



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

DENIS VIEIRA GOMES FERREIRA

DETECÇÃO MOLECULAR E SOROLÓGICA DA INFECÇÃO POR
Mycobacterium leprae **EM CASOS E COMUNICANTES DE HANSENÍASE E**
ESCOLARES DE ORIXIMINÁ (PA)

Belém - Pará
2011

DENIS VIEIRA GOMES FERREIRA

**DETECÇÃO MOLECULAR E SOROLÓGICA DA INFECÇÃO POR
Mycobacterium leprae EM CASOS E COMUNICANTES DE HANSENÍASE E
ESCOLARES DE ORIXIMINÁ (PA)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, área de concentração Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Claudio Guedes Salgado

Instituto de Ciências Biológicas – UFPA

Belém - Pará
2011

DENIS VIEIRA GOMES FERREIRA

**DETECÇÃO MOLECULAR E SOROLÓGICA DA INFECÇÃO POR
Mycobacterium leprae EM CASOS E COMUNICANTES DE HANSENÍASE E
ESCOLARES DE ORIXIMINÁ (PA)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, área de concentração Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular.

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof. Dr. Claudio Guedes Salgado (Orientador)

**Examinadores: Profa. Dra. Andrea Kely Campos Ribeiro dos Santos
Prof. Dr. Jorge Pereira da Silva**

Data da defesa: 23/05/2011

Belém - Pará
2011

*“O homem não empreende nada se não tiver o estímulo do
desejo de desfrutar o que faz”*

Leo Huberman

Dedico essa pesquisa às milhares de pessoas que foram acometidas pela doença hanseníase e seus comunicantes, especialmente aqueles que concordaram em participar desse estudo, contribuindo na construção de conhecimento sobre esta doença que ainda se mantém como sério problema de saúde pública no Brasil.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus fonte de sabedoria e caridade, por todas as conquistas e realizações que tenho alcançado e pelas bem-aventuranças dispensadas em minha vida e da minha família.

À Universidade Federal do Pará e ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia celular pelo suporte acadêmico.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará (FAPESPA) pelo suporte financeiro para a execução desse estudo.

Ao Prof. Dr. Claudio Guedes Salgado pela orientação e valiosas contribuições para minha formação acadêmica, incentivo e investimento na minha jornada de formação como Pesquisador.

À Profa. Dra. Andrea Kely C. Ribeiro dos Santos pela valiosa colaboração e suporte na biologia molecular desse estudo.

Ao Dr. John Spencer (Colorado State University, USA) pela valiosa parceria, em se dispor a vir ao Laboratório de Dermato-Imunologia nos capacitar na execução do ELISA IgM anti-PGL-1 e nos fornecer gentilmente o antígeno PGL-1.

Aos Professores Domingos Wanderley Picanço Diniz (diretor do núcleo universitário de Oriximiná) e Miguel Angelo de Oliveira Canto (coordenador do pólo da Universidade Aberta do Brasil em Oriximiná), pois disponibilizaram infra-estrutura física no campus, inclusive laboratorial e transporte durante nossa estadia em Oriximiná.

Ao Prof. Dr. Marco Andrey Cipriani Frade (USP, Ribeirão Preto) pelas valiosas contribuições ao estudo, principalmente, nos trabalhos de campo durante as viagens.

À Secretaria de Saúde do Município de Oriximiná pelo apoio, suporte financeiro, de recursos humanos e transporte, sem os quais seria inviável nossa segunda viagem ao município.

À Enf. Regina Guerreiro e a Enf. Conceição Guerreiro (Secretária de Saúde do Município de Oriximiná), pela hospitalidade, importante parceria e apoio, foram de suma importância para que o retorno ao município de Oriximiná acontecesse e produzisse excelentes resultados, tanto no treinamento dos profissionais de saúde local como no diagnóstico precoce de vários casos de hanseníase.

Ao Enf. Carlos Bêta, pelo apoio e a cessão do alojamento da UFF em Oriximiná, na nossa primeira visita ao município.

Aos meus pais, Sr. Edmilson Campos Ferreira e Sra. Marilene Vieira G. Ferreira, pelo grande amor, incentivo, dedicação e apoio cedidos a mim. Amo muito vocês!

Aos meus irmãos Denílson e Dinis, grandes parceiros e amigos, pelo apoio e incentivo na busca dos meus objetivos pessoais.

À Amanda pelo seu carinho, incentivo e amor dispensados gratuitamente.

À todos que fazem parte da equipe LDI, Prof. Dr. Moises, Prof. MSc. Josafá, MSc. Simone, MSc. Daniela, MSc. Tânia, Heleno e Layssa pelas contribuições e bons momentos vividos, mais que colegas, amigos de trabalho.

Aos profissionais da URE Marcello Candia pela importante parceria nesse estudo, especialmente, a Márcia Leão, Patrícia, Layana e Sabrina.

Aos técnicos administrativos e de laboratório do LDI, Antônia, Silvia, André e Gisele pela importância na organização do ambiente de trabalho.

Ao Miguel que nos acompanhou e foi nosso motorista no trabalho de campo na zona rural de Oriximiná.

Às alunas de graduação em biologia de Oriximiná e aos alunos do PIBIC Junior, pelo empenho na localização das residências.

RESUMO

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica, que acomete primariamente pele e nervos periféricos, e suas principais manifestações clínicas são lesões com alterações de pigmentação e sensibilidade. Seu agente etiológico é o *Mycobacterium leprae*, um bacilo intracelular obrigatório, álcool ácido resistente em forma de bastão reto ou ligeiramente curvo. A transmissão ocorre através das vias aéreas superiores, e o padrão imunológico do hospedeiro varia desde uma elevada resposta imune mediada por células, conhecida como resposta do tipo Th1, a uma alta susceptibilidade a infecção com elevada resposta imune humoral, resposta do tipo Th2. Este estudo teve como objetivo, examinar clinicamente e correlacionar informações sócio-epidemiológicas com os níveis de anticorpos IgM anti-PGL-1 no plasma, e a detecção por biologia molecular do *M. leprae* em swab nasal de casos e comunicantes de hanseníase notificados entre 2004 e 2008, além de escolares da rede pública de ensino do município de Oriximiná-Pará. Os resultados demonstram que: 1) os pacientes de hanseníase possuem condições precárias de habitação e alimentação, com quase 50% de privação alimentar; 2) aproximadamente 45% da população clinicamente saudável apresenta IgM anti-PGL-1 positivo, independente da idade, período de convivência com casos-índices ou presença ou ausência da cicatriz de BCG e; 3) o DNA do *M. leprae* é encontrado em 15 a 30% de comunicantes e casos, e em apenas 1,6% dos estudantes, não apresentando correlação com ELISA IgM anti-PGL-1, com a forma clínica da doença ou com o tempo de evolução da hanseníase em indivíduos tratados com PQT nos 5 anos antes da coleta dos dados. Desta forma, a positividade do ELISA IgM anti-PGL-1 parece indicar a magnitude da exposição de uma população ao *M. leprae*, podendo contribuir para estudos epidemiológicos e na definição de grupos populacionais prioritários para a realização de busca ativa de casos de hanseníase em uma determinada comunidade.

Palavras-chave: Hanseníase, *Mycobacterium leprae*, PGL-1, Detecção Molecular.

ABSTRACT

Leprosy is a chronic infectious disease that primarily affects skin and peripheral nerves and its clinical signs are lesions with abnormal pigmentation and sensitivity. Its etiologic agent is *Mycobacterium leprae*, an obligate intracellular bacillus, acid fast rod-shaped straight or slightly curved. The transmission occurs through the upper airway, and the default host immune ranges from a high cell-mediated immune response, known as Th1 response, a high susceptibility to infection with high humoral immune response, Th2 response. This study aimed to examine clinical and socio-epidemiological information to correlate with levels of IgM anti-PGL-1 in plasma, and molecular detection of *M. leprae* in nasal swabs from cases and contacts of leprosy between 2004 and 2008, and schoolchildren from public schools in the city of Oriximiná Para. The results show that: 1) leprosy patients have poor housing and food, with almost 50% of food deprivation, 2) approximately 45% of clinically healthy presents IgM anti-PGL-1 positive, regardless of age, period of living with index cases or the presence or absence of a BCG scar and 3) the DNA of *M. leprae* is found in 15-30% of cases and contacts, and only 1.6% of students did not show correlation with ELISA IgM anti-PGL-1, with the clinical form of the disease or the duration of the leprosy patients treated with MDT in the 5 years before data collection. Thus, the positivity of ELISA IgM anti-PGL-1 seems to indicate the magnitude of the exposure of a population to *M. leprae*, which may contribute to epidemiological studies and the definition of priority population groups to conduct active case finding of leprosy in a given community.

Key-words: Leprosy, *Mycobacterium leprae*, PGL-1, Molecular Detection.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1:** Prevalência mundial da hanseníase no mundo no ano de 2009 por 10.000 habitantes. **3**
- FIGURA 2:** Detecção de novos casos de hanseníase no mundo em 2009, por 100.000 habitantes. **4**
- FIGURA 3:** Dez clusters de detecção de casos de hanseníase no Brasil. **5**
- FIGURA 4:** *Mycobacterium leprae* isolado de pele de paciente multibacilar e corado pelo método de Ziehl-Neelsen, 1000x. **7**
- FIGURA 5:** Representação esquemática das moléculas que compõem a parede celular do *M. leprae*. **8**
- FIGURA 6:** Representação espacial da molécula de glicolípido fenólico 1 (phenolic glycolipid – PGL-1). **9**
- FIGURA 7:** Disseminação da Hanseníase no Mundo. Os círculos representam os países de origem das amostras examinadas e suas distribuição entre os quatro tipos de SNPs. A cor amarela representa o tipo 1, laranja tipo 2, lilás tipo 3 e verde tipo 4, a cabeça de seta indica o sentido da distribuição das cepas. **10**
- FIGURA 8:** Mapa do estado do Pará, com a identificação do município de Oriximiná. **21**
- FIGURA 9:** Produtos de PCR para detecção de DNA do *M. leprae*, a partir de swab da mucosa nasal. Colunas 1 e 18 ladder (bandas de 100, 200, 400, 800, 1200 e 2000pb); 2 e 3 pacientes MB; 4 e 5 controles negativos; 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 e 17 amostras. **26**

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Estatística descritiva da idade dos casos e comunicantes de hanseníase e escolares de Oriximiná – PA.	29
TABELA 2: Distribuição por frequência de cada grupo estudado de acordo com o gênero dos indivíduos.	29
TABELA 3: Características sócio-epidemiológicas dos casos de hanseníase notificados no período de 2004 a 2008, em Oriximiná- PA.	30
TABELA 4: Características clínico-epidemiológicas dos casos de hanseníase notificados no período de 2004 a 2008, em Oriximiná- PA.	31
TABELA 5: Características sócio-clínico-epidemiológicas dos comunicantes de casos hanseníase, em que os casos foram notificados no período de 2004 a 2008, em Oriximiná- PA.	32
TABELA 6: Positividade do teste de ELISA IgM anti-PGL-1 dos casos de hanseníase.	33
TABELA 7: Distribuição dos casos ELISA anti-PGL-1 positivos de acordo com a classificação operacional no Ministério da Saúde e a de Ridley e Jopling.	34
TABELA 8: Positividade do teste de ELISA IgM anti-PGL-1 dos comunicantes de casos de hanseníase.	40
TABELA 9: Características sócio-epidemiológicas dos escolares de Oriximiná- PA.	47
TABELA 10: Positividade do teste de ELISA IgM anti-PGL-1 dos escolares de Oriximiná - PA.	48
TABELA 11: Distribuição dos grupos estudados por gênero e positividade para a detecção molecular do <i>M. leprae</i> , pela reação em cadeia da polimerase (PRC), a partir de swab da mucosa nasal.	52
TABELA 12: Distribuição dos casos PCR positivos de acordo com a classificação operacional no Ministério da Saúde e a de Ridley e Jopling.	53

LISTA DE GRÁFICOS

- GRÁFICO 1:** Comparação da densidade óptica (O.D.) do ELISA IgM anti-PGL-1 entre os casos de hanseníase Paucibacilares (PB) e Multibacilares (MB). **35**
- GRÁFICO 2:** Correlação entre o ano do diagnóstico de hanseníase e a densidade óptica (D.O.) dos resultados de ELISA IgM anti-PGL-1. **35**
- GRÁFICO 3:** Correlação entre a densidade óptica do teste de ELISA anti-PGL-1 dos casos de hanseníase e o número de cicatriz da vacina BCG. O.D. (ELISA posit.) = densidade óptica dos casos positivos para o ELISA; O.D. (ELISA negat.) = densidade óptica dos casos negativos para o ELISA. **36**
- GRÁFICO 4:** : Correlação entre a idade e a densidade óptica (D.O.) dos resultados de ELISA IgM anti-PGL-1 dos casos de hanseníase. **37**
- GRÁFICO 5:** Correlação entre a idade e o índice de escolaridade (IE) entre os casos de hanseníase. Os IEs são representados por 1 = ter cursa entre a 1ª e 3ª séries; 2 = cursado da 4ª a 7ª série; e 3 = cursado da 8ª série ao ensino médio. **37**
- GRÁFICO 6:** Correlação entre a densidade óptica (O.D.) e a auto declaração de ter sofrido privação alimentar ou não, entre os casos, e a positividade para o teste ELISA anti-PGL-1. **38**
- GRÁFICO 7:** Correlação da densidade óptica (D.O.) e o número de pessoas no domicílio de casos de hanseníase, quando foi declarado se três ou mais pessoas fazem uso ou não do mesmo dormitório. O.D. (Sim) = densidade óptica do teste de ELISA anti-PGL-1 quando há mais que dois por dormitório; O.D. (Não) = densidade óptica do teste de ELISA anti-PGL-1 quando não há mais que dois por dormitório. **39**
- GRÁFICO 8:** Correlação entre a idade e a densidade óptica (O.D.) dos resultados do teste de ELISA IgM anti-PGL-1 dos contatos de hanseníase. **40**
- GRÁFICO 9:** Relação entre a idade e o período de convivência dos contatos com os casos de hanseníase. **41**
- GRÁFICO 10:** Relação entre o período de convivência em anos dos comunicantes com os casos de hanseníase e a densidade óptica (O.D.) do teste de ELISA anti-PGL-1. **42**
- GRÁFICO 11:** Correlação entre a densidade óptica do teste de ELISA anti-PGL-1 dos comunicantes de hanseníase e o número de cicatriz da vacina BCG. O.D. (ELISA posit.) = densidade óptica dos contatos positivos para o ELISA; O.D. (ELISA negat.) = densidade óptica dos contatos negativos para o ELISA. **43**

- GRÁFICO 12:** Densidade óptica do teste ELISA IgM anti-PGL-1 dos contatos de casos de hanseníase, divididos entre os contatos de casos PB e MB e entre os contatos de casos PB e MB ELISA positivos. 44
- GRÁFICO 13:** Correlação dos resultados de ELISA anti-PGL-1 entre comunicantes de casos-índices positivos e negativos para o ELISA anti-PGL-1. Risco relativo (RR) = 2,422 e $p < 0,05$. 45
- GRÁFICO 14:** Correlação dos testes de ELISA anti-PGL-1 dos comunicantes de casos-índices multibacilares (MB) e Paucibacilares (PB). 45
- GRÁFICO 15:** Correlação entre o nível de escolaridade e a idade (em anos) dos escolares. Cada série de estudo regular representa uma unidade do eixo da escolaridade, iniciando com a 1ª série representada pela unidade 1. 48
- GRÁFICO 16:** Correlação entre a densidade óptica (O.D.) e a idade dos escolares de Oriximiná. 49
- GRÁFICO 17:** Correlação em a densidade óptica do ELISA anti-PGL-1 e o número de cicatriz de BCG entre os escolares de Oriximiná. 50
- GRÁFICO 18:** Densidade óptica comparada entre os escolares, comunicantes e casos de hanseníase positivos para o ELISA anti-PGL-1. 51
- GRÁFICO 19:** Relação entre a densidade óptica (O.D.) das amostras ELISA anti-PGL-1 positivas e o número de positivos para a PCR (detecção molecular pela reação em cadeia da polimerase) dos casos-índices e comunicantes de hanseníase e escolares de Oriximiná. 54
- GRÁFICO 20:** Correlação de positividade para a reação em cadeia da polimerase (PCR) em comunicantes de casos que foram positivos e negativos para a PCR. 55
- GRÁFICO 21:** Correlação de positividade para a reação em cadeia da polimerase (PCR) na detecção molecular do *M. leprae* em comunicantes de casos PB e MB. 56
- GRÁFICO 22:** Distribuição dos casos de hanseníase positivos para a PCR de acordo com o ano do diagnóstico. 56
- GRÁFICO 23:** Correlação de positividade entre PCR e ELISA anti-PGL-1, distribuídos entre os casos novos, casos-índices e comunicantes de hanseníase e os escolares. 57
- GRÁFICO 24:** Resultados de ELISA e PCR em casos e comunicantes menores de 15 anos. 58

LISTA DE ABREVIACÕES

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BAAR	Bacilo álcool ácido resistente
BB	Borderline-Borderline
BL	Borderline-Lepromatosa
BSA	Soro Bovino Fetal
BT	Borderline-Tuberculóide
DMSO	Dimetil sulfóxido
dNTP	desoxirribonucleares trifosfatados
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilino-dietil-tetracético
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ENH	Eritema Nodoso Hansênico
I	Indeterminado
IB	Índice baciloscópio
IM	Índice morfológico
IgM	Imunoglobulina do subtipo M
IL	Imunoglobulina (anticorpo)
LDI	Laboratório de Dermato-Imunologia
LL	Lepromatosa
MB	Multibacilar
MC	Centro de Referência Estadual em Dermatologia Sanitária Marcello Candia
MDT	Multi-drug therapy
OMS	Organização Mundial de Saúde
PB	Paucibacilar
PBS	Tampão fosfato
PCR	Polimerase Chain Reaction (reação em cadeia da polimerase)
PGL	Glicolípido Fenólico
PQT	Poliqumioterapia
SNP	Single-Nucleotide Polymorphisms
Th1	T helper 1
Th2	T helper 2
TNF	Fator de anecrose tumoral
TT	Tuberculoide
UEPA	Universidade do Estado do Pará
UFPA	Universidade Federal do Pará
VNTR	Variable Number Tandem Repeats
VV	Virchoviano
WHO	World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Hanseníase	1
1.2 Epidemiologia	2
1.3 Transmissão e infecção	5
1.4 O agente etiológico	6
1.5 Modelos experimentais para estudo da hanseníase	10
1.6 Classificação clínica e tratamento	12
1.7 Diagnóstico laboratorial	14
1.7.1 Baciloscopia	14
1.7.2 Sorologia	15
1.7.3 Diagnóstico Molecular	16
2. JUSTIFICATIVA	18
3. OBJETIVOS	19
3.1 Objetivo geral	19
3.2 Objetivos específicos	19
4. MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1 Aspectos éticos	20
4.2 Tipo de estudo	20
4.3 Local de realização	20
4.4 População estudada	21
4.5 Critério de inclusão	22
4.5.1 Do município	22
4.5.2 Dos casos índices	22
4.5.3 Dos escolares	22
4.6 Critério de exclusão	22

4.6.1 Do município	22
4.6.2 Dos casos índices	23
4.6.3 Dos escolares	23
4.7 As amostras biológicas	23
4.8 ELISA para detecção de IgM humano anti-PGL-1	23
4.9 Extração de DNA	25
4.10 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	25
4.11 Análises estatísticas	27
5. RESULTADOS	28
5.1 Casos e Comunicantes	30
5.2 ELISA IgM anti-PGL-1	33
5.2.1 Correlação Caso vs. Comunicantes	44
5.2.2 Escolares	46
5.3 Características sócio-epidemiológicas dos casos novos	51
5.4 Detecção Molecular	52
5.5 Menores de 15 anos	57
6. DISCUSSÃO	59
7. CONCLUSÃO	65
8. BIBLIOGRAFIA	66

1. INTRODUÇÃO

1.1. HANSENÍASE

A hanseníase¹ (lepra ou doença de Hansen) é uma doença infecciosa crônica, dermatoneurológica, causada pelo *Mycobacterium leprae*, que apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas variando de acordo com a resposta imune do hospedeiro à infecção, acometendo primariamente pele e nervos periféricos.

Manifestações sistêmicas e lesões neuro-musculares permanentes podem surgir com o decorrer da doença. Dentre os principais achados clínicos, estão lesões na pele, tais como máculas hipopigmentadas com alterações de sensibilidade, pápulas ou nódulos característicos da doença, espessamento neural acompanhado ou não de alterações de sensibilidade e/ou de força muscular. A baciloscopia do raspado dérmico, corada pelo método de Ziehl-Neelsen, pode ser positiva ou negativa (FOSS, 1999; BRAKEL, 2007).

A doença de Hansen é uma doença complexa e está relacionada ao saneamento básico e nutrição, além dos fatores genéticos dos hospedeiros intrinsecamente relacionados, sendo endêmica em países emergentes (ARAÚJO, 2003).

A hanseníase é uma doença muito antiga, com registros deixados há vários séculos. Entretanto, não se sabe quando e onde se desenvolveu ou foi primeiramente descrita. Escritos antigos da Índia, China e Oriente Médio sugerem que a doença está presente nessas regiões por séculos. No tratado médico indiano *Sushruta Samhita*, datado de 600 a.C., encontrado pelo hansenologista indiano Dharmendra em 1967, estão descritos com detalhes os sinais clínicos da doença, além do tratamento que era adotado para as pessoas acometidas (TRAUTMAN, 1984; PANDYA *et al*, 2003).

Os Hebreus denominaram na bíblia a doença como *tsáraath*, um termo com significado religioso, implicando em estigma e punição de Deus. Por isso, as pessoas com hanseníase eram vistas como impuras e pecadoras, razão

¹ O termo “hanseníase” só passou a ser usado no Brasil a partir de 1991, por determinação do ministério da saúde, devido o fator estigmatizante, preconceituoso e excludente das palavras “lepra” e “leproso”.

pela qual eram excluídas da sociedade e mantidas isoladas das vilas, vilarejos e cidades. Os gregos denominavam a lepra como *elefantíase grecorum*² por causa das deformidades que a doença causava, e o termo relacionado com lepra (hanseníase) só era usado quando a doença apresentava alterações na pele (TRAUTMAN, 1984).

