. In: TALHARI, S.; NEVES, R. G. 1997. **Hansenologia**. 3. ed. p.97-102. 1997.

\_\_\_\_\_ Aspectos imunológicos da hanseníase. **Medicina, Ribeirão Preto**. v.30. p.335-339.1997.

GALLO, M. E. N.; JÚNIOR, L. A. N. R.; ALBUQUERQUE, E. C. A.; NERY, J. A. C.; SALES, A. N. Allocation of leprosy patients for multidrugtherapy: correlation between the classification according to number o skin lesions and the skin smears examination. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v.78. nº.4. p. 415-424. 2003.

GONÇALVES, M. G. **Orientações Básicas sobre apresentação e normalização de trabalhos acadêmicos**. Belém: Divisão de Documentação e Biblioteca. 2005.

GOULART, I. M.; PENNA, G. O.; CUNHA, G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta immune do hospedeiro ao *M. leprae*. **Revista da Sociedade Brasileira Medicina Tropical**. v.35. supl 4. 2002.

GUINTO, R. S.; ABALOS, R. M.; CELLONA, R. V.; FAJARDO, T. T. **An Atlas of Leprosy**. Sasakawa Memoial Health Foundation. 1990.

HIRATA, M. H & HIRATA, R. D. C. H; **Aplicação da biologia molecular em análises clínicas**. USP. 1998.

JADHAV, R.; MACDONALD, M.; BJUNE, G.; OSKAM, L. MILEP2 Study Group. Simplified PCR detection method for nasal *M. leprae*. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**. v. 69. nº. 4. p. 299-307. 2001.

JOB, C. K.; JAYAKUMAR, J.; WILLIAMS, D. L.; GILLIS, T. P. Role of polymerase chain reaction in the diagnosis of early leprosy. **International Journal of Leprosy Other Mycobacterial Diseases**. v.65. p. 461-464. 1997.

KANG, T. J; KIM, S. K.; LEE, S. B.; CHAE, G. T.; KIM, J. P. Comparison of two different PCR amplification products (the 18-kDa protein gene vs. RLEP repetitive sequence) in the diagnosis of *M. leprae*. **Clinical and Experimental Dermatology**. v. 28. p. 420-424. 2003.

KLASTER, P. R.; VAN BEERS, S.; MADJID, B.; DAY, R.; DE WIT, M. Y. L. Detection of *M. leprae* Nasal Carriers in Populations for Which Leprosy Is Endemic. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 31. nº 11. p. 2947-2951. 1993.

KLASTER, P. R.; CHO, S. N.; BRENNAN, P. J. The contribution of serological tests to leprosy control. **International Journal of Leprosy Other Mycobacterial Diseases**. United States. v. 64. p. 63-66. 1996.

KURABACHEW, M.; WONDIMU, A.; RYON, J. J. Reverse Transcription – PCR Detection of *M. leprae* in Clinical Specimens. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 36. nº 5. p. 1352-1356. 1998.

LEIKER, D. L.; NUNZI, E.; **Leprosy in the light skin: an illustrated manual**. Ed. 4, Bologna: Associazione italiana “Amici di Raoul Follereau”. p. 9 – 126. 1981.

LOMBARDI, C.; PEDRAZZANI, S.; PEDRAZZANI, J. C.; FERREIRA, P. E.; ZICKER, F. E. Eficacia protectora del BCG contra la lepra em São Paulo, Brasil. **Boletim Oficina Sanitaria Panamericana**. São Paulo. v. 119. supl. 5. 1995.

MACIEL, L. R.; OLIVEIRA, M. L. W.; GALLO, A. E. N.; DAMASCO, M. S. Memória e história da hanseníase no Brasil através de depoentes (1960-2000). **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**. v.10. supl. 10. p. 308-335. Rio de Janeiro. 2003.

MADEIRA, S. Aspectos Microbiológicos do *M. leprae* In: OPROMOLLA, D.V.A. **Noções de Hansenologia**. ed.1. São Paulo: Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato. p.13. 2000.