No Brasil, por décadas as pessoas com a hanseníase eram enviadas para aos abrigos ou colônias de leprosos, afastadas das cidades e isoladas da população e familiares. A região metropolitana de Belém tem registros de três colônias destas, uma no Tucunduba que foi desativado na década de 1980, uma em Marituba, onde hoje funciona como abrigo para as pessoas que ficaram com sérias debilitações físicas, e por último, a colônia do Prata, que fica no município de Tomé-Açu (BRASIL - MS, 2006).

Na década de 1980 a doença de Hansen passou a ter tratamento mais eficaz e fornecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e órgãos de saúde dos países envolvidos no combate a doença, que passou a ser instituído com a pretensão de eliminar a doença no mundo (WHO, 2000).

1.2. EPIDEMIOLOGIA

O programa de eliminação da hanseníase proposto pela OMS para o quinquênio 2006 – 2010, baseado na detecção de novos casos e fornecimento de tratamento grátis com poliquimioterapia (PQT), obteve redução na prevalência da doença em muitos países endêmicos.

O Nepal foi o único país, em 2009, que atingiu a meta de eliminar a hanseníase como problema de saúde pública, apresentando taxa de prevalência menor que 1/10.000 habitantes. Para os próximos cinco anos (2011 – 2015) a OMS e seus parceiros desenvolveram estratégias baseadas em cuidados de alta qualidade aos pacientes, reduzindo os problemas causados pela doença não somente pela detecção de novos casos precocemente, mas pela redução das incapacidades, estigma e discriminação,

² A elefantíase, como é conhecida atualmente uma doença parasitária filarióide, era denominada de elefantíase arábica.

forneendo auxílio para a reabilitação social e econômica aos hansenianos (WHO, 2010).

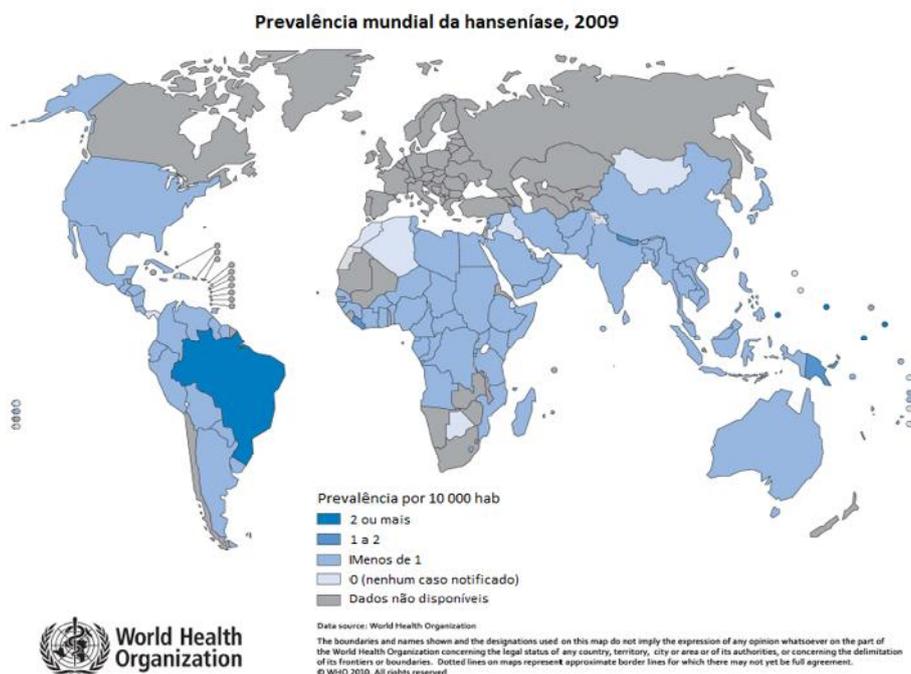


Figura 1: Prevalência mundial da hanseníase no mundo no ano de 2009 por 10.000 habitantes.

Fonte: adaptado de WHO, 2009.

Em 2009 a OMS registrou 244.796 (18,71/100.000 habitantes) novos casos detectados no mundo, uma redução de 20.865 casos comparando com o ano de 2006. A prevalência no primeiro quadrimestre de 2010 era de 1,77 casos por 10.000 habitantes, ou seja, 211.903 casos no mundo. A Índia foi o país com maior número absoluto de casos novos, 133.717, seguida do Brasil com 37.610 e Indonésia com 17.610 (WHO, 2010).

O Brasil conseguiu uma redução de 6.826 casos, comparando o ano de 2009 com 2006, que apresentava prevalência de 44.436 casos, mas foi o país com a maior taxa de detecção e prevalência de hanseníase em todo o mundo no ano de 2009 (**Figura 1** e **Figura 2**) (WHO, 2010).

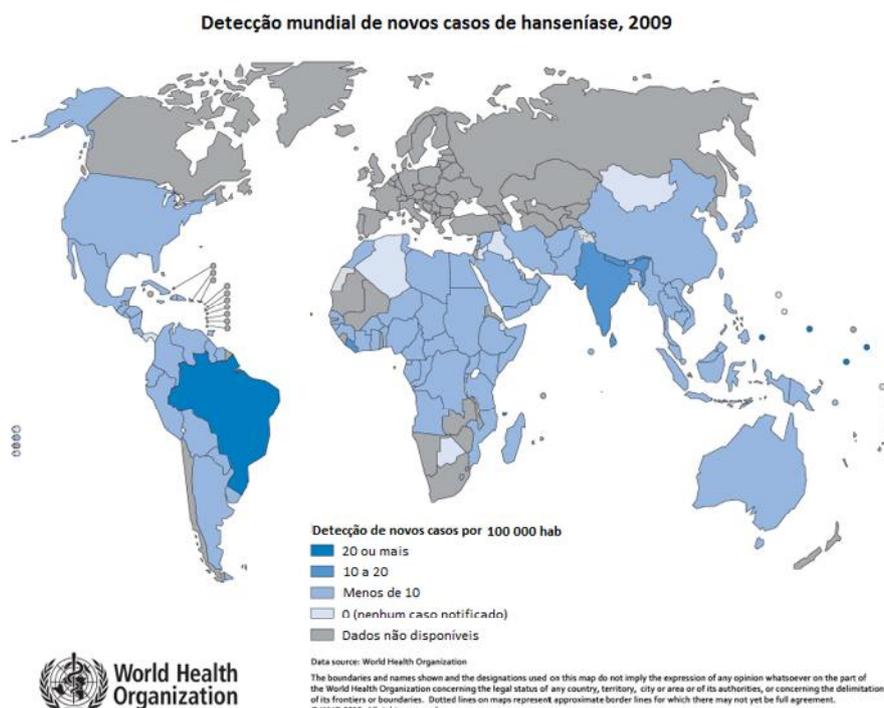


Figura 2: Detecção de novos casos de hanseníase no mundo em 2009, por 100.000 habitantes.

Fonte: adaptado de WHO, 2009.

No continente americano, ainda em 2009, o Brasil registrou 93% (37.610) dos casos novos, 88% (38.179) da prevalência, 91% (21.414) dos casos novos multibacilares, 94% (16.865) dos casos novos do gênero feminino, 96% (2.669) dos casos novos em menores de 15 anos, 92% (2.436) dos casos novos com grau de incapacidade 2 e 92,6% (1483) dos casos de recidiva (WHO, 2010).

Em 2009 o Brasil apresentou um coeficiente de detecção de casos novos de 19,64 por 100 mil habitantes, nesse mesmo ano o Pará foi o estado com maior número absoluto de casos novos da região norte do Brasil, com o terceiro (55,7 por 100 mil habitantes) maior coeficiente de detecção da região norte e o quinto entre os estados brasileiros (SINAN/SVS-MS, 2010; BRASIL-MS, 2011).

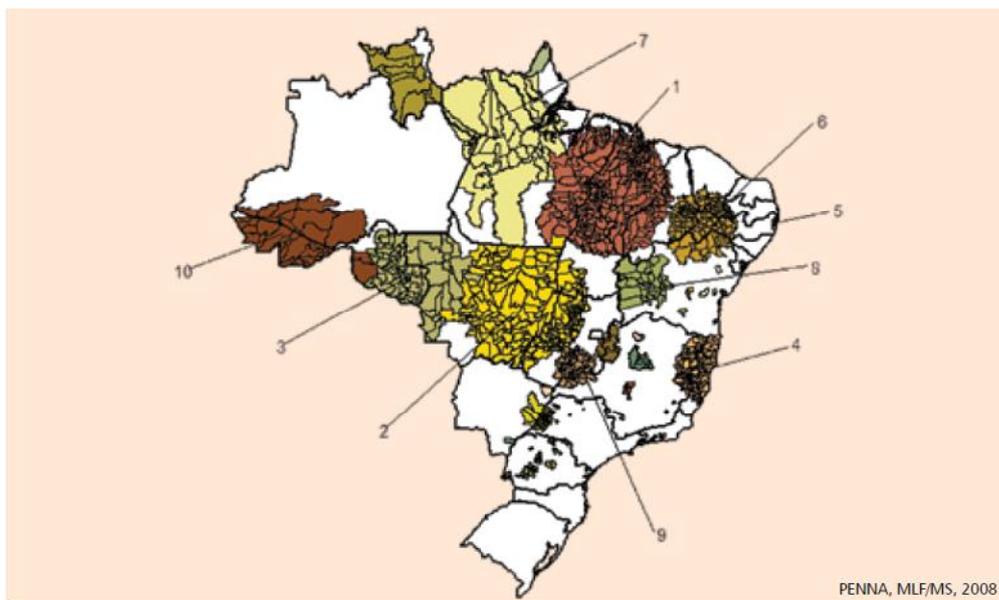


Figura 3: Dez clusters de detecção de casos de hanseníase no Brasil.
Fonte: BRASIL. Ministério da Saúde. *Vigilância em Saúde: situação epidemiológica da hanseníase no Brasil. SVS/DVE/PNCH. Brasília, 2008*

Estudos de tratamento de dados de notificação de hanseníase no SINAN permitiram a criação de um mapa do Brasil apresentando dez *clusters* de detecção de casos de hanseníase (**Figura 3**), a partir de grupos de cidades com os maiores coeficientes de detecção de casos novos no período de 2005 a 2007. Esses *clusters* mostram as regiões com maior risco da doença, possibilitando o direcionamento mais eficiente das políticas de controle e eliminação da hanseníase. No estado do Pará há dois *clusters*. O *cluster 1*, onde está inserida a região metropolitana de Belém, e perpassa pelo estado do Maranhão e o *cluster 7*, que insere municípios do Baixo Amazonas, como Oriximiná, e parte dos estados do Amazonas e Amapá (BRASIL – MS, 2008).

1.3. TRANSMISSÃO E INFECÇÃO

O homem é considerado a única fonte de transmissão da hanseníase, embora infecções naturais por *M. leprae* terem sido relatadas em animais silvestres, como o chimpanzé (*Pan troglodytes*), o macaco mangabeí (*Cercocebus torquatus atys*) e o tatu (*Dasytus novemcintus*) (FOSS, 1999).

O contato com o agente etiológico ocorre principalmente através das vias aéreas superiores, apesar de outras formas de contágio terem sido relatadas, como lesões da pele e mucosas. Apesar de o *M. leprae* não infectar a pele íntegra, a pele erodida, eventualmente, pode ser a porta de entrada da

infecção. Secreções orgânicas como o leite materno, esperma, suor e secreção vaginal podem eliminar bacilos, entretanto, não possuem importância epidemiológica do ponto de vista do contágio (ARAÚJO, 2003).

A infecção subclínica ocorre em uma grande proporção de pessoas que residem em áreas endêmicas, a maioria dos infectados são imunocompetentes, e impedem a progressão da doença (GOULART *et al.*, 2002).

O período de incubação da hanseníase dura em média de dois a cinco anos, e os doentes bacilíferos possuem grande importância na cadeia de transmissão da doença, pela possibilidade de eliminar os bacilos ao ambiente.

A disseminação e a manutenção de focos de infecção têm sido associadas às condições sócio-econômicas desfavoráveis, assim como fatores higiênico-sanitários e biológicos inaceitáveis à vida humana moderna. O domicílio é apontado como importante espaço de transmissão da hanseníase, embora ainda existam lacunas de conhecimento quanto aos fatores de riscos implicados, especialmente com o alto poder incapacitante da hanseníase e relacionados ao poder imunogênico do *M. leprae* (GOULART *et al.*, 2002; DEANNA *et al.*, 2004; MAGALHÃES & ROJAS, 2007).

1.4. O AGENTE ETIOLÓGICO

O *M. leprae* pertence a ordem *Actinomycetales*, subordem *Corynebacterineae*, família *Mycobacteriaceae*, gênero *Mycobacterium*, foi descrito pelo norueguês Gerhard Henrik Armaeur Hansen em 1873 como agente etiológico da hanseníase, e por isso também é conhecido como bacilo de Hansen, sendo o primeiro microrganismo classificado como causador de doença em seres humanos. A descoberta de um agente infeccioso descartou a teoria hereditária da hanseníase (JOPLING & HARMAN, 1986; MEIMA *et al.*, 2002; REES, 1985).

O *M. leprae* é um bacilo intracelular obrigatório que não forma esporo, é microaerófilo e álcool ácido resistente (BAAR) (**Figura 4**). Apresentando-se na forma de bastão reto ou ligeiramente curvo, com 1,5 a 8 µm de comprimento por 0,2 a 0,5 µm de largura, com um nucleoplasma espiralado envolto em uma membrana plasmática densa. Nos esfregaços de pele, linfa e cortes

histopatológicos, podem ser vistos isolados, em agrupamentos variados ou arranjos em estruturas denominadas globias, resultado da união das células através da gléia. Possui alta infectividade, baixa patogenicidade e alta virulência, sendo esta última representada pelo seu potencial incapacitante, responsável pelas deformidades e pelo estigma das pessoas frente à doença (Goulart et al., 2002; MURRAY *et al.*, 2004; Rees, 1985).

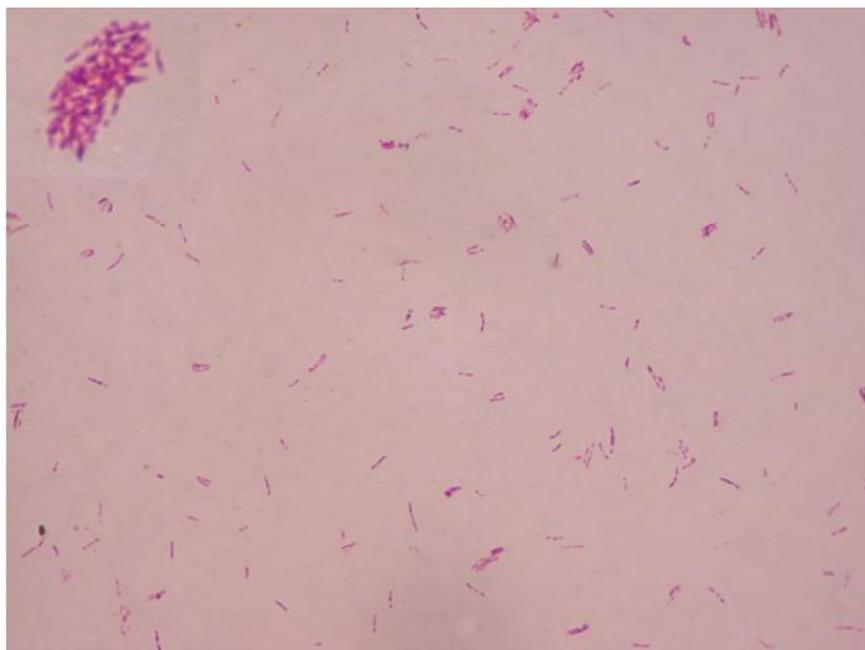


Figura 4: *Mycobacterium leprae* isolado de pele de paciente multibacilar e corado pelo método de Ziehl-Neelsen, 1000x.

Fonte: LDI

Os Macrófagos e as células de Schwann são as principais células infectadas pelo *M. leprae*, nas quais o bacilo é capaz de evadir da resposta imunológica do hospedeiro e encontrar um micro-ambiente favorável a sua multiplicação (RAMBUKKANA, 2000; RAMBUKKANA *et al*, 2002).

O *M. leprae* possui potencial de invadir as fibras do sistema nervoso periférico sensitivo, motor e autônomo, ocorrendo de forma isolada ou simultânea, como por exemplo, em lesões na pele onde ocorre a invasão tanto de fibras sensitivas como de fibras autônomas resultando em diminuições ou perdas da sensibilidade cutânea e sudorese (LEVINSON; JAWETZ, 2005). Em lesões das fibras motoras, a resposta muscular ao estímulo eferente do sistema nervoso pode ser diminuída ou abolida, resultando em paralisias e atrofia musculares (TALHARI *et al*, 2006).

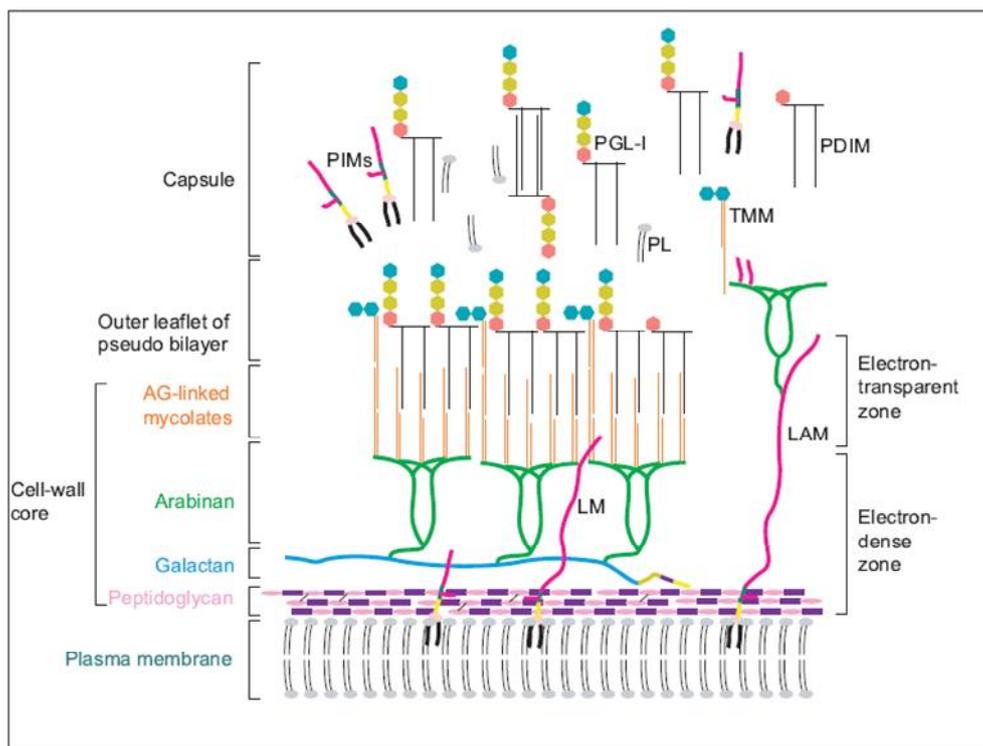


Figura 5: Representação esquemática das moléculas que compõem a parede celular do *M. leprae*.

Fonte: VISSA & BRENNAN, 2001.

A parede celular do *M. leprae* (**Figura 5**) contém peptidoglicanos, compostos por cadeias alternadas de N-acetilglicosamina e N-glicolilmuramato ligados por pontes peptídicas, que são ligados à camada de galactano pelo arabinogalactano. Cadeias de arabinanas são ligadas ao galactano e juntos com os peptidoglicanos formam uma zona elétron-densa (SCOLLARD *et al*, 2006).

A zona elétron-transparente da parede celular do *M. leprae* é composta por ácido micólico ligado a porção terminal da cadeia de arabinana, arranjos intercalando os ácidos micólicos com os monomicolatos de trealose e ácidos micoserosóicos com dimicoserosatos ftiocerol, assim como glicolipídeos fenólicos (PGLs). O PGL-1 (**Figura 6**) é o lipídeo dominante da parede celular que confere especificidade imunológica ao *M. leprae* (GUENIN-MACÉ *et al*, 2009; SCOLLARD *et al*, 2006; VISSA & BRENNAN, 2001).

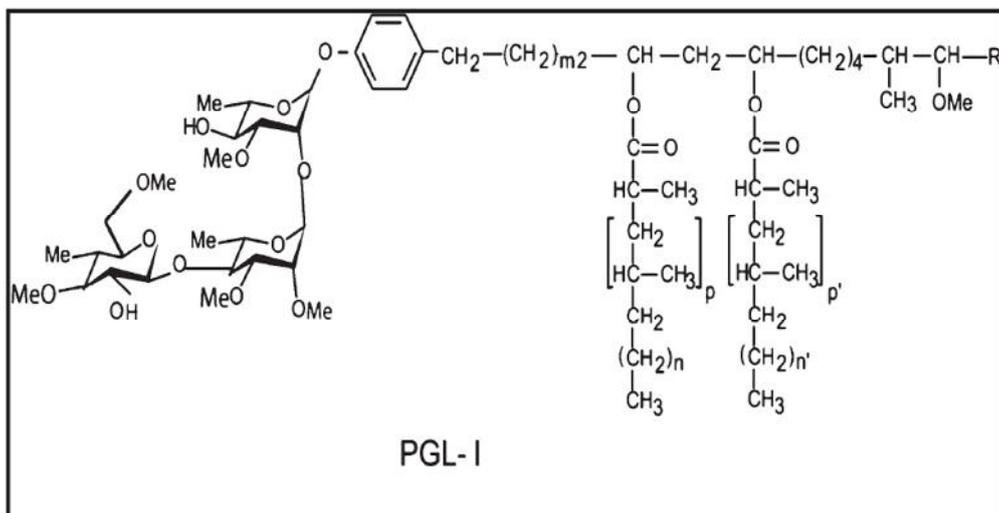


Figura 6: Representação espacial da molécula de glicolípido fenólico 1 (phenolic glycolipid – PGL-1).

Fonte: GUENIN-MACÉ *et al*, 2009.

A aplicação da genética molecular para estudo da hanseníase trouxe grandes contribuições para o entendimento da doença, particularmente no sequenciamento completo do genoma do *M. leprae* em 2001, a cepa TN, e em 2009 a cepa Br4923 (COLE *et al*, 2001; MONOT *et al*, 2009). O *M. leprae* apresenta diminuição no tamanho do genoma de cerca de 1 Mb, ou seja, 25% do genoma quando comparado ao *M. tuberculosis*, o que levou o microrganismo a perda da funcionalidade de vias do metabolismo central e intermediário, com o acúmulo de 1.133 pseudogenes e 1.604 regiões codificadoras. Como resultado, o *M. leprae* se tornou um organismo intracelular obrigatório (COLE *et al*, 2001; MAIDEN, 2009).

As análises de comparação genômica, permitiram a identificação e a genotipagem de cepas de *M. leprae*, obtidas em várias regiões do mundo. Informações de padrões de repetições de sequências curtas (VNTRs – Variable Number Tandem Repeats) ou de polimorfismo de base única (SNPs – Single-Nucleotide Polymorphisms) foram usadas para a classificação filogeográfica das diferentes cepas de *M. leprae*. Nesse sentido, foram identificados quatro (4) tipos de SNPs e 16 subtipos, sendo que o tipo 1 ocorre predominantemente na Ásia, algumas regiões do pacífico e leste da África, o tipo 2 é o mais raro e está presente na Etiópia, Malawi, Nepal/Norte da Índia e Egito, o tipo 3 é encontrado na Europa, norte da África e Américas e o tipo 4 no oeste da África e na região do Caribe. Esse estudo permitiu duas possibilidades para o cenário

evolutivo do *M. leprae*, o primeiro é o tipo 2 do leste africano/Ásia central, ter precedido o tipo 1, que migrou para o leste, e o tipo 3 que se disseminou para o oeste dando origem ao tipo 4 (**Figura 7**). A segunda hipótese é o tipo 1 ter sido o progenitor do tipo 2, que deu origem ao tipo 3 e 4 (MONOT, 2005).

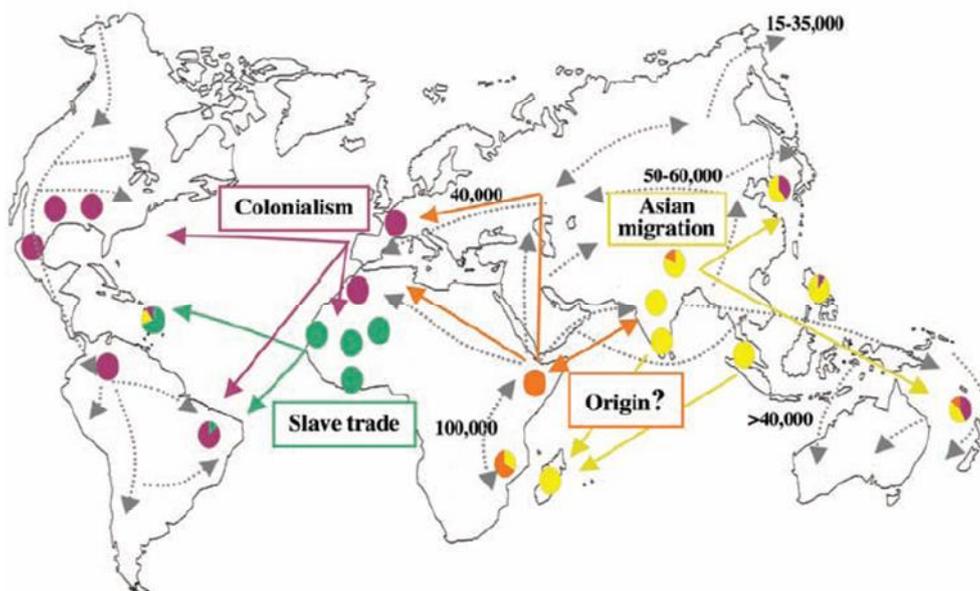


Figura 7: Disseminação da Hanseníase no Mundo. Os círculos representam os países de origem das amostras examinadas e suas distribuições entre os quatro tipos de SNPs. A cor amarela representa o tipo 1, laranja tipo 2, lilás tipo 3 e verde tipo 4, a cabeça de seta indica o sentido da distribuição das cepas.

Fonte: MONOT, 2005.

1.5. MODELOS EXPERIMENTAIS PARA ESTUDO DA HANSENÍASE

Os estudos experimentais em hanseníase podem ser divididos em duas principais fases, a primeira segue um período que vai de 1874 a 1960, chamados de “anos escuros”, e a segunda se segue após 1960. O primeiro período é caracterizado pelo uso de linhagens de células para a manutenção *in vitro* de cepas de *M. leprae*. Esse método fornecia poucas informações sobre o metabolismo e multiplicação do bacilo de Hansen, devido o decaimento da viabilidade da própria célula hospedeira.

A segunda fase aparece com os estudos de Shepard em 1959, que desenvolve um modelo *in vivo* para a manutenção de cepas de *M. leprae* em patas de camundongos, principalmente camundongos atímicos, provando que o tempo de multiplicação da micobactéria era longo, por volta de 14 dias. Essa nova fase revolucionaria as pesquisas em hanseníase, pois o Bacilo de Hansen não podia ser cultivado em meios artificiais e esse era um método inovador de se estudar a doença, como por exemplo para pesquisar um esquema mais eficaz de quimioterapia e viabilidade do bacilo, fortalecendo a desmistificação do emblema de incurável para a lepra (SCOLLARD *et al*, 2006; SHEPARD, 1960).

Em 1968, experimentos de Kirch-Heimer e Storrs demonstraram que o tatu (*Dasybus novemcintus*), que possui uma temperatura corporal entre 30 a 35°C, era suscetível a infecção pelo *M. leprae*, promovendo uma disseminação sistêmica, o que o tornou uma boa alternativa para o cultivo *in vivo* do bacilo. Esse modelo experimental permite a obtenção de grande quantidade de bacilos (SCOLLARD *et al*, 2006).

Modelos murinos de infecções intracelulares são utilizados para análise da resposta imune pela produção de citocinas, que demonstrou a presença de duas sub-populações de células T CD4⁺, envolvidas nas respostas imunes celular e humoral, denominadas de Th1 e Th2. A sub-população Th1 produz citocinas como interferon (IFN)- γ , interleucina (IL)-2 e IL-12, que são responsáveis pela manutenção da resposta imune celular. No entanto, no padrão Th2 as principais citocinas detectadas são IL-4 e IL-10, que são imunossupressoras da atividade macrofágica, produzindo bloqueio na estimulação de macrófagos, o que caracteriza como um mecanismo de escape do patógeno, com predomínio da resposta imune humoral (FOSS, 1997). Esse paradigma Th1 e Th2 é estendido para o entendimento das formas clínicas da hanseníase (GOULART *et al*, 2002).

1.6. CLASSIFICAÇÃO E TRATAMENTO

As principais características clínicas da hanseníase são lesões cutâneas maculares, hipocrômicas ou eritematosas, associadas ou não a infiltrações, pápulas ou nódulos, sempre com áreas apresentando alterações de sensibilidade, ou ainda espessamento de nervos periféricos com dor espontânea ou a palpação (GOULART *et al.*, 2002).

Em 1966, Ridley & Jopling propuseram uma classificação para a hanseníase baseada na resposta imune celular e no índice baciloscópio, segundo a qual, existem dois principais pólos da doença, a hanseníase Tuberculóide (TT), em que o paciente apresenta maior resposta imune celular e menor índice baciloscópio e o pólo da hanseníase Lepromatosa (LL), em que a resposta imune predominante é do tipo humoral com proliferação disseminada do bacilo.

Há ainda as formas instáveis da doença como a hanseníase Borderline-Tuberculóide (BT), Borderline-Borderline (BB) e Borderline-Lepromatosa (BL). Esta classificação leva em consideração não somente a condição clínica do paciente, como também a imunopatologia da doença (GOULART, 2002; OCHOA *et al.*, 1996). Ainda na década de 1970, foi introduzido o teste de Mitsuda³ para auxiliar no diagnóstico e orientação quimioterápica (SCOLLARD *et al.*, 2006).

A classificação de Ridley & Jopling considera não apenas aspectos clínicos como também resposta imune do hospedeiro, onde os indivíduos que são acometidos pela forma TT são menos susceptíveis a doença e apresentam resposta imune celular mais evidente, com predomínio da resposta tipo Th1, caracterizada pela produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-2, IFN- γ e o fator de necrose tumoral (TNF)- α (GOULART *et al.*, 2002).

Pacientes na forma LL da hanseníase possuem maior susceptibilidade a infecção, com disseminação da doença para órgãos internos. A resposta imune

³ O teste de Mitsuda é um teste de reação intradérmica tardia, com a aplicação de *M. leprae* biologicamente inviáveis na região medial do antebraço e avaliada após 21 a 28 dias, a partir da mensuração do diâmetro da lesão causada pela reação de resposta do indivíduo, com valor prognóstico e na classificação.

predominante é do tipo Th2, com produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10, IL-4 e IL-13, favorecendo a resposta humoral com grande produção de anticorpos. No entanto, como o *M. leprae* é um patógeno intracelular obrigatório, esse tipo de resposta é pouco efetiva no combate a infecção. Com a instituição da PQT e destruição do patógeno nos tecidos, a resposta imune celular começa a ser evidenciada, podendo se elevar a tal ponto que promova as reações hansênicas (GOULART *et al.*, 2002).

Com o objetivo de facilitar o diagnóstico da doença e o direcionamento do esquema terapêutico, a OMS estabeleceu uma classificação operacional na década de 1990, segundo a qual a hanseníase pode ser diferenciada em paucibacilar (PB) ou multibacilar (MB), dependendo do número de lesões, do acometimento neural e da baciloscopia (WHO, 2008).

O tratamento para a hanseníase, quando corretamente aplicado, garante a cura e pode ser realizado ambulatoriamente nas unidades básicas de saúde. A poliquimioterapia (PQT) é o tratamento padrão preconizado pela OMS para a eliminação da doença, constituída pela combinação dos medicamentos: rifampicina, dapsona e clofazimina (BEERS *et al.*, 1996; MS – BRASIL, 2010).

A administração da PQT preconizada pelo Ministério da Saúde do Brasil obedece a classificação operacional da hanseníase em PB ou MB, a associação das drogas foi instituída com o fim de evitar o surgimento de casos de resistência. Os pacientes PB realizam o tratamento com seis *blisters* contendo rifampicina e dapsona, divididas em doses mensais supervisionadas e diárias auto administradas. Os pacientes classificados com hanseníase na forma multibacilar recebem tratamento com doze *blisters*, com a combinação de rifampicina, clofazimina e dapsona, também divididas em doses mensais supervisionadas e diárias auto administradas (FOSS, 1999; MS – BRASIL, 2010).

Episódios agudos reacionais, denominados de reações hansênicas, frequentemente aparecem no curso da doença, durante ou após o tratamento. Os episódios reacionais afetam principalmente pele e nervos, acompanhados de neurites, o que pode resultar em incapacidade física, muitas vezes irreversível. A neuropatia, desencadeada pela infecção do *M. leprae* nas

células de Schwann das fibras do sistema nervoso periférico, pode ser acompanhada de dor, devido o processo inflamatório (RAMBUKKANA, 2000; GOULART *et al.*, 2002;).

As reações hansênicas podem ser classificadas em tipo 1 (ou Reação Reversa) e tipo 2 (ou Eritema Nodoso Hansênico – ENH). A reação tipo 1 é caracterizada por apresentar episódios de hipersensibilidade tipo 1, ocorre frequentemente em pacientes paucibacilares e na forma dimorfa, está associada ao aumento da resposta imune celular, com o *clearance* dos bacilos e ao direcionamento do espectro ao polo tuberculóide. Na reação do tipo 2 ocorre um processo inflamatório sistêmico com uma reação de hipersensibilidade tipo 3, resultante da deposição de imunocomplexos em qualquer tecido contendo antígeno do *M. leprae*, devido ao grande aumento da resposta imune humoral com produção de anticorpos. Usualmente são pacientes com alta carga bacilar, nas formas DL e LL em tratamento ou não (GOULART *et al.*, 2002; FOSS, 1999).

1.7. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico precoce da hanseníase é de fundamental importância para o controle da doença, principalmente, por seu potencial incapacitante. Vários métodos têm sido desenvolvidos para auxiliar no diagnóstico clínico da hanseníase, como a baciloscopia, os testes sorológicos e a detecção molecular (MARTELLI *et al.*, 2002).

1.7.1. BACILOSCOPIA

A baciloscopia possui importância no diagnóstico, classificação e monitoramento da hanseníase. Deve ser realizada em todos os pacientes com suspeita clínica de hanseníase. É realizado um esfregaço em lâmina a partir de um raspado intradérmico de quatro sítios diferentes, com preferência para uma lesão ativa ou área com alteração de sensibilidade, além dos dois lóbulos auriculares e do cotovelo contralateral à lesão. No entanto, na ausência de lesão o material é colhido dos dois lóbulos auriculares e ambos os cotovelos. As lâminas são, então, coradas pelo método de Ziehl-Neelsen, no qual os

bacilos permanecem na cor róseo-avermelhada, da fuccina, devido sua propriedade álcool ácido resistente (MS –BRASIL, 2006).

O índice baciloscópio (IB), é representado pela escala logarítmica de cada esfregaço examinado, representado pela média dos índices dos esfregaços. Deve-se examinar em microscopia óptica cem campos para calcular o IB relacionado abaixo, de acordo com a escala de Ridley e Jopling (BATISTA *et al*, 2006).

IB = 0: nenhum bacilo em 100 campos examinados.

IB = 1+: um a dez bacilos em 100 campos examinados.

IB = 2+: um a dez bacilos em 10 campos examinados.

IB = 3+: um a dez bacilos por campo examinado.

IB = 4+: onze a cem bacilos por campo examinado.

IB = 5+: cem a mil bacilos por campo examinado.

IB = 6+: acima de mil bacilos por campo examinado.

A observação microscópica da morfologia do bacilo, levando em consideração a integridade da parede de bacilos isolados, é quantificada em porcentagem de acordo com o número de bacilos observados para cada esfregaço, gerando o indicador índice morfológico (IM), com grande contribuição no prognóstico da hanseníase (BATISTA *et al*, 2006).

As formas multibacilares (MB) apresentam baciloscopia positiva e as formas paucibacilares (PB) são negativas. O resultado do IB está sujeito revisão pelos centros de referências ou laboratórios centrais (BATISTA *et al*, 2006).

1.7.2. SOROLOGIA

O isolamento do PGL-1 natural e o desenvolvimento de moléculas sintéticas com epítomos do PGL-1, aliados a especificidade da molécula, permitiram sua aplicabilidade na detecção de anticorpos anti-PGL-1 em indivíduos que entraram em contato com o *M. leprae*. A partir dessa descoberta

vários métodos de detecção de anticorpos anti-PGL-1 começaram a ser desenvolvidos para auxiliar no diagnóstico e epidemiologia da hanseníase. Os testes mais utilizados na clínica e pesquisa atualmente no Brasil são o ML-Flow e o ELISA, ambos capazes de detectar anticorpos IgM anti-PGL-1 presentes no plasma humano (BUHRER-SÉKULA *et al.*, 2000; CHO *et al.*, 1983).

O ML Flow é um teste rápido e muito simples de ser executado, possui alta especificidade e sensibilidade. Sua leitura é visual e apresenta proporcionalidade com a carga bacilar do paciente, por esse motivo tem sido muito utilizado para a classificação de pacientes em paucibacilar e multibacilar (BUHRER-SÉKULA *et al.*, 2001). A utilização do ML Flow trouxe grandes contribuições no estudo da epidemiologia da hanseníase em áreas endêmicas e não endêmicas, como monitoramento e possível indicador de infecção (BUHRER-SÉKULA *et al.*, 2003).

O ELISA anti-PGL-1 é um teste bastante utilizados por apresentar uma sensibilidade superior ao ML Flow, sua aplicabilidade está na investigação de soroprevalência, infecção subclínica, detecção precoce da doença e exame complementar ao diagnóstico, além da monitorização da PQT e prevenção de recidivas (SPENCER *et al.*, 2011; WU *et al.*, 1999).

1.7.3. DIAGNÓSTICO MOLECULAR

A biologia molecular tem sido muito utilizada como ferramenta para a detecção de patógenos, tratamento precoce e prevenção de doenças. A reação em cadeia da polimerase (PCR) é a técnica mais utilizada na identificação de agentes infecciosos e permite a detecção de um pequeno número de microrganismos patogênicos em qualquer tecido humano. Baseia-se na amplificação de pequenas regiões genômicas do organismo desejado por meio de iniciadores predeterminados, em condições *in silico* adequadas (RAMAPRASAD *et al.*, 1997; RAFI *et al.*, 1994).

A PCR é uma técnica altamente sensível e específica, sua utilização recente na detecção do *M. leprae* supera a histopatologia e a baciloscopia, permitindo detectar aproximadamente 5 micobactérias na amostra investigada,

em indivíduos que foram infectados (RAMAPRASAD *et al.*, 1997; RAFI *et al.*, 1994; YOUNG, 2003).

Estudos recentes utilizando a PCR tem demonstrado a presença do *M. leprae* em *swab* nasal de pessoas clinicamente saudáveis, comunicantes ou não de hanseníase, evidenciando seu valor na identificação de infecção subclínica e portadores sadios (KLATSER *et al.*, 1993; RAMAPRASAD *et al.*, 1997).

O sequenciamento completo do genoma do *M. leprae* permite a investigação de regiões gênicas específicas e que melhor possam contribuir para aumentar a sensibilidade da PCR, pois a escolha correta dos iniciadores de sequência para a amplificação do fragmento desejado na detecção do microrganismo, permite sua fácil aplicabilidade e confiabilidade em estudos de investigação epidemiológica e diagnóstica (MONOT *et al.*, 2001).

Nesse estudo implantamos uma nova técnica para detecção de DNA de *M. leprae* em *swab* nasal, com o desenho e utilização dos iniciadores 5' TTGAATGGCATTAAAGTGTCAAGG-3' e 5' TTCTAGATCGTTGCCGAATT-3' que amplificam um fragmento de 245 bases, a partir do gene ML0579, responsável pela transcrição da proteína *6-phosphogluconolactonase*. Esses iniciadores são espécie específica com 100% de identidade para o *M. leprae*.

2. JUSTIFICATIVA

Segundo a OMS, o Brasil e a Índia, em 2009, foram os países com população acima de 1 milhão de habitantes que apresentaram os maiores índices de prevalência e de detecção de novos casos de hanseníase em todo o mundo. O Norte do Brasil é classificado como hiperendêmico por décadas, com índices de prevalência e detecção acima da média nacional. O Pará e o Maranhão, segundo o departamento de informática do sistema único de saúde, apresentam os maiores índices de detecção da hanseníase em 2010 se comparados aos demais estados brasileiros (DATASUS - MS, 2011). Isso demonstra que a hanseníase ainda é um sério problema de saúde pública e que deve ser tomada de forma homogênea em todo o território nacional (SALGADO & CRUZ, 2007), justificando a necessidade de aumento dos esforços de políticas públicas na tentativa de alcançar as metas de eliminação da hanseníase em um futuro próximo.

Os mecanismos precisos de transmissão, assim como as explicações para a biologia da infecção do *M. leprae* no hospedeiro não estão completamente compreendidos, fazendo-se necessárias pesquisas de investigação sorológica e de detecção molecular da infecção pelo *M. leprae* em indivíduos que residem em áreas endêmicas. A identificação daqueles que já tiveram contato com o *M. leprae* pode contribuir para o melhor entendimento do risco de adoecimento em regiões endêmicas e na elaboração de políticas públicas direcionadas ao controle da hanseníase, além de favorecer o diagnóstico precoce e permitir a construção de novos conhecimentos sobre a doença.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

- i. Correlacionar informações sócio epidemiológicas com a presença de anticorpos IgM anti-PGL-1 em amostras de sangue periférico e a detecção de DNA do *M. leprae* em amostras da mucosa nasal de casos e comunicantes de hanseníase e escolares de Oriximiná, estado do Pará.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i. Detectar anticorpos IgM anti-PGL-1 a partir do sangue periférico de casos-índices e comunicantes de hanseníase, selecionados randomicamente, entre os que foram notificados no período de 2004 a 2008 no município de Oriximiná, estado do Pará.
- ii. Detectar anticorpos IgM anti-PGL-1 a partir de sangue periférico de escolares da rede pública de ensino do município de Oriximiná.
- iii. Estabelecer uma técnica de biologia molecular, através da reação em cadeia da polimerase, para diagnóstico molecular da infecção pelo *M. leprae*.
- iv. Detectar o DNA do *M. leprae* por biologia molecular em amostras da mucosa nasal de casos-índices e comunicantes de hanseníase, selecionados randomicamente, entre os que foram notificados no período de 2004 a 2008, no município de Oriximiná.
- v. Detectar o DNA do *M. leprae* por biologia molecular em amostras da mucosa nasal de escolares da rede pública, selecionados randomicamente, no município de Oriximiná.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Esse estudo foi realizado em três etapas: na primeira ocorreu a aplicação de questionários sócio-epidemiológicos no domicílio dos casos e comunicantes de hanseníase e em escolares voluntários presentes nas escolas da rede pública visitadas, exame dermato-neurológico e coleta de material biológico (sangue total e *swab* da mucosa nasal) para exames. Na segunda etapa foi realizada a preparação, o transporte e o acondicionamento das amostras. Por fim, a realização dos testes sorológicos e moleculares. As análises sorológicas foram executadas no Laboratório de Dermato-Imunologia, em Marituba, e os testes de biologia molecular no Laboratório de Genética Humana e Médica no Campus do Guamá da Universidade Federal do Pará, em Belém.

4.1. ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo obedece às normas da resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, e faz parte de um projeto maior intitulado “Detecção e análise da variação genotípica do *Mycobacterium leprae* de casos-índice e comunicantes em regiões endêmicas do Estado do Pará”, o qual possui parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará, sob protocolo número 197/07 (**ANEXO I**).

4.2. TIPO DE ESTUDO

Este é um estudo do tipo prospectivo, randomizado, observacional, descritivo e analítico, com a aplicação de questionários sócio-epidemiológicos e coleta de amostras biológicas.