MARTELLI, C. M. T.; STEFANI, M. M. A.; PENNA, G. O.; ANDRADE, A. L. S. S. Endemias e epidemias brasileiras, desafios e perspectivas de investigação científica: hanseníase. **Revista brasileira epidemiologia**. v.5. nº.3. p.273-285. dez. 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia para controle da Hanseníase**. Brasília (DF). 2002.

MUIR, E. **Lepra- Diagnóstico, tratamento e profilaxia**. ed. 6. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 135 p.1947.

NARASIMHA, R. P.; PRATAP, D. V. S.; RAMANA REDDY, A. V.; SUJAI, S. Evaluation of leprosy patients with 1 to 5 skin lesions with relevance to their grouping into paucibacillary or multibacillary disease. **Indian Journal Dermatol Venereol Leprol**. v.72. p. 207-210. 2006.

OLIVEIRA, M. L. W.; MENDES, C. M.; TARDIN, R. T.; CUNHA, M. D.; ARRUDA, A. Representação social da hanseníase, trinta anos após a substituição da terminologia “lepra” no Brasil. **História**,

**Ciências, Saúde-Manguinhos.** v.10 supl. 1. p. 41-48. Rio de Janeiro. 2003.

OPROMOLLA, D. V. A. **Noções de Hansenologia.** ed.1. São Paulo: Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato p. 101 – 115. 2000.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE - OMS; ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DE SAÚDE - OPAS. **Manual para o controle da lepra.** Washington. p.48 -62. 1989.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE - OMS; ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DE SAÚDE - OPAS. **Situación de la lepra en la Región de las Américas.** 2007

PARKASH, O.; SINGH, H. B.; RAI, S.; PANDEY, A.; KATOCH, V. M.; GIRDHAR, B. K. Detection of *M. leprae* DNA for 36 kDa protein in urine from leprosy patients: a preliminary report. **Revista Instituto Medicina Tropical de São Paulo.** v. 46. supl. 5. p. 275-277. 2004.

PATROCINIO, L. G.; GOULARD, I. M. B.; GOULARD, L. R.; PATROCINIO, J. A.; FERREIRA. F. R.; FLEURY, R. N. Detection of *M. leprae* In Nasal mucosa biopsies by the polymerase chain reactions. **FEMS – Immunology and medical Microbiology.** v. 44. p. 311-316. 2005.

RAMBUKKANA, A.; HIROSHI, Y.; ZANAZZI, G.; MATHUS, T.; SALZER, J. L.; YURCHENCO, P. D.; CAMPBELL, K. P.; FICHETTI, A. Role of  $\alpha$ -Dystroglycan as a Schwann cell Receptor for *M. leprae*. **Science.** v. 282. p. 2076-2078.1998.

RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. Classification of leprosy accordy to immunity: a five-group system. **International Journal Leprosy.** v. 4. p. 255-273. 1966.

SAMBROOK, J.; FRISCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Clonig: A Laboratory Manual** (Cold Spring Harbor laboratory, new York, 1989).

SAMPAIO, E. P.; PESSOLANI, M. C. F; MORAES, M. O.; SARNO, E .N. Pathogenesis of reactions and nerve damage in leprosy. **Report of the scientific working group on leprosy.** p. 48-56. 2002.

SANTOS, A. R.; BALASSIANO, V.; OLIVEIRA, M. L. W; PEREIRA, M. A. S.; SANTOS, P. B.; DEGRAVE, W. M.; SUFFYS, P. N. Detection of *M. leprae* DNA by polymerase chain reaction in the blood of individuals, eight years after completion of anti-leprosy therapy. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz.** v. 96. nº.8. p.1123-1133. 2001.