4.3. LOCAL DE REALIZAÇÃO

Oriximiná é um município localizado na mesorregião do Baixo Amazonas, do estado do Pará, com uma população de 58.683 habitantes em 2009 (IBGE, 2010) e coeficiente de detecção (hanseníase) de 18,7 por 100.000 habitantes, portanto de alta endemicidade.

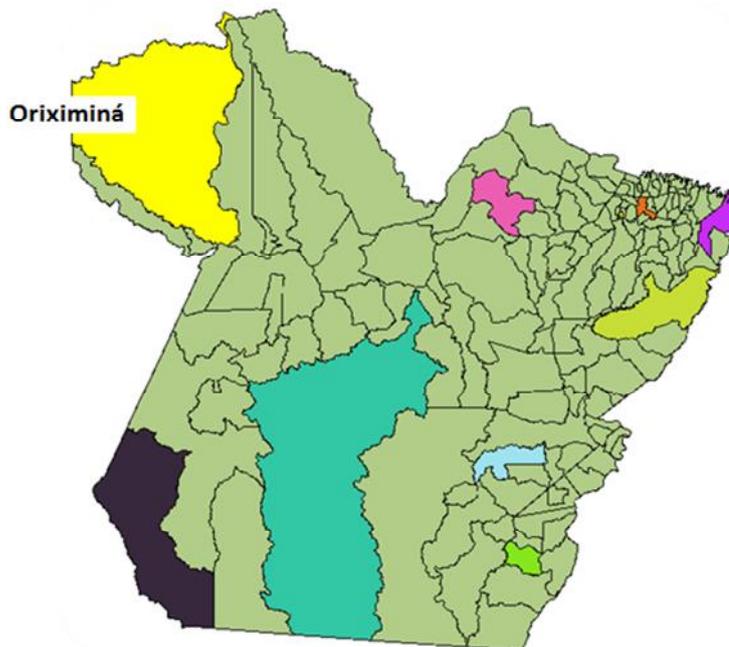


Figura 8: Mapa do estado do Pará, com a identificação do município de Oriximiná.
Fonte: LDI, 2010.

4.4. POPULAÇÃO ESTUDADA

Quarenta e dois casos de hanseníase notificados no Sistema de Informação de Notificação de Agravos no período de 2004 a 2008, no município de Oriximiná, estado do Pará, foram selecionados randomicamente e suas residências foram visitadas em outubro de 2009, por nossa equipe de saúde multidisciplinar, composta por profissionais da Unidade de Referência em Dermatologia Sanitária Dr. Marcelo Candia, de Marituba, Pará, e pesquisadores do Laboratório de Dermato-Imunologia. Um questionário sócio-econômico-cultural e de informações clínicas (**ANEXO II**) foi aplicado em cada residência correspondente ao caso de hanseníase notificado, amostras de sangue periférico e swab nasal foram coletadas dos casos-índices e de até cinco comunicantes presentes no momento da visita, quando foi realizado o exame clínico-dermatológico dos participantes por um médico hansenologista. Todos os indivíduos incluídos nesse estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido contido no questionário. Foram visitadas seis escolas, onde foram ministradas palestras, informações e esclarecimentos sobre hanseníase. Em seguida, 139 escolares na faixa etária de 8 a 18 anos

concordaram em participar do estudo, após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido pelos respectivos pais (**ANEXO II**). Sangue periférico total e swab nasal foram coletados.

4.5. CRITÉRIOS DE ESCOLHA

4.5.1. DO MUNICÍPIO

Ter notificados casos de hanseníase residentes no período de 2004 a 2008.

Possuir menos de 200 mil habitantes no ano de 2009.

4.5.2. DOS CASOS ÍNDICES

Ter sido notificado como caso de hanseníase no período de 2004 a 2008, no município de Oriximiná.

Após ser esclarecido sobre o estudo, aceitar participar e assinar o termo de consentimento livre e esclarecido.

4.5.3. DOS ESCOLARES

Ser aluno matriculado em uma das escolas públicas visitadas.

Possuir idade entre 8 e 18 anos.

Ser selecionado randomicamente para participar do estudo.

Ter sua participação aprovada pelos respectivos pais ou responsável legal, assinando o termo de consentimento livre e esclarecido.

4.6. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

4.6.1. DO MUNICÍPIO

O município não aceitar fornecer informação da secretaria municipal de saúde sobre os casos de hanseníase notificados no período de 2004 a 2008.

Impossibilidade logística para efetivar a viagem da equipe de profissionais de saúde e pesquisadores até o município.

4.6.2. DOS CASOS ÍNDICES

Ter mudado de residência ou não estar presente no momento da visita pela equipe.

Impossibilidade de localização ou acesso à residência.

Impossibilidade de fornecer informações para preenchimento do questionário e/ou coleta de material biológico.

4.6.3. DOS ESCOLARES

Escolar cujos pais não aceitem participar do estudo.

Escolar que não permitir a coleta de material biológico, mesmo com o aceite dos pais ou responsável.

4.7. AMOSTRAS BIOLÓGICAS

As amostras foram coletadas, manuseadas, transportadas e acondicionadas de acordo com as normas de biossegurança e boas práticas de laboratório (<<http://www.anvisa.gov.br>>). Os materiais foram descartados de acordo com as normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (**ANVISA**). O sangue periférico foi coletado à vácuo com EDTA (ácido etilino-dietil-tetracético) como anticoagulante, em seguida, foi centrifugado a 3.000rpm por três minutos, o plasma separado das células sanguíneas, e estocado a -20°C para transporte até o Laboratório de Dermato-Imunologia, onde se manteve o acondicionamento em freezer -80°C, até o momento da realização do teste. Os *swabs* da mucosa nasal foram coletados dos casos e comunicantes de hanseníase e escolares, colocados em tubo contendo solução de lise de células e mantidos em refrigeração a 4°C para transporte até o Laboratório de Genética Humana e Médica para início do processo de extração do DNA do *M. leprae*.

4.8. ELISA PARA DETECÇÃO DE IgM HUMANO anti-PGL-1

O antígeno PGL-1 nativo foi fornecido pelo Dr. John S. Spencer, da Colorado State University, USA. O PGL-1 foi diluído em etanol P.A. para uma concentração de 1mg/mL, e estocado em geladeira. Para a sensibilização da

placa diluímos a solução de PGL-1 em etanol P.A. para 0,5µg/50µL e distribuímos 50µL nos poços referente às amostras (cada amostra foi testada em duplicata e possuía seu respectivo branco, sem sensibilização pelo antígeno) (SPENCER *et al.*, 2011). Em seguida, a placa ficou em temperatura ambiente *overnight* no fluxo laminar, para evaporar todo o álcool da solução de PGL-1. Posteriormente se adicionou 200 µL de PBS-BSA 3% (Sigma-Aldrich A7906, St. Louis, MO, USA) em cada poço para bloqueio, e após 1 hora a placa foi lavada por duas vezes com 200 µL de PBS-BSA 3%, sendo que na segunda vez a solução de lavagem permaneceu na placa por 15 minutos. As amostras de plasma a serem testados, foram diluídas 1:200 em solução de PBS-BSA 3%. Em seguida, 100 µL de cada amostra foram adicionados em seus respectivos poços, cada amostra foi testada em duplicata e possuía seu respectivo branco.

Esperou-se 2 horas em temperatura ambiente para se lavar a placa por 6 vezes, sendo 5 vezes com 200 µL de solução de PBS-BSA 0,3% e a última lavagem desta etapa com 200 µL de solução de PBS-BSA 3%, deixando por 15 minutos na placa para se desprezar esta solução e adicionar 100 µL de anticorpo secundário anti-IgM humano conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich A0420, St. Louis, MO, USA) diluído 1:10000 em PBS-BSA 3%. Incubou-se em temperatura ambiente por 2 horas para reação anticorpo primário e anticorpo secundário, após esse período foram realizadas 6 lavagens, sendo 5 vezes com 200 µL de solução de PBS-BSA 0,3% e a última lavagem desta etapa com 200 µL de solução de PBS-BSA 3%, deixando por 15 minutos na placa. Em seguida se realizou mais 2 lavagens, desta vez somente com 200 µL PBS 1X, desprezou-se a solução de lavagem e foi colocado 100 µL de solução de OPD (SIGMAFAST™ OPD, Sigma-Aldrich P9187, St. Louis, MO, USA) em cada poço. Após 30 minutos adicionou-se 50 µL de H₂SO₄ 4N, e esperou-se 10 minutos para realizar a leitura da densidade óptica da reação em leitora de ELISA MRX Revelation 4.25 microplate reader (Dyner Technologies, Chantilly, VA, USA) com comprimento de onda de 490nm.

O ponto de corte (*cut-off*) do teste ELISA para IgM anti-PGL-1 foi calculado em até 0,295 de densidade óptica como valor máximo para ser considerado negativo, através da média mais três vezes o desvio padrão da

densidade óptica de amostras de pessoas considerados clinicamente saudáveis, casos de hanseníase com o teste ML flow negativo e indivíduos com outras doenças infecciosas endêmicas da região amazônica.

4.9. EXTRAÇÃO DE DNA

O material genômico do *M. leprae* foi isolado a partir de *swab* nasal pelo método de fenol-clorofórmio (SAMBROOK *et al*, 1989). Após as coletas, o *swab* da mucosa nasal foi inserido em tudo contendo 0,5 mL de lise de células (25mM Tris-HCl; 50mM EDTA; 400mM NaCl; pH 8,0). Em seguida, colocou-se 20µL de SDS 10% no tubo, 30µL de proteínase K (10mg.mL⁻¹) e se incubou *overnight* em banho-maria a 65°C. No dia seguinte, o tubo foi retirado do banho-maria e se acrescentou 150 µL de acetato de amônio (76,8mM), agitou-se rapidamente em agitador automático e o tubo retornou novamente ao banho-maria, desta vez a 56°C por 30 minutos.

Em seguida, retiramos do banho-maria e o *swab* foi retirado do tubo, para se acrescentar 250 µL de fenol e 250 µL de clorofórmio, agitou-se e o tubo foi centrifugado por 10 minutos a 13.000rpm. Em seguida, em torno de 600 µL do sobrenadante foi transferido para um tubo novo e foi adicionado 500 µL de uma solução de clorofórmio/isopropanol (na proporção de 24:1, respectivamente), agitou-se e centrifugou por 10 minutos a 13.000rpm. Novamente, em torno de 600 µL do sobrenadante foi transferido para um novo tubo e se adicionou isopropanol puro e gelado até completar um volume de 1,5 mL, homogeneizou-se por inversão e o tubo foi colocado no congelador *overnight*. No dia seguinte, o tubo foi centrifugado por 20 minutos a 13.000rpm e o sobrenadante foi desprezado, aguardou-se aproximadamente 2 horas até todo o isopropanol evaporar e hidratou-se o DNA com água ultrapura ajustando a concentração para 40ng/ µL.

4.10. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Para a detecção molecular do *M. leprae* foram desenhados os iniciadores 5' TTGAATGGCATTAAAGTGTCAAGG-3' e 5' TTCTAGATCGTTGCCGAATT-3', direto e reverso, respectivamente, a partir do software Primer 3 (Institute for Biomedical Research, Steve Rozen). Estes iniciadores amplificam um

fragmento de 245 pares de bases, a partir do gene ML0579 do *M. leprae*, responsável pela transcrição da proteína *6-phosphogluconolactonase*. O anelamento dos iniciadores foi testado no software BLAST (National Library of Medicine, US government), evidenciando 100% de identidade somente para o *M. leprae*, demonstrando serem iniciadores espécie específicos. A solução de PCR contém 10,1µL de água ultrapura, 2,5µL de PCR buffer 10X (10mM Tris-HCl, pH 8,3, 50mM KCl) (Invitrogen), 1,5µL (1,8mM) de cloreto de magnésio (MgCl₂), 4µL (200µM) de desoxirribonucleares trifosfatados (dNTP), 1,5µL de Dimetil sulfóxido (DMSO), 1,5µL (10pM) de cada iniciador, 0,4µL (2.0 U) de TaqDNA polimerase (Invitrogen) e 2µL de DNA extraído.

A PCR foi realizada em termociclador Veriti (Applied Biosystem), de acordo com as seguintes condições: 95°C por 5 minutos para a desnaturação inicial, 35 ciclos de amplificação a 95°C por 45 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto. A extensão final foi realizada a 72°C por 30 minutos e a finalização a 4°C por 5 minutos. Os produtos da PCR foram analisados em eletroforese em gel de agarose a 2% corado com Cybr safe DNA (Invitrogen) e fotografados sob luz ultravioleta (UV) em sistema de vídeo documentação (ImageGel) (**Figura 8**).

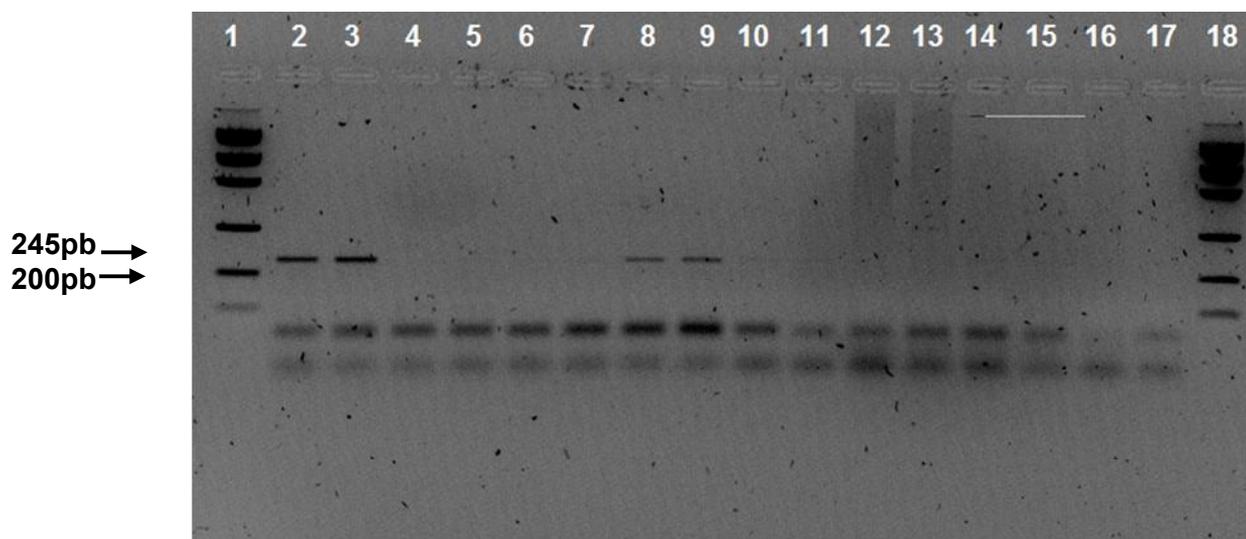


Figura 9: Produtos de PCR para detecção de DNA do *M. leprae*, a partir de swab da mucosa nasal. Colunas 1 e 18 ladder (bandas de 100, 200, 400, 800, 1200 e 2000pb); 2 e 3 pacientes MB; 4 e 5 controles negativos; 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 e 17 amostras.

4.11. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas utilizando a combinação dos softwares Graphpad Prism 5.0 e BioEstat 5.0. Os testes empregados foram *t Student* para averiguar diferenças estatísticas entre as variáveis estudadas, análise de regressão em gráficos de tendências, meta-análise (risco relativo) para hipótese de diferença estatística considerando o risco de positividade e análise de variância para diferença estatística para resultados favoráveis entre diferentes grupos ou variáveis. O nível de significância para as análises empregadas foi de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

Quarenta e dois questionários clínico-sócio-epidemiológicos foram aplicados, divididos em 39 casos-índices e 126 comunicantes de hanseníase notificados no período de 2004 a 2008 e 3 casos novos, entre os comunicantes, diagnosticados e encaminhados para tratamento no momento da visita domiciliar, pelo médico hansenologista integrante da equipe. Seis escolas da rede pública de ensino também foram visitadas e informações sócio-epidemiológicas coletadas de 139 escolares. As aplicações dos questionários foram acompanhadas de coleta de material biológico para detecção molecular de DNA do *M. leprae*, a partir da mucosa nasal, e sorológica pelo teste ELISA para detecção de anticorpos IgM anti-PGL-1 em cada indivíduo participante.

O número de casos utilizados nas análises estatísticas foi 35, devido a análise separada de 3 casos novos e a exclusão de 4 casos índices que não tiveram nenhum comunicante participante do estudo.

A **Tabela 1** mostra os escores, mínima e máxima, mediana, média aritmética e desvio padrão da idade comparada dos casos novos, casos-índices e comunicantes de hanseníase e escolares. Os três casos novos tinham 20 e 45, como menor e maior idades e média aritmética 29. Entre os casos índices de hanseníase a menor idade era 7 anos e a maior 77, 46% estavam na faixa etária de 20 a 40 anos.

Os comunicantes de casos de hanseníase foram 126, com média de idade 24,2 anos, sendo a menor idade 5 anos e a maior 78 anos.

Tabela 1: Estatística descritiva da idade dos casos e comunicantes de hanseníase e escolares de Oriximiná – PA.

Variáveis	Casos - índices	Comunicantes	Casos Novos	Escolares
Número	35	126	3	138
Mín - Máx	13 - 77	5 - 78	20 - 45	8 - 18
Mediana	32	18	22	12
Média Aritmética	38,2	24,2	29	12,5
Desvio Padrão	19,7	17,4	13,9	3,4

Cento e trinta e oito escolares fizeram parte desse estudo, com média de idade 12,5 anos, a menor idade era 8 anos e a maior 18.

Na distribuição dos grupos estudados, segundo a **Tabela 2**, 66% dos casos são do gênero masculino, 65% dos comunicantes do gênero feminino, um dos três casos novos era do gênero masculino e 42% dos escolares eram do gênero masculino.

Tabela 2: Distribuição por frequência de cada grupo estudado de acordo com o gênero dos indivíduos.

Grupos	Gênero	Número	Porcentagem (%)
Casos - índices	Masculino	23	66
	Feminino	12	34
Comunicantes	Masculino	44	35
	Feminino	82	65
Casos Novos	Masculino	1	33
	Feminino	2	67
Escolares	Masculino	58	42
	Feminino	80	58

5.1. CASOS E COMUNICANTES

A **Tabela 3** demonstra que 60% dos casos de hanseníase são naturais de Oriximiná, 63% possuíam menos que sete anos de estudo regular, 57% tinham uma renda de 2 salários mínimos e 26% de até um salário, 74% recebem aposentadoria ou pensão do Estado, 74% residem na casa visitada por mais de cinco anos, 48,5% relataram que já sofreram privação alimentar por insuficiência financeira, 48,5% possuíam três ou quatro cômodos em sua residência e 23% 1 ou 2 cômodos, em 68,5% das residências moravam mais de cinco pessoas e 66% informaram que há cômodos na residência em que dormem ou convivem três ou mais pessoas.

Tabela 3: Características sócio-epidemiológicas dos casos de hanseníase notificados no período de 2004 a 2008, em Oriximiná- PA.

Variável	Descrição	Número	Porcentagem (%)
Gênero	Masculino	23	66
	Feminino	12	34
Naturalidade	Oriximiná	21	60
	Outra cidade (PA)	8	23
	Outro estado	6	17
Escolaridade	1 a 3 anos	10	29
	4 a 7 anos	12	34
	8 a 12 anos	12	34
	S.I.	1	3
Renda	≤ 1 salário	9	26
	2 salários	20	57
	≥ 3 salários	5	14
	S.I.	1	3
Benefício	Não	12	34
	Aposentadoria	9	26
	Pensão permanente	4	11,5
	Bolsa família	4	11,5
	Outro benefício	6	17
Tempo de Residência	≤ 5 anos	8	23
	6 - 10 anos	17	48
	> 10 anos	9	26
	S.I.	1	3
Privação Alimentar	Sim	17	48,5

	Não	18	51,5
Nº de cômodos na casa	1 - 2	8	23
	3 - 4	17	48,5
	5 - 7	8	23
	S.I.	2	5,5
Nº de pessoas na casa	≤ 2	3	8,5
	3 - 4	6	17
	5 - 7	15	43
	8 - 10	6	17
	> 10	3	8,5
	S.I.	2	6
Mais de dois por dormitório	Sim	23	66
	Não	12	33

S.I. = Sem Informação.

Considerando os aspectos clínico-epidemiológicos a **Tabela 4** mostra que 37% dos casos de hanseníase conviveram intra ou extradomiciliar com pessoas que foram diagnosticadas com hanseníase. Sessenta e cinco por cento dos casos foram classificados com grau de incapacidade zero, 23% não possuíam cicatriz da vacina BCG e 40% apresentaram uma cicatriz de BCG, 31% foram classificados com hanseníase na forma indeterminada, 3% na forma tuberculóide, 23% na forma borderline-tuberculóide, 3% borderline-lepromatosa e 6% lepromatosa. Quanto aos episódios de reações hansênicas, 11,5% declararam que já haviam sofrido episódios reacionais.

Tabela 4: Características clínico-epidemiológicas dos casos de hanseníase notificados no período de 2004 a 2008, em Oriximiná- PA.

Variável	Descrição	Número	Porcentagem (%)
Conviveu com portador de hanseníase	Sim	13	37
	Não	22	63
Grau de Incapacidade	0	23	65,5
	1	3	8,5
	2	1	3
	S.I.	8	23
Nº de BCG	0	8	23
	1	14	40
	2	7	20

	S.I.	6	17
Forma Clínica	I	11	31
	TT	1	3
	BT	8	23
	BB	0	0
	BL	1	3
	LL	2	6
	S.I.	12	34
Nº de lesões	≤ 5	24	68,5
	≥ 6	7	20
	S.I.	4	11,5
Reação Hansênica	Sim	4	11,5
	Não	31	88,5

S.I. = Sem Informação.

As características sócio-clínico-epidemiológicas dos contatos de hanseníase estão demonstradas na **Tabela 5**, onde 32% eram filhos dos casos, 10,5% pais, 21,5% irmãos, 12% cônjuges, 12,7% parentes consanguíneos, 7% parentes não consanguíneos e 3% não parentes. Sessenta e dois por cento declararam conviver com o referido caso por dez ou mais anos, sendo 86,5% no convívio intradomiciliar. Cinquenta e oito por cento possuíam uma cicatriz da vacina BCG e 13,5% nenhuma cicatriz.

Tabela 5: Características sócio-clínico-epidemiológicas dos comunicantes de casos hanseníase, em que os casos foram notificados no período de 2004 a 2008, em Oriximiná- PA.

Variável	Descrição	Número	Porcentagem (%)
Grau de Parentesco	Filho	41	32,5
	Pais	13	10,5
	Irmão (s)	27	21,5
	Cônjuge	15	12
	Parente Consanguíneo	16	12,7
	Parente Não Consanguíneo	9	7
	Não Parente	4	3
	S.I.	1	0,8
Período de Convivência (anos)	< 5	8	6,3
	5 e 10	29	23
	> 10	79	62,7
	S.I.	10	8

Tipo de Convívio	Intradomiciliar	109	86,5
	Extradomiciliar	13	10,3
	S.I.	4	3,2
Nº de BCG	0	17	13,5
	1	73	58
	2	35	27,7
	S.I.	1	0,8

S.I. = Sem Informação.

5.2. ELISA IgM anti-PGL-1

A **Tabela 6** apresenta os resultados de ELISA anti-PGL-1 dos casos testados, 65,5% foram positivos, dentre os quais 11 (40%) eram do gênero masculino. Os resultados negativos para o teste ELISA IgM anti-PGL-1 foram 34,5%, dos quais 7% eram mulheres. Seis amostras não foram testadas por isso não estão incluídas na análise estatística.

Tabela 6: Positividade do teste de ELISA IgM anti-PGL-1 dos casos de hanseníase.

ELISA anti-PGL-1	Gênero	Quantidade	Porcentagem (%)
Positivo	Masculino	11	54,3
	Feminino	8	
Negativo	Masculino	8	28,6
	Feminino	2	
S.A.		6	17,1
Total Geral		35	100

S.A. = Sem Amostra para teste.

A distribuição dos casos positivos para o teste de ELISA IgM anti-PGL-1 em relação a classificação operacional e de Ridley e Jopling está apresentada na **Tabela 7**. A porcentagem de casos positivos para o teste de ELISA IgM anti-

PGL-1 foi de 54,3%, dentre os casos ELISA positivos 63% são Multibacilares, com predominância da forma borderline-tuberculóide. No entanto, entre os paucibacilares ELISA IgM anti-PGL-1 positivos, 31% eram da forma indeterminada.

Tabela 7: Distribuição dos casos ELISA anti-PGL-1 positivos de acordo com a classificação operacional no Ministério da Saúde e a de Ridley e Jopling.

Operacional	Classificação		ELISA Positivo (%)
	Ridley e Jopling	Quantidade	
Paucibacilar	I	11	31
	TT	1	3
	S.I.	6	17
Multibacilar	BT	8	23
	BB	0	0
	BL	1	3
	LL	2	6
	S.I.	6	17
Total Geral		35	100
			19 (100%)

S.I. = Sem Informação sobre a classificação de Ridley e Jopling.

A comparação da densidade óptica do ELISA IgM anti-PGL-1 dos casos MB e PB, demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos ($p < 0,05$), de acordo com o apresentado no **Gráfico 1**.

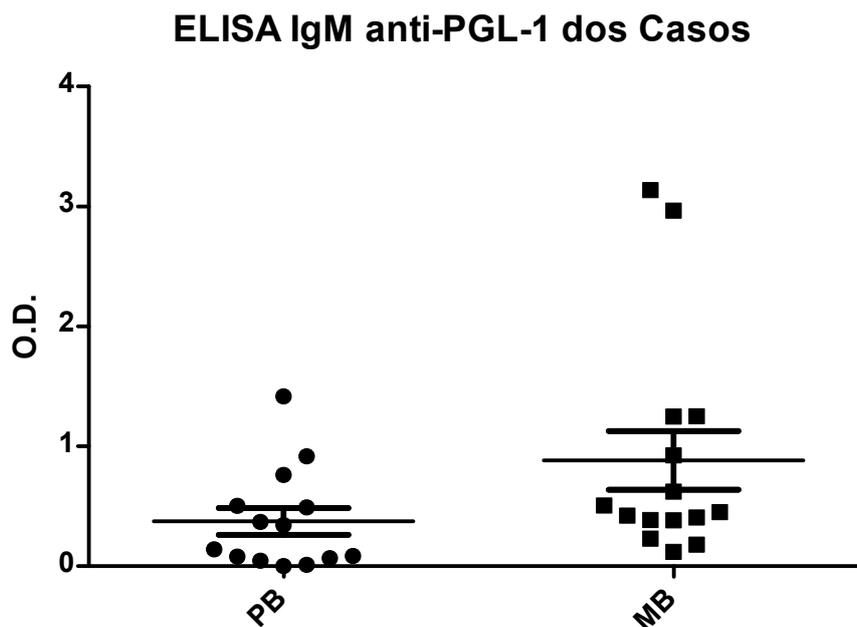


Gráfico 1: Comparação da densidade óptica (O.D.) do ELISA IgM anti-PGL-1 entre os casos de hanseníase PB e MB.

A correlação entre o ano de diagnóstico e a densidade óptica dos casos de hanseníase não evidenciou diferença estatística ($p > 0,05$), como esperado, quando comparado ano a ano, de acordo com o apresentado no **Gráfico 2**.

Correlação entre ano de diagnóstico e D.O.

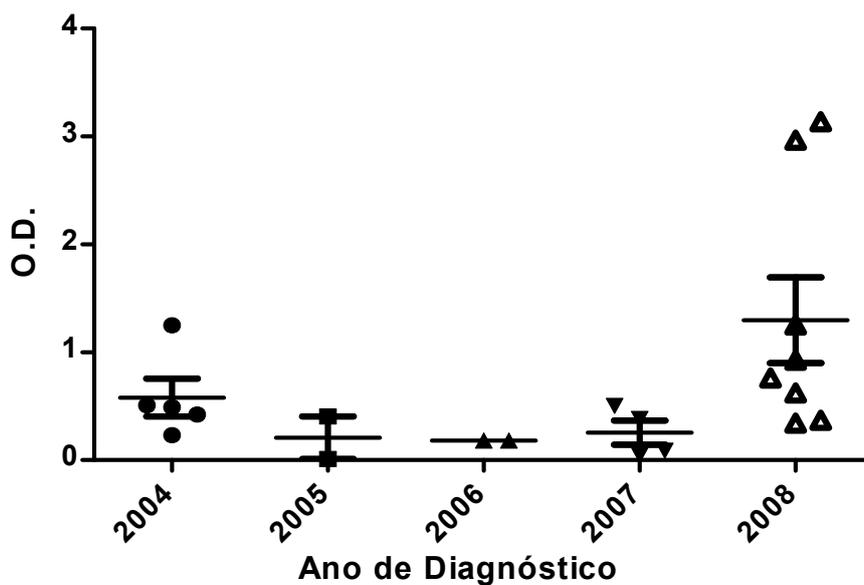


Gráfico 2: Correlação entre o ano do diagnóstico de hanseníase e a densidade óptica (D.O.) dos resultados de ELISA IgM anti-PGL-1.

O **Gráfico 3** mostra a correlação entre a densidade óptica do teste ELISA IgM anti-PGL-1 e o número de cicatrizes da vacina BCG dos casos de hanseníase. As análises estatísticas revelaram que não houve relação de significância ($p > 0,05$) entre a densidade óptica do ELISA e a presença de cicatriz da vacina BCG, tanto no grupo de casos ELISA negativo como no grupo ELISA positivo.

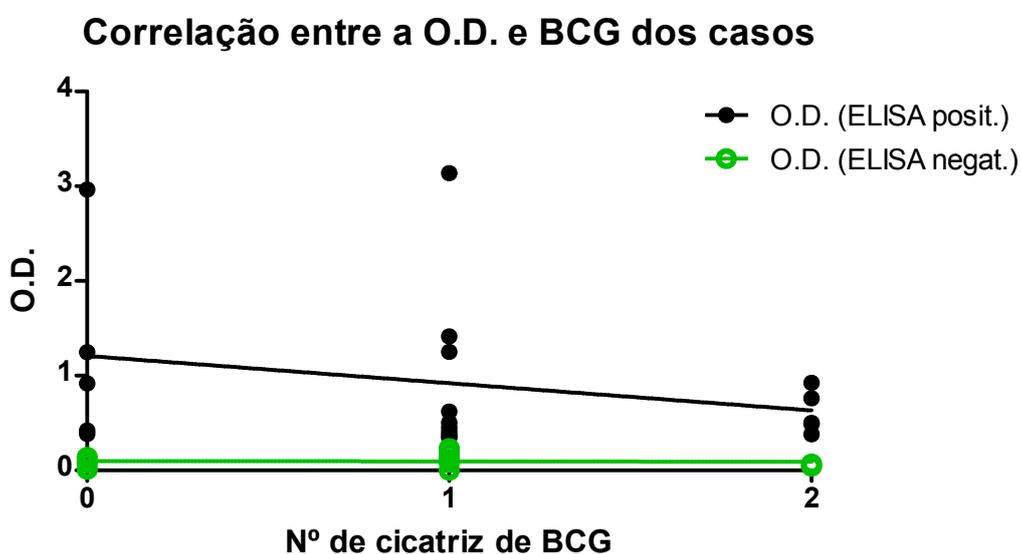


Gráfico 3: Correlação entre a densidade óptica do teste de ELISA anti-PGL-1 dos casos de hanseníase e o número de cicatrizes da vacina BCG. O.D. (ELISA posit.) = densidade óptica dos casos positivos para o ELISA; O.D. (ELISA negat.) = densidade óptica dos casos negativos para o ELISA.

A correlação entre a idade e a densidade óptica do resultado do ELISA dos casos de hanseníase está representada no **Gráfico 4**, não apresentou correlação estatística ($p > 0,05$) da densidade óptica com nenhuma faixa etária.

Correlação entre Idade e O.D. dos casos

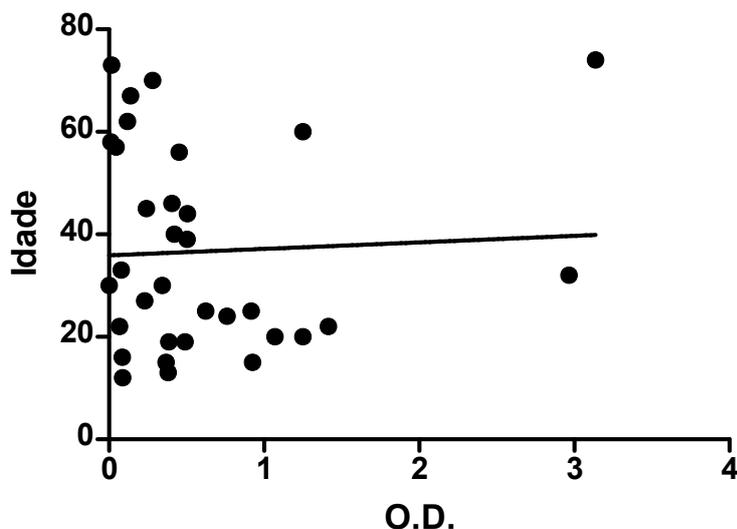


Gráfico 4: Correlação entre a idade e a densidade óptica (D.O.) dos resultados de ELISA IgM anti-PGL-1 dos casos de hanseníase.

A comparação entre a idade e o índice de escolaridade (IE) dos casos de hanseníase, representada no **Gráfico 5**, evidencia que houve correlação estatística ($p < 0,05$), ou seja, a análise de regressão mostra que quanto maior a idade menor é o grau de escolaridade, e em média os casos possuem entre 4 a 7 anos de estudo, representados entre as séries de escolaridade regular (4^a a 7^a série).

Correlação entre idade e IE dos casos

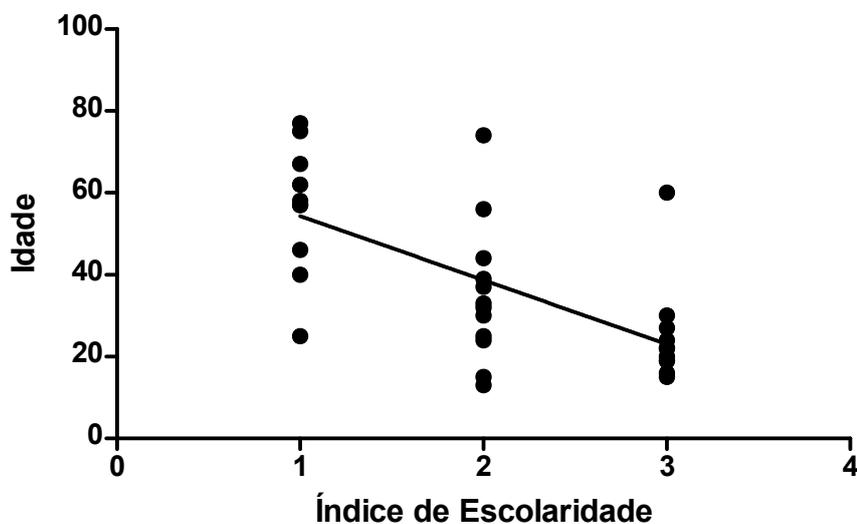


Gráfico 5: Correlação entre a idade e o índice de escolaridade (IE)

entre os casos de hanseníase. Os IEs são representados por 1 = ter cursa entre a 1ª e 3ª séries; 2 = cursado da 4ª a 7ª série; e 3 = cursado da 8ª série ao ensino médio.

A comparação da densidade óptica com a auto declaração do caso de hanseníase de ter sofrido privação alimentar ou não, levando em consideração os casos positivos para o teste ELISA IgM anti-PGL-1, demonstra que não houve correlação estatística entre os grupos relacionados ($p > 0,05$), de acordo com o apresentado no **Gráfico 6**.

Correlação entre a O.D. e privação alimentar

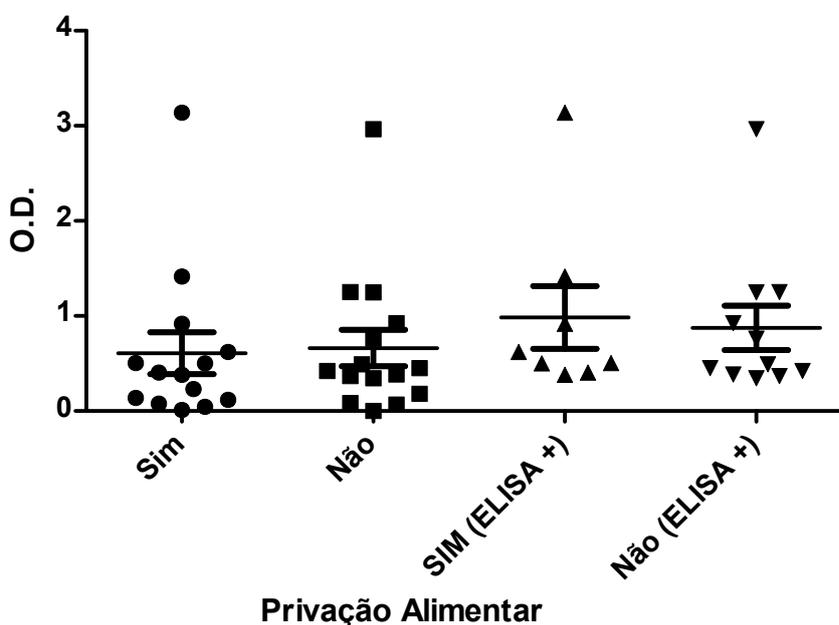


Gráfico 6: Correlação entre a densidade óptica (O.D.) e a auto declaração de ter sofrido privação alimentar ou não, entre os casos, e a positividade para o teste ELISA IgM anti-PGL-1.

Quando foi correlacionado o número de pessoas por domicílio com a densidade óptica do teste de ELISA IgM anti-PGL-1, entre os casos de hanseníase que declararam se há mais que duas pessoas por dormitório ou não, de acordo com o **Gráfico 7**, verificou-se que não houve correlação estatística significativa em nenhuma das duas situações ($p > 0,05$), ou seja, a densidade óptica do teste ELISA IgM anti-PGL-1 não está relacionada com o número de pessoas no domicílio ou se mais de duas pessoas fazem uso do mesmo dormitório em cada domicílio.

Quando há mais que dois por dormitório

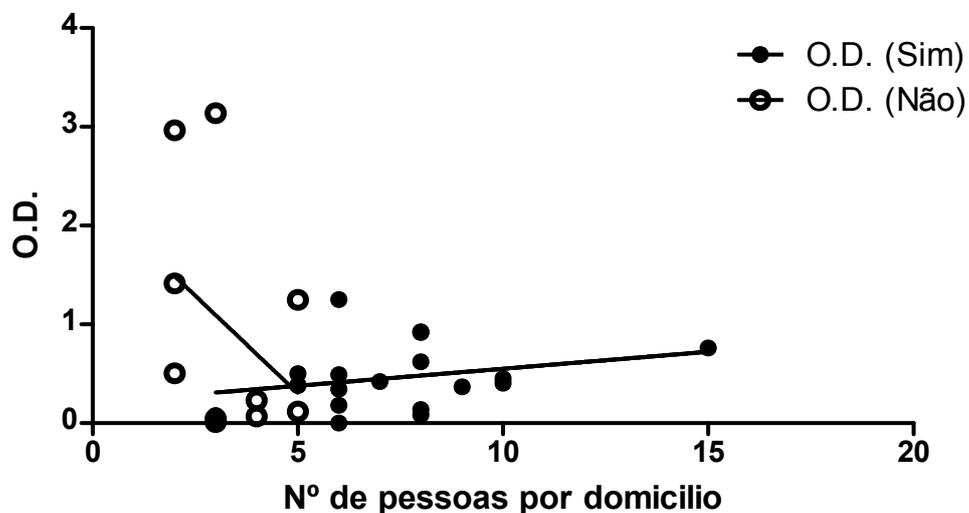


Gráfico 7: Correlação da densidade óptica (D.O.) e o número de pessoas no domicílio de casos de hanseníase, quando foi declarado se três ou mais pessoas fazem uso ou não do mesmo dormitório. O.D. (Sim) = densidade óptica do teste de ELISA anti-PGL-1 quando há mais que dois por dormitório; O.D. (Não) = densidade óptica do teste de ELISA anti-PGL-1 quando não há mais que dois por dormitório.

A **Tabela 8** apresenta os resultados do ELISA IgM anti-PGL-1 dos contatos testados, com 45% de positividade, dentre os quais 33 (58%) são do gênero feminino. Os resultados negativos para o teste ELISA anti-PGL-1 foram 55%, dos quais 71% são mulheres. No total foram 126 amostras de contatos de hanseníase testados para IgM anti-PGL-1 por ELISA.

Tabela 8: Positividade do teste de ELISA IgM anti-PGL-1 dos comunicantes de casos de hanseníase.

ELISA anti-PGL-1	Gênero	Quantidade	Porcentagem (%)
Positivo	Masculino	24	45
	Feminino	33	
Negativo	Masculino	20	55
	Feminino	49	
Total Geral		126	100

Em relação aos comunicantes de hanseníase, a comparação da idade com a densidade óptica dos resultados do teste de ELISA IgM anti-PGL-1, como mostra o **Gráfico 8**, verifica-se que houve correlação estatística significativa ($p < 0,05$), ou seja, quanto maior a idade menor é a densidade óptica do teste de ELISA.

Correlação entre a idade e a O.D. dos comunicantes

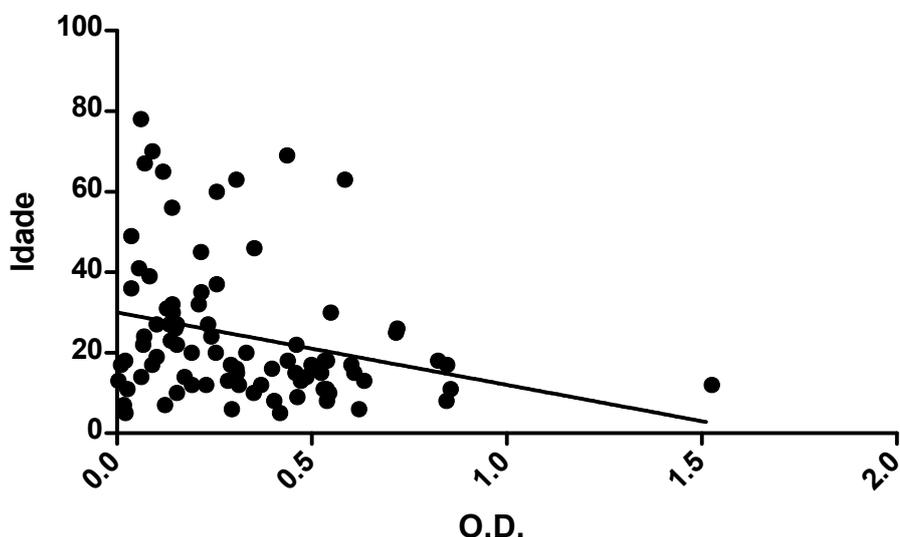


Gráfico 8: Correlação entre a idade e a densidade óptica (O.D.) dos resultados do teste de ELISA IgM anti-PGL-1 dos contatos de hanseníase.

O **Gráfico 9** mostra a relação da idade dos comunicantes e o período de convivência em anos com seus respectivos casos de hanseníase. Houve correlação estatística significativa ($p < 0,05$), pois quanto maior o tempo de convivência maior é a idade do contato com seu respectivo caso de hanseníase.

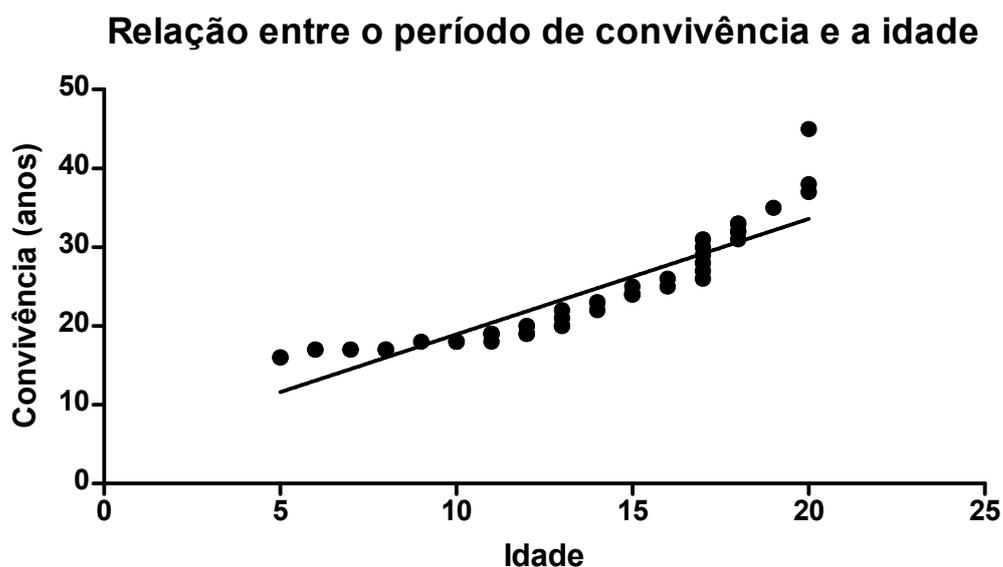


Figura 9: Relação entre a idade e o período de convivência dos contatos com os casos de hanseníase.