SANTOS, V. S. M.. Pesquisa documental sobre a história da hanseníase no Brasil. **Historia, Ciências, Saúde-Manguinhos,** v. 10. supl. 1. p. 415-426. Rio de Janeiro. 2003.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA À SAÚDE (SVS) **Hanseníase: Dados e indicadores.** Brasília, 2007. Disponível em: <<http://dtr2007.saude.gov.br/svs/epi/hanseniase/dados.htm>>. Acesso: 01 set. 2007.

SILVA, S. F. **Dermatology Atlas.** Electronic text book of dermatology. disponível em : <http://www.atlasdermatologico.com.br/>. Acesso em : 01 nov. 2007.

SMYTH, A. J.; GHOSH, A.; HASSAN. Md. Q.; BASU, D.; DE BRUIJN, M. H. L ADHYA, S., MALLIK, K.

K.; BARKER, D. C. Rapid and sensitive detection of *Leishmania* kinetoplast DNA from spleen and blood samples of kala-azar patients. **Parasitology**. v. 105. p. 183-192. 1992.

SMITH, W. C. S.; SMITH, C. M.; CREE, L. A.; JADHAV, R. S.; MACDONALD, M.; EWARD, Y. K.; OSKAM, L.; BEERS, S. V.; KLASTER, P. An approach to understanding the transmission of *M. leprae* using molecular and immunological methods: Results from the MILEP2 study. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**. v. 72. n°3. 2004.

TALHARI, S.; NEVES, R. G. **Dermatologia Tropical**: Hanseníase. Ed.3 Manaus: Gráfica Tropical. 167 p.2 – 131. 1997.

TORRES, P.; CAMARENA, J. J.; GOMEZ, J. R.; NOGUEIRA, J. M.; GIMENO, V.; NAVARRO, J. C.; OLMOS, A. Comparison, of PCR mediated amplification of DNA the classical methods for detection of *M. leprae* in different types of clinical samples in leprosy patients and contacts. **Leprosy Review**. v. 74. p.18-30. 2003.

TRAO, V. T. **Dynamics of immune responses in leprosy patients during treatment**. Ed.1, Netherlands: TDR/WHO. p. 7 – 18. 1997.

UNIVERSO BRASILEIRO – Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP- **Departamento de Anatomia Patologica e Neuroimunologia**. [S.l.] Neuroimagem, 2004. disponível em : <http://www.fcm.unicamp.br/departamentos/anatomia/index/html>. Acesso em : 21 set 2007.

URA, S. Epidemiologia. In: OPROMOLLA, D. V. A. **Noções de Hansenologia**. ed.1. São Paulo: Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato. p.13. 2000.

VAN BEERS, S.M.; HATTA, M.; KLATSER, P.R. Patient contact is the major determinant in incident leprosy: implications for future control. **International Journal Leprosy Other Mycobacterial Diseases**. Netherlands. v. 54. p. 480-490. 1999.

WICHITWECHKARN, J.; KARNJAN, S.; SHUNTAWUTTISETTEE, S.; SORNPRASIT, C.; KAMPIRAPAP, K.; PEERAPAKORN, S. Detection of *M. leprae* by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 33. n° 1. p.45- 49. 1995.

WOODS. S. A.; COLE, S.T. A rapid method for the detection of potentially viable *M. leprae* in human biopsies: a novel application of PCR. **FEMS Microbiol Lett** . n° 53. p. 305-309. 1989.

WOODS. S. A.; COLE, S.T. A family of dispersed repeats in *Mycobacterium leprae*. **Molecular Microbiology**. 4(10): 1745-51. n°. 34, p. 289-296. 1990.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Chemotherapy of leprosy for control programmes**. Geneva. Technical Report Series. n° 675. 1982.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Report of the first meeting of the WHO Technical Advisory Group on Elimination of Leprosy**. Geneva. 2-3. 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **Leprosy for medical practitioners and paramedical workers**. Geneva: Novartis Foundation for sustainable development. Basle. Switzerland. 2002.



WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **Scientific working Group. Report o Leprosy. Programme for research and training in tropical diseases. Currents status in reactions and nerve damage in leprosy- What next?** 26-28. Geneva. Switzerland. 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Weekly Epidemiological Record.** v. 82. n°. 35. p. 225-232. Geneva. 2007.

YAWALKAR, S. J.; In: WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **Leprosy for medical practitioners and paramedical workers.** Geneva: Novartis Foundation for sustainable development, Basle, Switzerland. p.134. 2002.

YOON, K. H.; CHO, S. N.; LEE, M. K.; ABALOS, R. M.; CELLONA, R. V.; FAJARDO, T. T.; GUIDO, L. S.; CRUZ, E. C. D.; WALSH, G. P.; KIM, J. D. Evaluation of Polymerase Chain Reaction Amplification of *M. leprae* – Specific Repetitive Sequence in Biopsy Specimens from Leprosy Patients. **Journal of Clinical Microbiology.** v. 31. n° 4. p. 895-899. 1993.

# APÊNDICE

## APÊNDICE 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL  
MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL  
ÁREA DE PATOLOGIA TROPICAL

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Baseado na Resolução No. 196 de 10/10/1996 do Conselho Nacional de Saúde)

**Deteção do DNA do *M. leprae* pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em lesões de pele e swab pós-biopsia de pacientes portadores das diversas formas clínicas da hanseníase.**

A hanseníase é uma doença infecciosa e contagiosa causada por uma bactéria chamada *M. leprae*. Esta doença é transmitida de homem para homem principalmente pelas vias respiratórias e se caracteriza pelo aparecimento de manchas claras ou avermelhadas na pele e que pode causar deformações, que muitas vezes deixam o homem sem condições de trabalhar.

Esta pesquisa possui como principal objetivo estudar uma forma de identificação mais rápida, sensível e eficiente desta bactéria, por isso é muito importante a sua participação neste estudo, pois terá contribuído para a adoção de futuras medidas de controle e eliminação deste mal.

Esclarecemos que para efetivar sua participação, basta que permita a coleta de material das manchas de pele que será realizado com bisturi e cotonete por profissional treinado, reduzindo os riscos decorrentes da coleta de material biológico, responda algumas perguntas e autorize o registro das imagens das lesões e da coleta, além do uso destas informações em futuras publicações. Todo material utilizado na coleta estará devidamente esterilizado e será descartado de acordo com as normas de biossegurança.

Sua identidade e todas as informações fornecidas serão mantidas em sigilo e você terá a liberdade de deixar de participar a qualquer momento, sem nenhum tipo de prejuízo, coação ou represália. E não haverá, pela sua participação, nenhum gasto financeiro com qualquer dos procedimentos realizados e os riscos serão mínimos.

Os benefícios desta pesquisa serão de contribuir para que tenha um diagnóstico mais precoce, preciso e específico e que poderá ser futuramente estendidos a outros pacientes.

Caso concorde em participar deste estudo, assine a declaração abaixo.

---

Eu, \_\_\_\_\_ declaro que li as informações acima e assim tomei conhecimento dos objetivos deste estudo e compreendi seus benefícios pelo que concordo plenamente em participar do mesmo, autorizando a coleta das informações necessárias, do material biológico (corte de pele e swab pós-biopsia) e do registro das imagens da lesão e da coleta, por minha livre vontade. Todo o material coletado será usado apenas para realização desta pesquisa que não poderá ter fins lucrativos.

Belém, \_\_\_\_/\_\_\_\_/2006.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do sujeito da pesquisa ou do responsável



polegar direito  
polegar direito

Maria das Graças Carvalho Almeida  
Tv. Enéas Pinheiro, 427 – Pedreira - CEP. 66090-240  
Fone: (091) 3241-5799 ou 9112-9873  
Edna Aoba Yassui Ishikawa (Orientadora do Projeto)  
Endereço: Av. Generalíssimo Deodoro, 92.  
CEP: 66.055-240 Belém-Pará  
Tel/Fax: (091) 241-0032

# ANEXO