Quando relacionamos a densidade óptica do teste de ELISA anti-PGL-1 dos contatos e o período em anos de convivência com o caso de hanseníase (**Gráfico 10**), não encontramos significância estatística ($p > 0,05$), ou seja, não há relação entre a densidade óptica e o período de convivência, em anos.

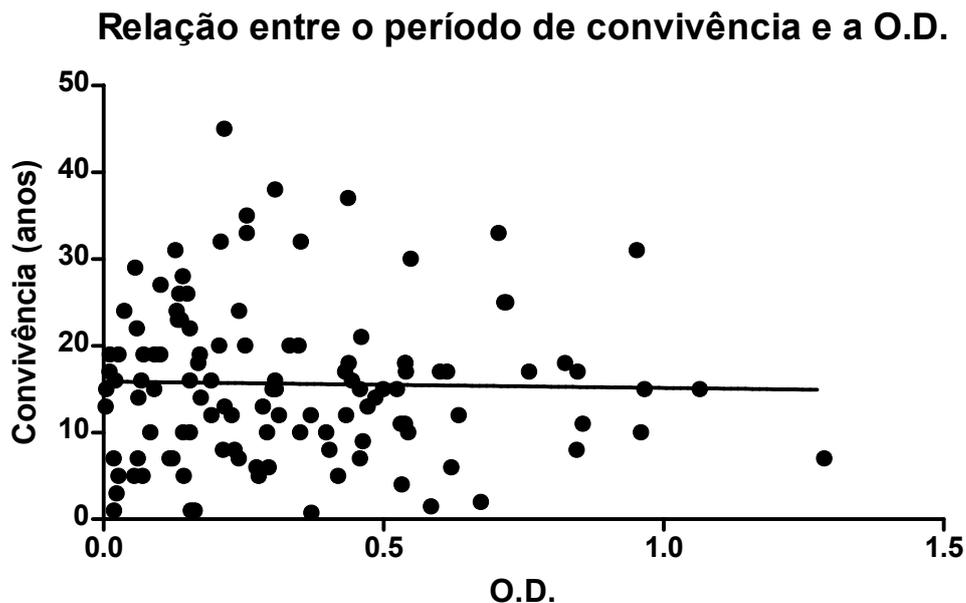


Gráfico 10: Relação entre o período de convivência em anos dos comunicantes com os casos de hanseníase e a densidade óptica (O.D.) do teste de ELISA IgM anti-PGL-1.

O **Gráfico 11** demonstra a relação entre a densidade óptica do teste de ELISA IgM anti-PGL-1 e o número de cicatrizes da vacina BCG dos comunicantes, distribuídos entre aqueles que foram positivos para o ELISA e os que foram negativos. A análise estatística revela que não houve significância ($p > 0,05$) entre o número de cicatriz de BCG e a positividade para o teste de ELISA anti-PGL-1, ou seja, não foi encontrada correlação estatística entre a presença e/ou número de cicatrizes de BCG e a positividade para o ELISA anti-PGL-1.

Correlação entre a O.D. e BCG dos comunicantes

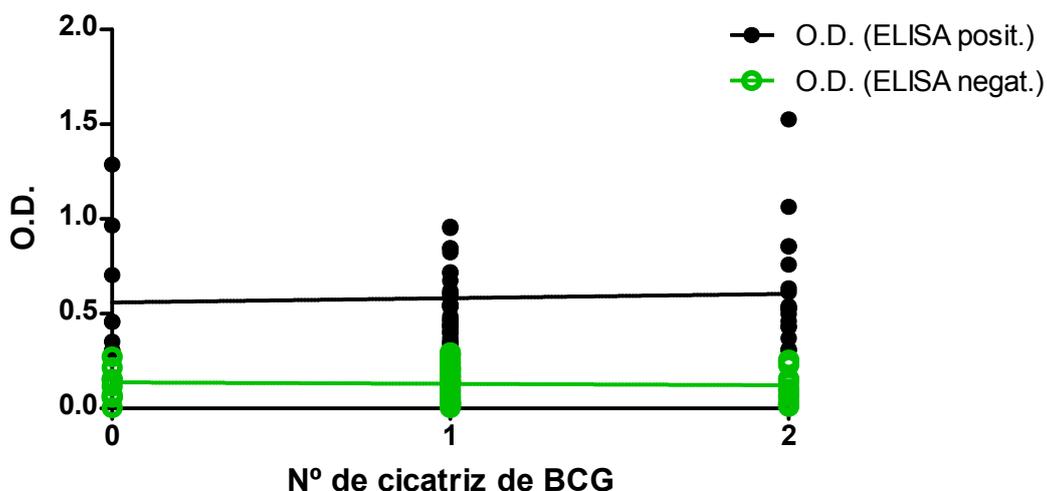


Gráfico 11: Correlação entre a densidade óptica do teste de ELISA anti-PGL-1 dos comunicantes de hanseníase e o número de cicatriz da vacina BCG. O.D. (ELISA posit.) = densidade óptica dos contatos positivos para o ELISA; O.D. (ELISA negat.) = densidade óptica dos contatos negativos para o ELISA.

Quando comparamos os níveis da densidade óptica do teste ELISA anti-PGL-1 dos comunicantes distribuídos de acordo com a classificação operacional em PB e MB dos casos de hanseníase correspondentes (**Gráfico 12**), observa-se que não houve correlação estatística significativa entre contatos de casos PB e MB ($p > 0,05$), mesmo entre os comunicantes que foram ELISA positivos. No entanto, como esperado, houve diferença entre os níveis da densidade óptica dos comunicantes positivos e negativos para o teste ELISA anti-PGL-1 ($p < 0,05$).

Densidade óptica dos comunicantes de casos PB e MB

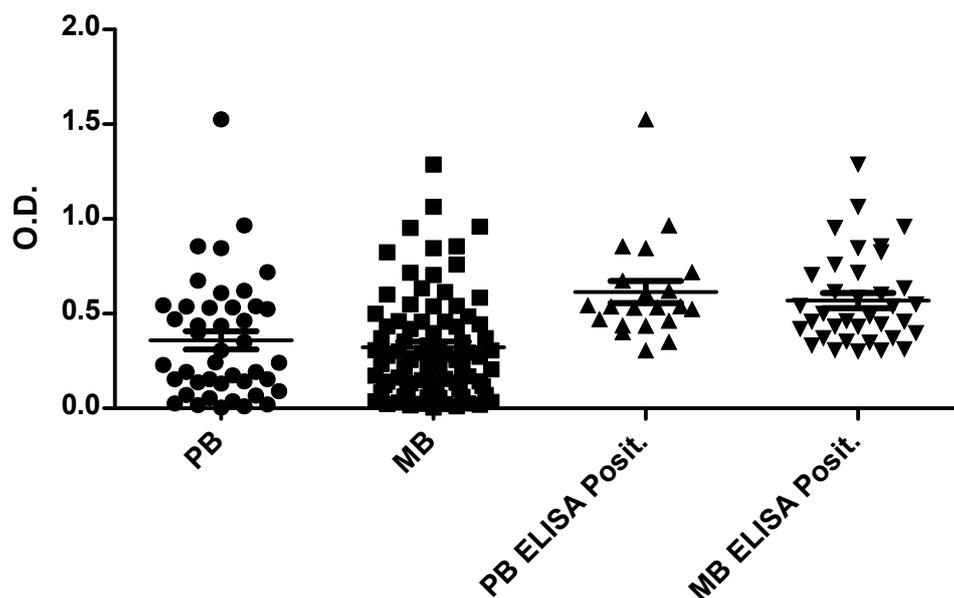


Gráfico 12: Densidade óptica do teste ELISA IgM anti-PGL-1 dos contatos de casos de hanseníase, divididos entre os contatos de casos PB e MB e entre os contatos de casos PB e MB ELISA positivos.

5.2.1. CORRELAÇÃO CASO vs. COMUNICANTES

A frequência relativa de comunicantes por caso de hanseníase foi de 3,6. A correlação dos resultados do teste ELISA anti-PGL-1 indica que 56% dos comunicantes são positivos para o teste de ELISA quando o caso-índice correspondente é também positivo para o ELISA anti-PGL-1 (**Gráfico 13**). No entanto, quando a correlação é feita em casos-índice que são negativos para o teste de ELISA anti-PGL-1 somente 22% dos comunicantes correspondentes são positivos para o ELISA anti-PGL-1. Quando calculado o risco relativo, encontramos 2,4 vezes mais chances de o resultado de ELISA apresentar positividade quando o caso de hanseníase do comunicante foi também positivo ($p < 0,05$).

Correlação do ELISA para os casos e comunicantes

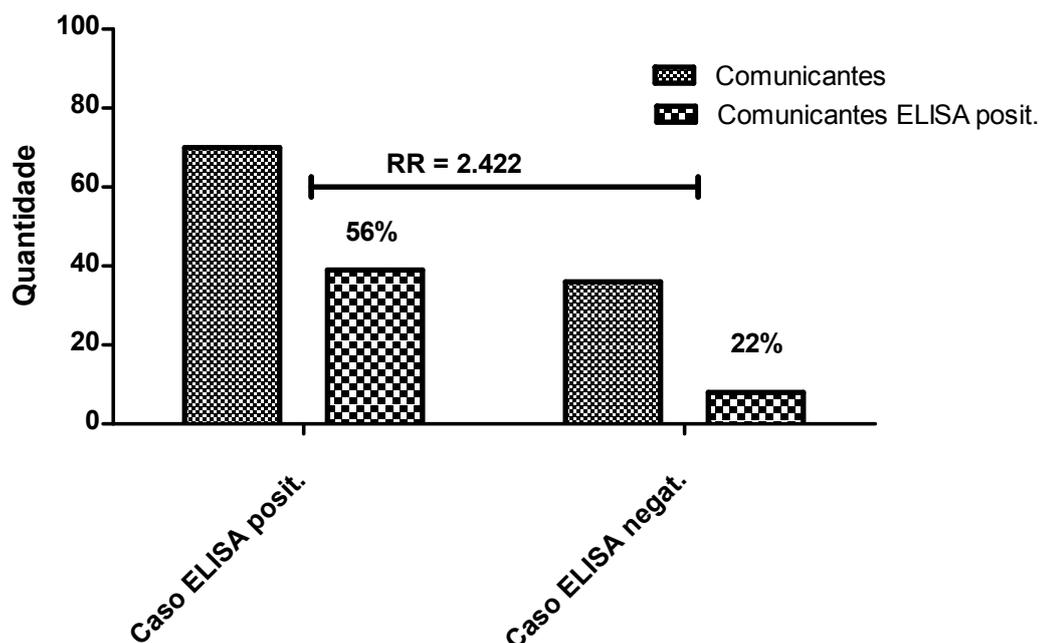


Gráfico 13: Correlação dos resultados de ELISA anti-PGL-1 entre comunicantes de casos-índices positivos e negativos para o ELISA anti-PGL-1. Risco relativo (RR) = 2,422 e $p < 0,05$.

O **Gráfico 14** mostra a correlação entre o teste de ELISA anti-PGL-1 dos comunicantes de casos-índices MB e PB. Quando o caso é MB 45% dos comunicantes são positivos para o teste de ELISA anti-PGL-1, de modo semelhante, quando o caso é PB 45,8% dos comunicantes são positivos para o ELISA anti-PGL-1. O risco relativo dessa correlação nos mostra que não houve diferença estatística significativa entre os comunicantes de casos PB e MB (RR = 0.98 e $p > 0,05$).

Correlação do ELISA entre casos PB e MB e comunicantes

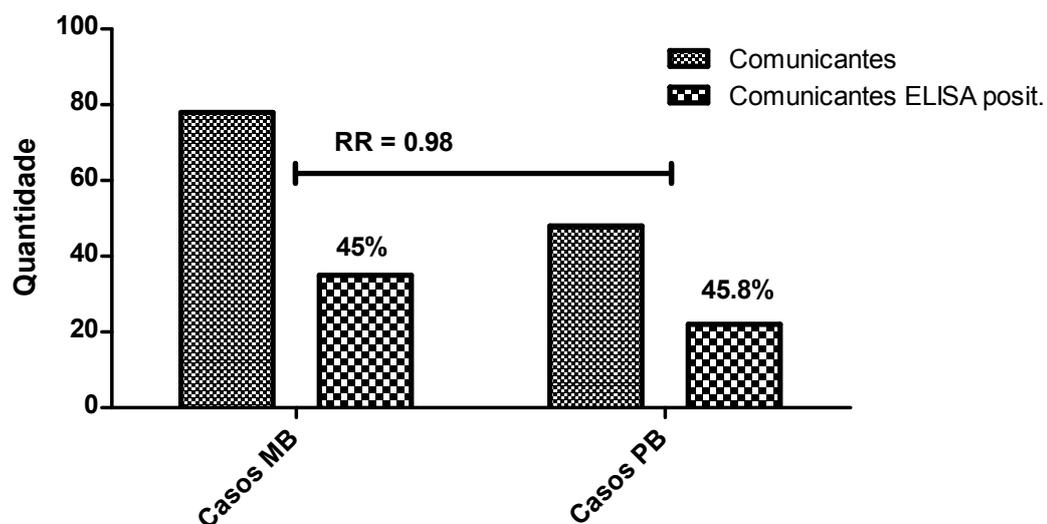


Gráfico 14: Correlação dos testes de ELISA anti-PGL-1 dos comunicantes de casos-índices multibacilares (MB) e Paucibacilares (PB).

5.2.2. ESCOLARES

As características sócio-epidemiológicas dos escolares de Oriximiná (**Tabela 9**) evidenciam que 80% deles são do gênero feminino, 83% são naturais de Oriximiná, há representação em todas as séries do ensino fundamental e médio, 43% possuem duas cicatrizes da vacina BCG e 40% apenas uma. Não temos a informação quanto a BCG de vinte escolares, como demonstrado na tabela 9.

Tabela 9: Características sócio-epidemiológicas dos escolares de Oriximiná- PA.

Variável	Descrição	Número	Porcentagem (%)
Gênero	Masculino	58	42
	Feminino	80	58
Naturalidade	Oriximiná	115	83
	Outra cidade (PA)	7	5
	Outro estado	11	8
	S.I.	5	4
Escolaridade	1ª série	5	4
	2ª série	16	11
	3ª série	19	14
	4ª série	15	11
	5ª série	23	16,6
	6ª série	12	8,7
	7ª série	10	7
	8ª série	7	5
	1º ano Ensino Médio	20	14,5
	2º ano Ensino Médio	6	4,5
	3º ano Ensino Médio	4	3
	S.I.	1	0,7
	Nº de BCG	0	3
1		55	40
2		60	43,5
S.I.		20	14,5

S.I. = Sem Informação

O **Gráfico 15** representa a correlação entre o nível de escolaridade em anos de estudo regular e a idade dos escolares, a análise de regressão simples mostra que há crescimento correspondente da idade e o nível de escolaridade dos escolares ($p < 0,05$).

Correlação entre escolaridade e idade dos escolares

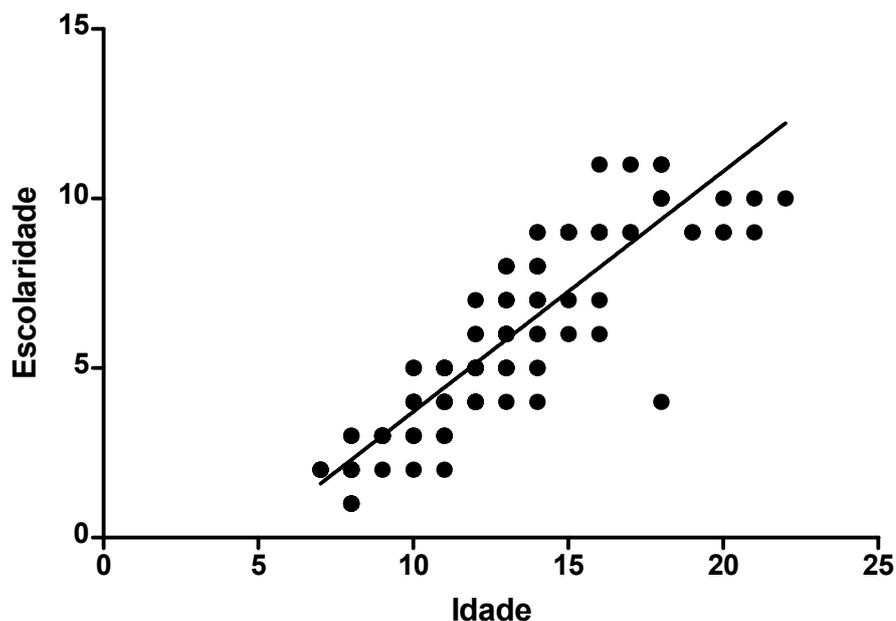


Gráfico 15: Correlação entre o nível de escolaridade e a idade (em anos) dos escolares. Cada série de estudo regular representa uma unidade do eixo da escolaridade, iniciando com a 1ª série representada pela unidade 1.

A distribuição de positividade do teste ELISA IgM anti-PGL-1 identifica que 58 (42%) dos escolares são ELISA positivos, dentre os quais 34 são do gênero feminino e dos 80 escolares que são negativos 46 também são do gênero feminino, de acordo com a **Tabela 10**.

Tabela 10: Positividade do teste de ELISA IgM anti-PGL-1 dos escolares de Oriximiná - PA.

ELISA anti-PGL-1	Gênero	Quantidade	Porcentagem (%)
Positivo	Masculino	24	42
	Feminino	34	
Negativo	Masculino	34	58
	Feminino	46	
Total Geral		138	100

O **Gráfico 16** indica que não houve correlação de regressão simples entre a densidade óptica do teste ELISA anti-PGL-1 e a idade dos escolares de Oriximiná ($p > 0,05$), demonstrando que a positividade do ELISA anti-PGL-1 pode ser detectada em qualquer idade entre os escolares de 7 a 22 anos.

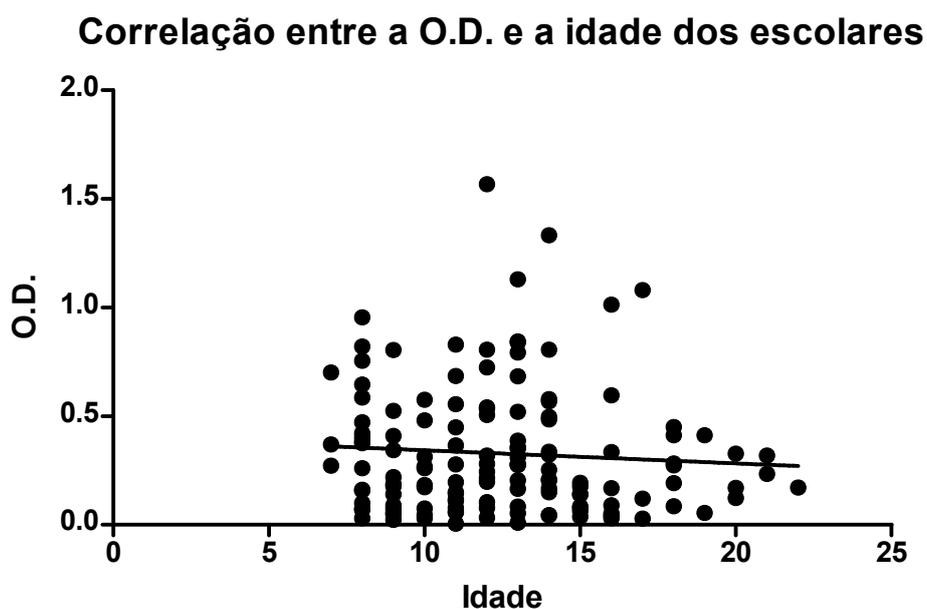


Gráfico 16: Correlação entre a densidade óptica (O.D.) e a idade dos escolares de Oriximiná.

A análise de regressão simples para comparação entre o número de cicatriz da vacina BCG e a densidade óptica do ELISA anti-PGL-1 dos escolares, de acordo com o **Gráfico 17**, mostra que não há relação estatística significativa ($p > 0,05$), ou seja, a positividade para o teste ELISA independe do número de cicatrizes de BCG.

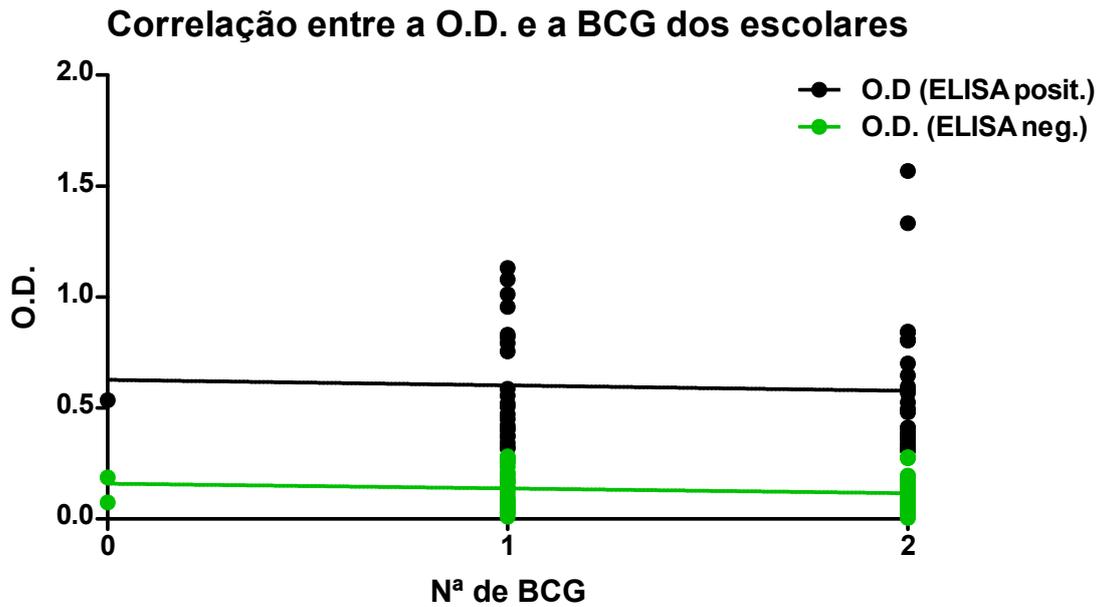


Gráfico 17: Correlação entre a densidade óptica do ELISA IgM anti-PGL-1 e o número de cicatriz da vacina BCG entre os escolares de Oriximiná, subdivididos entre os que foram ELISA positivos e negativos.

A análise estatística sobre a densidade óptica comparada dos resultados positivos para o ELISA anti-PGL-1, de acordo com o **Gráfico 18**, demonstra que há diferença estatística somente dos casos em relação aos comunicantes e escolares ($p < 0,05$).

Densidade óptica dos testes ELISA positivos

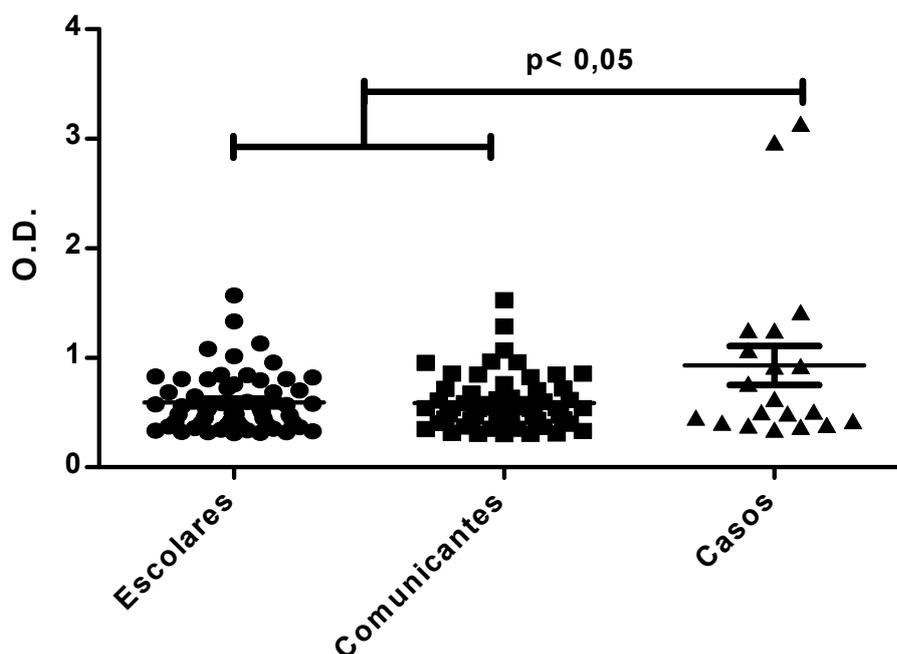


Gráfico 18: Densidade óptica comparada entre os escolares, comunicantes e casos de hanseníase positivos para o ELISA anti-PGL-1.

5.3. CARACTERÍSTICAS SÓCIO-EPIDEMIOLÓGICAS DOS CASOS NOVOS

Os casos novos de Oriximiná estão identificados sob os questionários 15, 39 e 41. Possuem idades entre 22 e 45 anos, dois são do gênero feminino e um do gênero masculino, dois estudaram até a 7ª série e um até a 3ª série do ensino fundamental, todos os três recebem benefício do Estado, um declarou já ter sofrido privação alimentar, o tempo em que residem no domicílio visitado está entre 4 a 10 anos, seus domicílios possuem individualmente entre 4 e 5 cômodos, com 6 a 12 pessoas morando, e em todas os três casos há mais de duas pessoas fazendo uso do mesmo dormitório.

Os três casos novos foram contatos de casos de hanseníase por período entre 5 e 22 anos. Somente um foi examinado pelo fisioterapeuta da equipe com GI igual a zero, dois não tinham cicatriz da vacina BCG e o outro somente uma cicatriz, dois possuíam duas lesões e o terceiro acima de seis, os três foram classificados com na forma BT, portanto MB. Somente um (20 anos de idade; com 12 pessoas na casa; duas lesões; irmão do caso-índice) foi positivo

(OD = 1.069) para o teste de ELISA IgM anti-PGL-1. Três pessoas entraram no estudo como comunicantes deste caso novo, sendo dois positivos (OD de 0.458 e 0.846) e um negativos (OD de 0.062) para o teste de ELISA IgM anti-PGL-1.

Os três casos novos foram negativos para a detecção molecular do *M. leprae*, a partir da mucosa nasal, através da reação em cadeia da polimerase (PCR).

5.4. DETECÇÃO MOLECULAR

A **Tabela 11** mostra a distribuição do número de amostras de *swab* da mucosa nasal colhidas e a positividade para a detecção molecular pela reação em cadeia da polimerase (PCR), entre os casos-índices e comunicantes de hanseníase e os escolares de Oriximiná, além de sua divisão por gênero. Oito (28%) casos e 15 (12%) comunicantes foram PCR positivos, nenhum caso novo e apenas 2 (1,6%) escolares apresentaram positividade para a PCR.

Tabela 11: Distribuição dos grupos estudados por gênero e positividade para a detecção molecular do *M. leprae*, pela reação em cadeia da polimerase (PCR), a partir de *swab* da mucosa nasal.

Grupos	Gênero	Swab nasal (N)	PCR positivo (%)
Casos - índices	Masculino	19	6 (21%)
	Feminino	10	2 (7%)
Comunicantes	Masculino	44	4 (3%)
	Feminino	81	11 (9%)
Casos Novos	Masculino	1	0 (0%)
	Feminino	2	0 (0%)
Escolares	Masculino	56	2 (1,6%)
	Feminino	70	0 (0%)

A distribuição dos casos de hanseníase positivos para a reação em cadeia da polimerase (PCR) de acordo com a classificação operacional do Ministério da Saúde do Brasil e de Ridley e Jopling está evidenciada na **Tabela 12**. Entre os casos PCR positivos 3 são PB e 5 são MB, sendo a forma BT a de maior predominância para a positividade da PCR.

Tabela 12: Distribuição dos casos PCR positivos de acordo com a classificação operacional no Ministério da Saúde e a de Ridley e Jopling.

Operacional	Classificação		PCR positivo (%)	
	Ridley e Jopling	Quantidade		Porcentagem (%)
Paucibacilar (PB)	I	11	31	2 (25%)
	TT	1	3	0 (0%)
	S.I.	6	17	1 (12,5%)
Multibacilar (MB)	BT	8	23	3 (37,5%)
	BB	0	0	0 (0%)
	BL	1	3	0 (0%)
	LL	2	6	1 (12,5%)
	S.I.	6	17	1 (12,5%)
Total Geral		35	100	8 (100%)

S.I. = Sem Informação sobre a classificação de Ridley e Jopling.

O **Gráfico 19** demonstra a relação entre a positividade para o ELISA IgM anti-PGL-1 e a detecção molecular do *M. leprae* pela PCR, entre os casos e comunicantes de hanseníase e os escolares. A análise estatística revela que não houve relação entre o nível da densidade óptica do ELISA IgM anti-PGL-1 e a positividade para a PCR ($p > 0,05$) entre os casos e comunicantes de hanseníase.

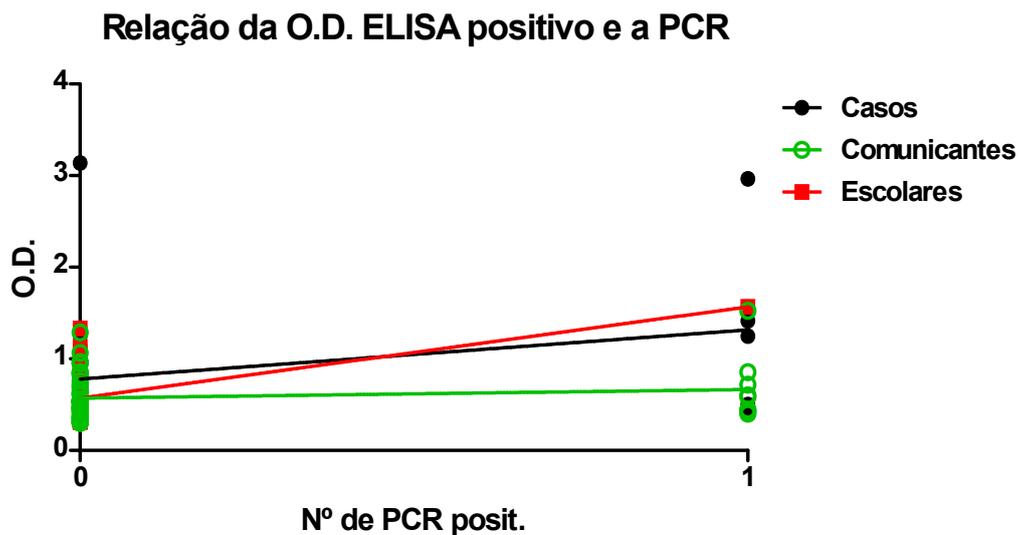


Gráfico 19: Relação entre a densidade óptica (O.D.) das amostras ELISA anti-PGL-1 positivas e o número de positivos para a PCR (detecção molecular pela reação em cadeia da polimerase) dos casos-índices e comunicantes de hanseníase e escolares de Oriximiná.

A correlação de PCR positivos entre comunicantes de casos de hanseníase que apresentaram positividade para o PCR está evidenciada no **Gráfico 20**. Não encontramos diferença estatística entre os dois grupos, casos positivos e casos negativos ($p > 0,05$). Portanto, a positividade para a PCR entre comunicantes independe de o caso está ou não positivo para esse mesmo exame.

Correlação entre casos e comunicantes PCR positivos

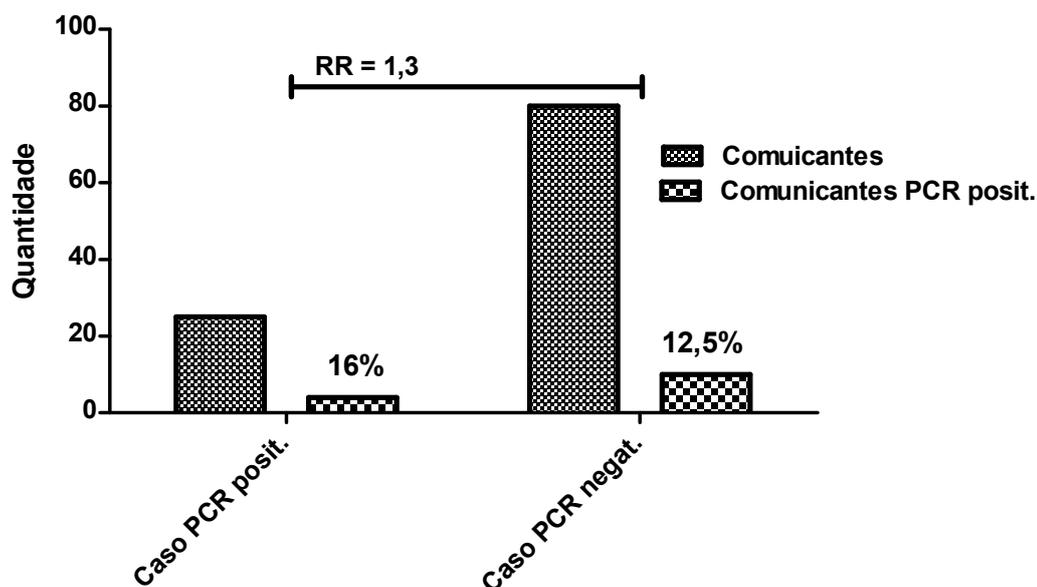


Gráfico 20: Correlação de positividade para a reação em cadeia da polimerase (PCR) em comunicantes de casos que foram positivos e negativos para a PCR.

A correlação de positividade para a PCR entre comunicantes de casos PB e MB, como mostrado no **Gráfico 21**, não apresenta diferença estatística entre os dois grupos ($p > 0,05$), portanto a probabilidade de ser PCR positivo para os comunicantes não depende do caso - índice ser PB ou MB.

Correlação de comunicantes PCR positivos

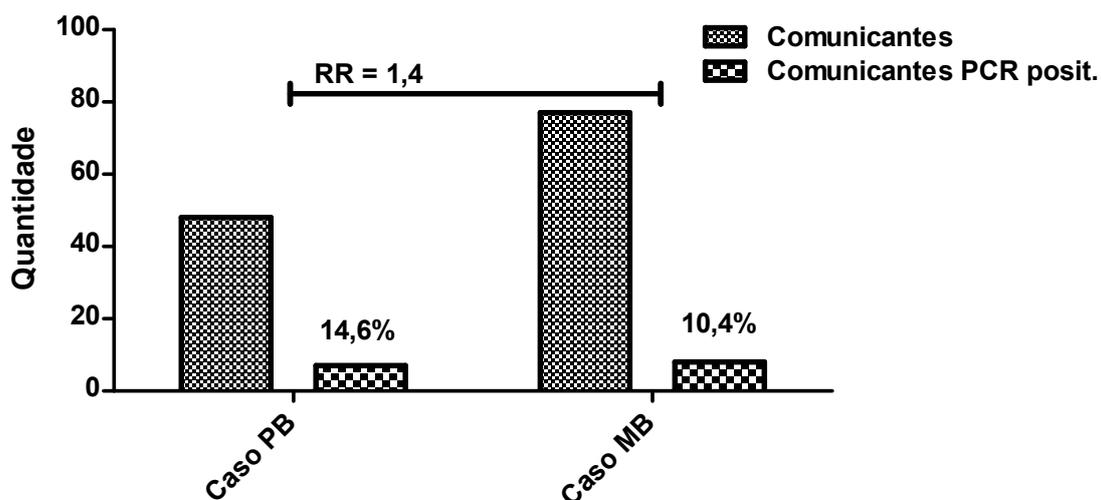


Gráfico 21: Correlação de positividade para a reação em cadeia da polimerase (PCR) na detecção molecular do *M. leprae* em comunicantes de casos PB e MB.

O **Gráfico 22** demonstra que entre os casos de hanseníase notificados no município de Oriximiná nos anos de 2004 a 2008, a positividade para a detecção molecular do *M. leprae* pela PCR independe do ano de diagnóstico.

Distribuição dos casos PCR+ por ano de diagnóstico

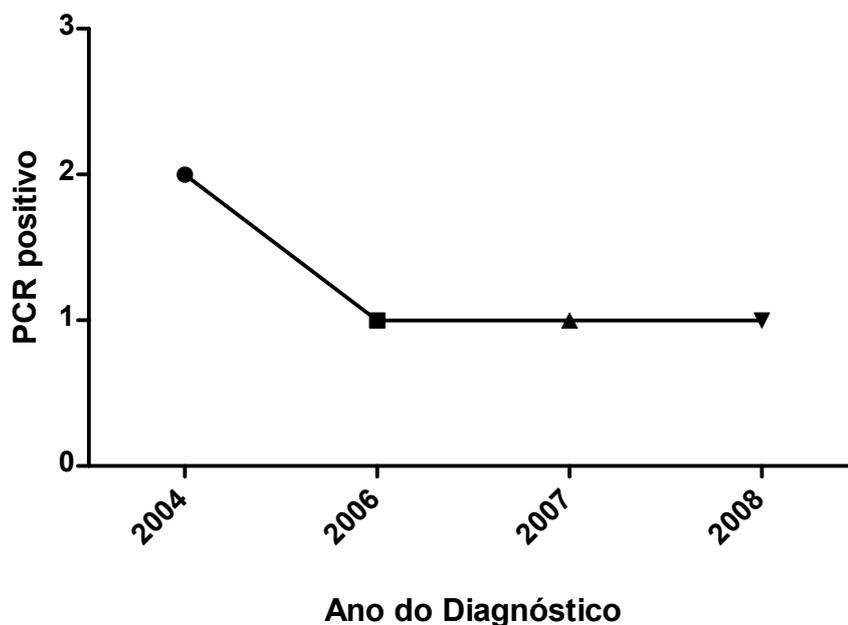


Gráfico 22: Distribuição dos casos de hanseníase positivos para a PCR de acordo com o ano do diagnóstico.

O **Gráfico 23** revela a correlação de positividade entre a PCR para detecção molecular do *M. leprae* e o ELISA anti-PGL-1 para os casos novos, casos-índices e comunicantes de hanseníase e escolares. Os casos-índices apresentaram 62,5% das amostras PCR positivos também positivos para o ELISA anti-PGL-1, 60% dos comunicantes PCR positivos eram positivos também para o ELISA anti-PGL-1 e entre os dois escolares PCR positivos apenas 1 (50%) é positivo para o ELISA anti-PGL-1.

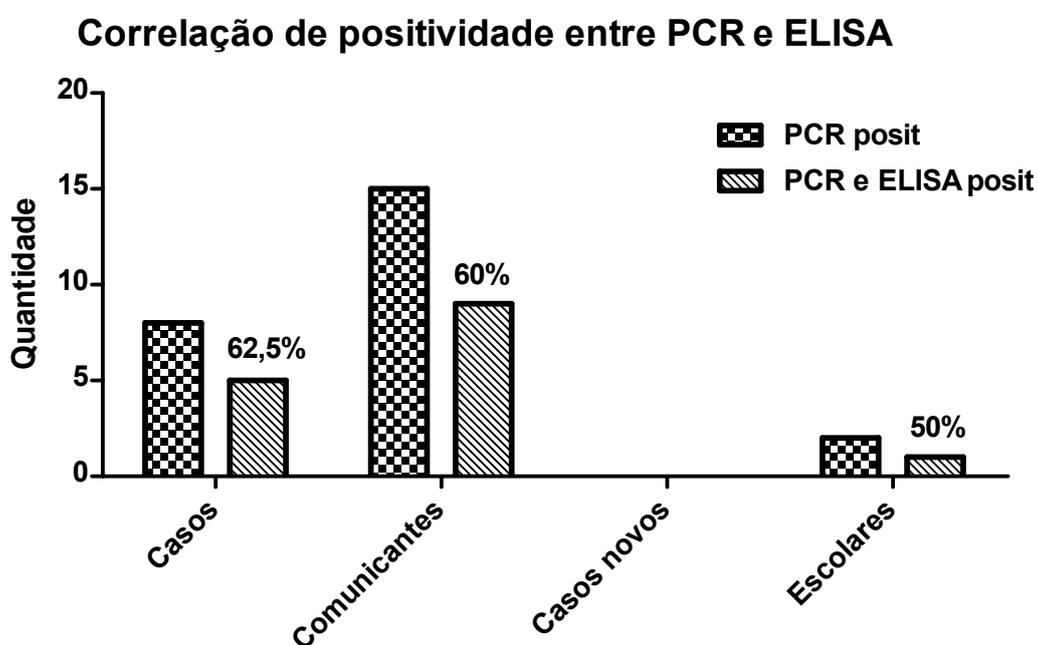


Gráfico 23: Correlação de positividade entre PCR e ELISA anti-PGL-1, distribuídos entre os casos novos, casos-índices e comunicantes de hanseníase e os escolares.

5.5. MENORES DE 15 ANOS

O **Gráfico 24** mostra a situação de menores de 15 anos, quando caso ou comunicante, em relação aos resultados de ELISA anti-PGL-1 e PCR para a detecção molecular de DNA de *M. leprae* na mucosa nasal. Os casos e comunicantes menores de 15 anos representam 11,4% e 24,6% do total de casos e comunicantes que participaram do estudo, respectivamente. A

porcentagem de casos menores de 15 anos positivos para o ELISA foi de 75% e para o PCR zero por cento. Em relação aos comunicantes menores de 15 anos, 68% foram positivos para o ELISA e 9,7% positivos para a PCR. Quando comparamos esses positivos com o total do estudo encontramos 8,6% de casos menores de 15 anos positivos para o ELISA e zero para o PCR. Entre os comunicantes menores de 15 anos, 16,6% foram positivos para o ELISA e 2,4% PCR positivos.

Positividade do ELISA e PCR em menores de 15 anos

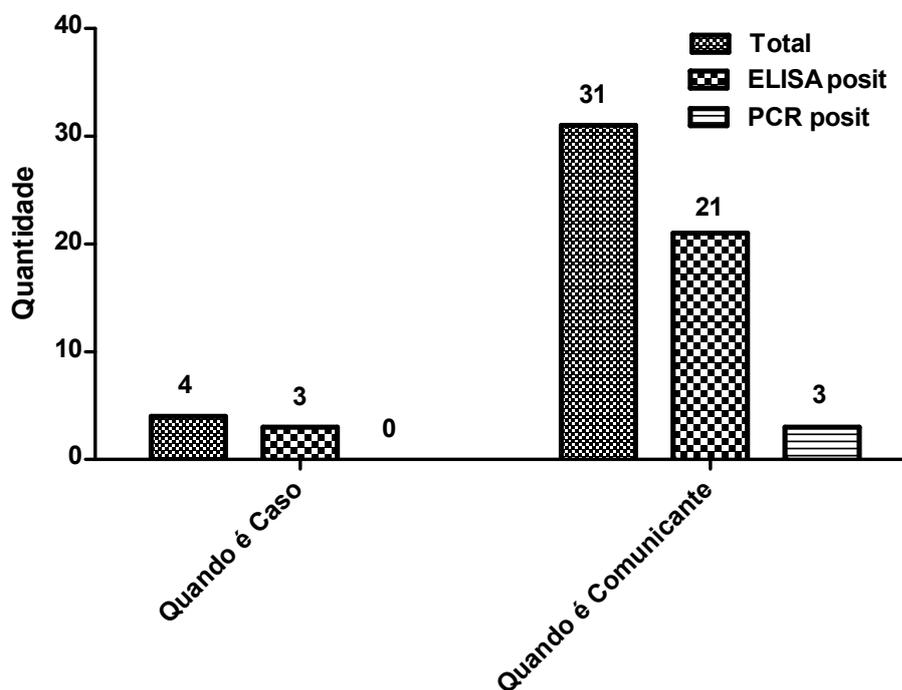


Gráfico 24: Resultados de ELISA e PCR de casos e comunicantes menores de 15 anos.

6. DISCUSSÃO

A definição de portadores saudáveis e infecção subclínica em hanseníase têm sido motivos de vários estudos, principalmente, com a utilização e validação de métodos moleculares e imunológicos. Nesse contexto, desenvolvemos e validamos um novo método para detecção molecular de DNA do *M. leprae*, a partir do gene ML 0579 com especificidade para esse patógeno e correlacionamos com o teste sorológico ELISA para detecção de anticorpos IgM anti-PGL-1, considerando os aspectos sócio-epidemiológicos de cada grupo de indivíduos.

O presente estudo é o primeiro do estado do Pará sobre epidemiologia molecular e sorológica da hanseníase, que investiga a detecção molecular de DNA do *M. leprae* em swab da mucosa nasal e sorológica de anticorpos IgM anti-PGL-1 em casos e comunicantes de hanseníase e escolares da rede pública, correlacionando com a classificação clínica, operacional, cicatriz da vacina BCG, privação alimentar, tipo de residência, gênero, idade, escolaridade e período de exposição estimado do contato ao caso índice de hanseníase.

A avaliação clínica de 35 casos de hanseníase diagnosticados em Oriximiná, entre os anos de 2004 e 2008, e seus respectivos comunicantes, permitiu o diagnóstico de três casos novos entre os 126 comunicantes avaliados em suas próprias residências, significando que a hanseníase é um sério problema de saúde pública que merece uma estratégia de combate mais aprimorada nas diversas regiões do Brasil (WHO, 2010).

Encontramos um número maior de homens acometidos pela hanseníase que mulheres, uma proporção de 1,9:1, o que está de acordo com o demonstrado em outros trabalhos, onde a diferença chegou a 2:1 (JACOBSON E KRAHENBUHL, 1999; HARROP, 2002). Por outro lado, o número de mulheres entre os comunicantes e escolares superou o de homens 1,86 e 1,4 vezes, respectivamente. Se considerarmos os casos que são ELISA positivos, a proporção é de 1,4:1 (homens:mulheres); para os comunicantes e escolares ELISA positivos a proporção é inversa, ou seja, 1:1,4 (homens:mulheres), certamente refletindo o número total de mulheres em relação aos homens.

A hanseníase é considerada uma doença influenciada por fatores alimentares e sócio-econômicos (van BERRS *et al.*, 1996), e os casos índices de hanseníase descritos aqui contemplam esse perfil de pessoas que estão em maiores condições de risco, morando em casas pequenas, em conglomerados, com baixo índice de escolaridade, vivendo na faixa da pobreza ou extrema pobreza, que por falta de informação e/ou por sua precária condição sócio-econômica demoram a procurar atendimento médico, estando mais susceptíveis às incapacidades físicas (BRAQUEL, 2007). Pelos mesmos motivos os comunicantes desses casos estão vulneráveis a desenvolver a doença, pois 86,5% pertencem ao núcleo familiar, 85,7% convivem a mais de cinco anos com o caso índice e 57 (45%) são positivos para o teste ELISA IgM anti-PGL-1.

Vários estudos demonstraram a presença de anticorpos anti-PGL-1 em diversas formas clínicas da hanseníase, em comunicantes e pessoas saudáveis residentes em áreas endêmicas (BRETT *et al.*, 1986; CARDONA-CASTRO *et al.*, 2005; SPENCER *et al.*, 2011). Em Oriximiná, vinte (65,5%) dos casos índices estudados foram positivos para o teste ELISA anti-PGL-1. SILVA e colaboradores (2009), quando subdividiram os casos em PB e MB, encontraram uma taxa menor de positividade entre os PB. Nesse estudo encontramos 23% de positividade entre os casos PB e 31% de positividade entre os casos MB, portanto, sem diferença estatística para a positividade entre as duas formas operacionais de classificar a doença. Talvez esta discrepância possa ser explicada pelo fato de termos avaliado pacientes de uma coorte previamente detectada e tratada para hanseníase (2004 a 2008), e esse número poderia indicar apenas a manutenção de contato dos casos tratados com casos ainda não detectados, mantendo assim a positividade para o anti-PGL-1.

Quando comparamos a densidade óptica do teste de ELISA entre PB e MB encontramos uma média de 0,602 para os casos PB e 1,170 para os casos MB, corroborando com outros autores que demonstram níveis mais elevados de IgM anti-PGL-1 em pacientes multibacilares (CHO *et al.*, 1989; SILVA *et al.*, 2009; SPENCER *et al.*, 2011). No entanto, quando comparamos a densidade óptica com o ano de diagnóstico em um intervalo de 4 anos (2004 a 2008) não

observamos diferença estatística entre as médias das densidades ópticas, apesar de os casos diagnosticados em 2008 apresentarem maior média do nível de densidade óptica do teste ELISA. Outro estudo demonstrou que na instituição do tratamento os níveis de IgM anti-PGL-1 diminuem com o passar dos meses, até negativarem próximo de um ano do início da PQT (CHO *et al.*, 2001).

A eficácia da vacina BCG na proteção parcial contra a hanseníase tem sido muito discutida, pois vários trabalhos apresentam resultados controversos (ZODPEY, 2007). GOULART e colaboradores (2008), acompanhando comunicantes de hanseníase por um período de 5 anos, encontraram maior risco de desenvolver a doença naqueles que não possuíam cicatriz de BCG em associação com o teste de Mitsuda negativo e IgM anti-PGL-1 positivos. ZODPEY (2007) em seu estudo de Meta-Análise, a partir de 29 artigos de revistas indexadas sobre o efeito da BCG na prevenção da hanseníase, concluiu que não há evidências convincentes do efeito protetor da vacina BCG contra hanseníase. Na população de Oriximiná, quando comparamos os níveis da densidade óptica do teste ELISA anti-PGL-1 e o número de cicatrizes da vacina BCG, independente do grupo estudado (casos índices, comunicantes ou escolares) não encontramos relação alguma com a presença ou ausência da cicatriz da vacina BCG, pois a positividade para IgM anti-PGL-1 independe do número de doses da vacina BCG.

A positividade para o teste ELISA IgM anti-PGL-1 não apresentou correlação com o número de pessoas em cada domicílio, com a utilização de mais que duas pessoas do mesmo dormitório ou com a idade; para os comunicantes, não se relaciona com o período de convivência acima de um ano com os casos índices ou a idade; e para os escolares, não é proporcional a idade. Esses dados corroboram com estudos que relatam alta infectividade e baixa patogenicidade para o *M. leprae* na população residente em áreas endêmicas (MARTINELLI *et al.*, 2002).

Uma alimentação balanceada é parte fundamental no desenvolvimento físico e manutenção de resistência imunológica contra os diversos patógenos, aos quais somos expostos (CALDER and KEW, 2002; SATYARAJ, 2011).

Nesse aspecto, quando analisamos a privação alimentar sofrida pelos casos índices 17 (48,5%) relataram ter faltado alimento em sua casa e 83% dessas famílias subsistem com dois ou menos salários mínimos, somando que são compostas, em média, por cinco integrantes morando no mesmo domicílio. Quando comparamos a densidade óptica do teste ELISA com esses dados, não encontramos relação da privação alimentar com os níveis de IgM anti-PGL-1.

van BEER e colaboradores (1996), baseados em estudos epidemiológicos, afirmam que o contato de um caso MB possui de 5 a 10 vezes maior chance de adoecer de hanseníase quando comparado com uma pessoa que não é comunicante, e quando o caso é PB o risco de adoecer é reduzido para 3 vezes. Em Oriximiná, 63% dos casos relataram não ter conhecimento de contato prévio com portadores de hanseníase, demonstrando que em área com alta endemicidade o bacilo circula com maior facilidade, e que os casos MB de menor evidência clínica da doença para os leigos, provavelmente, não estão sendo diagnosticados e se tornam uma importante fonte de transmissão.

Cinquenta e sete (45%) dos comunicantes foram positivos para o teste ELISA IgM anti-PGL-1. No entanto, quando subdividimos em comunicantes de casos PB e MB não há relação entre o nível da densidade óptica e a classificação operacional do caso correspondente, pois embora a carga bacilar de exposição possa ser diferente, a susceptibilidade à hanseníase é endógena, depende da competência imune de cada indivíduo (BEER, *et al.*, 1996; SCOLLARD *et al.*, 2006). Por outro lado, quando o caso correspondente é ELISA IgM anti-PGL-1 positivo, o comunicante possui um risco relativo de 2,42 vezes maior de ser positivo para o mesmo teste, quando comparado com comunicantes de casos ELISA negativos.

A comparação entre a média das densidades ópticas do ELISA IgM anti-PGL-1 não mostrou diferença entre os três grupos (escolares, casos e comunicantes de hanseníase), evidenciando que em áreas endêmicas, o bacilo circula em grande escala, e mesmo pessoas consideradas clinicamente saudáveis podem apresentar positividade para IgM anti-PGL-1 (SPENCER *et al.*, 2011).

Métodos moleculares para a detecção de DNA do *M. leprae* têm sido empregados no estudo de transmissão desse patógeno, principalmente em regiões endêmicas e como diagnóstico complementar da hanseníase. A principal técnica utilizada é a reação em cadeia da polimerase (PCR), que possui altas especificidade e sensibilidade (BANERJEE *et al.*, 2010).

Nesse estudo padronizamos uma PCR para detecção do *M. leprae*, a partir de iniciadores que produzem um fragmento de 245pb do gene ML 0579, codificador da proteína 6-phosphogluconolactonase, região genômica espécie específica e de cópia única no genoma dessa mycobacteria. A PCR simples diminui a possibilidade de anelamento inespecífico quando comparado com as reações de nested PCR, técnica utilizada na detecção de DNA do *M. leprae* em outros estudos (WALKER & RAPLEY, 1999).

A taxa de positividade geral para a PCR na detecção do *M. leprae* utilizando *swab* nasal é muito baixa, com variação de 3,4 a 9,1% (KLATSER *et al.*, 1993; PATTYN *et al.*, 1993; RAMAPRASAD *et al.*, 1997; TORRES *et al.*, 2003; ALMEIDA *et al.*, 2004). Nesse estudo encontramos 28% de positividade entre os casos índices, 12% entre os comunicantes e 1,6% entre os escolares da rede pública de ensino. As variações, em diversos estudos, na porcentagem de positivos entre casos de hanseníase pode ser resultado de problemas na escolha da metodologia, como na coleta do *swab* nasal, armazenamento das amostras, método de extração adotado, sequências de primers utilizadas, condições de realização da PCR e dificuldades subjetivas na interpretação dos resultados.

TORRES e colaboradores (2003) identificaram 65% dos pacientes MB e nenhum PB positivo para PCR de *swab* nasal. Nesse estudo encontramos 37,5% e 62,5% de casos PB e MB positivos para a PCR de *swab* da mucosa nasal, respectivamente. Esses casos de hanseníase foram notificados entre os anos de 2004 e 2008 (um ano antes da coleta das amostras) e ainda apresentaram positividade para a PCR de *swab* nasal, com uma representação de 27,5% dos casos investigados. Nenhum dos três casos novos, diagnosticados entre os comunicantes foi PCR positivo. No estudo de TORRES e colaboradores (2003) a positividade para a PCR em casos de hanseníase

diminuiu 70% após três meses de tratamento. MARTINEZ e colaboradores (2009) também relataram que a positividade para a detecção molecular do *M. leprae* é proporcional ao índice baciloscópico e inversamente proporcional a instituição da PQT.

Vários estudos defendem proporcionalidade direta entre os níveis de PGL-1 e detecção molecular do *M. leprae* (TORRES *et al.*, 2003). Em Oriximiná, a positividade para a PCR na detecção de DNA do *M. leprae* a partir da mucosa nasal, não correlacionou com a positividade para o teste ELISA IgM anti-PGL-1, quando comparados entre os casos índices, os comunicantes e os escolares.

A positividade para a PCR dos comunicantes mostrou ser independente de seus respectivos casos índices estarem ou não positivos para a mesma técnica, bem como a classificação operacional desses casos.

O número de casos novos de hanseníase entre os menores de 15 anos reflete as condições epidemiológicas da doença. O Brasil em 2009 apresentou um coeficiente de detecção de casos novos entre menores de 15 anos de 5,43 por 100.000 habitantes, sendo o país do continente americano com maior número absoluto (2.669) de novos casos entre os menores de 15 anos notificados. O estado do Pará apresentou o segundo maior coeficiente de detecção de novos casos entre os menores de 15 anos (19,11) em 2009, comparado com os outros estados da federação (SINAN/SVS-MS, 2011). Em Oriximiná, considerando os comunicantes, trinta e quatro (24,6%) eram menores de 15 anos de idade, sendo 21 (68% do total de menores de 15 anos) positivos para o teste ELISA IgM anti-PGL-1 e 3 (2,4%) positivos para a PCR.

Nosso estudo de acompanhamento dessa população será de grande importância no esclarecimento sobre os riscos de adoecimento de cada indivíduo, considerando os resultados de ELISA IgM anti-PGL-1 e detecção molecular do *M. leprae* em *swab* nasal, considerando as informações sócio-epidemiológicas.

7. CONCLUSÕES

- i. Os casos e comunicantes de hanseníase são pessoas que vivem na faixa da pobreza, residindo em casas pequenas e famílias apresentando em média quatro pessoas.
- ii. Quase 50% dos casos de hanseníase já passaram por privação alimentar.
- iii. A mensuração de IgM anti-PGL-1 por ELISA parece ser um bom indicador de infectividade do *M. leprae* na comunidade.
- iv. Casos de hanseníase podem apresentar positividade para ELISA IgM anti-PGL-1 após o fim do tratamento em até quatro anos, independente da forma clínica.
- v. Quarenta e cinco por cento da população clinicamente saudável apresenta positividade para ELISA IgM anti-PGL-1.
- vi. A idade e o período de convivência dos comunicantes com casos índices não interfere na positividade para IgM anti-PGL-1.
- vii. Comunicantes de casos ELISA IgM anti-PGL-1 positivos possuem duas vezes mais possibilidades de ser positivos para o mesmo teste.
- viii. O número de cicatrizes da vacina BCG não interferiu na positividade IgM anti-PGL-1 e na detecção de DNA do *M. leprae* na mucosa nasal dos casos e comunicantes de hanseníase e em escolares da rede pública.
- ix. Padronizamos um protocolo para detecção molecular do *M. leprae* por PCR simples.
- x. O DNA do *M. leprae* foi detectado em casos de até quatro anos do início da PQT, independente da classificação da hanseníase.
- xi. Quinze por cento dos comunicantes e 1,6% dos escolares apresentam DNA do *M. leprae* na mucosa nasal.
- xii. A positividade para a PCR independe da positividade para o ELISA IgM anti-PGL-1.

8. BIBLIOGRAFIA

- ALMEIDA, E.C.; MARTINEZ, A.N.; MANIERO, V.C.; SALES, A.M.; DUPPRE, N.C.; SARNO, E.N.; SANTOS, A.R.; MORAES, M.O. Detection of Mycobacterium leprae DNA by Polimerase chain Reaction in the Blood and Nasal Secretion of Brazilian Household Cantacts. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 99(5):509-512, 2004.
- ARAÚJO, M. G. Hanseníase no Brasil. Rev. da Sociedade Bras. de Med. Tropical. 36 (3): 373-382, 2003.
- BANEJEE, S.; SARKAR, K.; GUPTA, S.; MAHAPATA, P. S.; GUPTA, S.; GUHA, S.; BANDHOPADHAYAY, D.; GHOSAL, C.; PAINE, S.K.; DUTTA, R.N.; BISWAS, N.; BHATTACHARYA, B. Multiplex PCR technique could be an alternative approach for early detection of leprosy among close contacts – a pilot study from India. BMC Infectious Disease, 10:252, 2010.
- BATISTA, I.M.F.D.; SARTORI, B.C.S.; TRINO, L.M. Guia de conduta para a realização do exame baciloscópico. Hansen int, 31 (2): 39-41, 2006.
- BEERS, S.M.VAN; WIT, M.Y.L.; KLATSER. FEMS Microbiology Letters. 136, 221-230, 1996.
- BRAKEL, W.H. Van. Disability and Leprosy: The Way Forward. Invited Editorial: World Leprosy day/Annals Academy of Medicine, Vol. 36 N° 1, 2007.
- BRETT, S.J.; PAYENE, S.N.; GIGG, J.; BURGESS, P.; GIGG, R. Use of synthetic glycoconjugates containing the Mycobacterium leprae specific and immunodominant epitope of phenolic glycolipid I in the serology of leprosy. Clin. Exp. Immunol. 64, 476-483, 1986.
- BUHRER-SÉKULA, S.; SMITH, H.L.; GUSSENHOVEN, G.C.; VANINGEN, C.W.; KLATSER, P.R. A simple dipstick assay for the detection of antibodies to phenolic glicolipid-I of Mycobacterium leprae. Am. J. Trop. Med. Hyg. V 58, n2, p133-136, 1998.
- BUHRER-SÉKULA, S.; SARNO, E.N.; OSKAM, L.; KOOP, S.; WICHERS, I.; NERY, J.A.; VIEIRA, L.M. *et al.* Use of ML dipstick as a tool to classify leprosy patients. Int. J. lepr. Others Mycobact. Dis, v68,n4, p 456-63, 2000.
- BUHRER-SÉKULA, S.; SMITH, H.L.; GUSSENHOVEN, G.C.; VAN LEEUWEN, J.; AMADOR, S.; FUJIAWARA, T.; KLATSER, P.R.; OSKAM, L. Simple and fast lateral flow test for classification of leprosy patients and identification of caontacts with high risk of developing leprosy. J. Clin. Microbiol. v41, n5, p 1991-1995, 2003.

- CALDER, P.C. and KEW, S. The immune system: a target for functional food? *British Journal of Nutrition*, 88, s165-s176. DOI: 10.1079/BJN2002682, 2002.
- CARDONA-CASTRO, N.M.; RESTREPO-JARAMOLLO, S.; OSSA, M.G.; BRENNAN, P.J. Infection by *Mycobacterium leprae* of household contacts of lepromatous leprosy patients from a post-elimination leprosy region of Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, vol 100(7), 703-707, 2005.
- CHO, S.-N.; YANAGIHARA, D.L.; HUNTER, S.W.; GELDER, R.H.; BRENNAN, P.J. Serological Specific of phenolic glycolipid I from *Mycobacterium leprae* and use in serodiagnosis of leprosy. *Infection and Immunity*. V41, n3, p 1077-1083, 1983.
- CHO, S.-N.; CELLONA, R.V.; VILLAHERMOSA, L.G.; FAJARDO JR., T.T.; BALAGON, M.V.F.; ABALOS, R.M.; TAN, E.V.; WALSH, G.P.; KIM, J.-D.; BRENNAN, P.J. Detection of phenolic glycolipid I of *Mycobacterium leprae* in sera from leprosy patients before and after start of multidrug therapy. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. V8, n1, p138-142, 2001.
- COLE, S.T.; EIGLMEIER, K.; PARKHILL, J.; JAMES, K.D.; THOMSON, N.R.; WHEELER, P.R.; HONORÉ, N.; GARNIER, T.; CHURCHER, C.; HARRIS, D.; MUNGALL, K.; BASHAM, D.; BROWN, D.; CHILLINGWORTH, T.; CONNOR, R.; DAVIES, R.M.; DEVLIN, K.; DUTHOY, S.; FELTWELL, T.; FRASER, A.; HAMLIN, N.; HOLROYD, S.; HORNSBY, T.; JANGELS, K.; LACROIX, C.; MACLEAN, J.; MOULE, S.; MURPHY, L.; OLIVER, K.; QUAIL, M.A.; RAJNDREAM, M.-A.; RUTHERFORD, K.M.; RUTTER, S.; SEEGER, K. SIMON, S.; SIMMONDS, M.; SKELTON, J.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; STEVENS, K.; TAYLOR, K.; WHITEHEAD, S.; WOODWARD, J.R. & BARRELL, B.G. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature* 409, 1007 – 1011, 2001.
- FOSS, N T. Aspectos imunológicos da hanseníase. *Medicina, Ribeirão Preto*, 30: 335-339, jul/set. 1997.
- FOSS, N T. Hanseníase: aspectos clínicos, imunológicos e terapêuticos. *An. Bras. de Dermatologia*. RJ. 74 (2): 113-119, 1999.
- GOULART, I. M. B.; PENNA, G. O.; CUNHA, G. Imunopatogenia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 35(4):365-375, 2002.
- GOULART, I.M.B.; SOUZA, D.O.B.; MARQUES, C.R.; PIMENTA, V.L.; GONÇALVES, M.A.; GOULART, L.R. Risk and Protective Factors for

Leprosy Development Determined by Epidemiological Surveillance of Household Contacts. *Clinical and Vaccine Immunology*, vol15, No 1, p101-105, 2008.

GUENIN-MACÉ, L.; Siméone, R.; Demangel, C. Lipids of pathogenic mycobacteria: contributions to virulence and host immune suppression. *Transboundary and Emerging Diseases*. 56, 255-268, 2009.

HARROP, E. Leprosy. *J MED* 3: 2-10. 2002.

IBGE. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>>. Acesso em 20 de abril de 2011.

JACOBSON, R.R.; KRAHENBUHL, J.L. Leprosy. *Lancet* 353: 655-660, 1999.

JOPLING, W. H. Leprosy stigma. **Lepr. Rev.**, v. 62, p. 1 -12, 1991.

KANG, T. J., YEUM, C. E., KIM, B. C., YOU, E. Y., CHAE, G. T. 2004. Differential production interleukin-10 and interleukin-12 in mononuclear cells from leprosy patients with a Toll-like receptor 2 mutation. *Immunology* 112 674–680.

LEVINSON, W; JAWETZ, E. **Microbiologia médica e imunológica**. 7 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

LIBRATY, D. H., AIRAN, L. E., UYEMURA, K. Interferon-gamma differentially regulates interleukin-12 and interleukin-10 production in leprosy. *J.Clin.Invest* 99, 336-341, 1997.

MA, J. CHEN, T. MANDELIN, J. CEPONIS, A. MILLER, N.E. HUKKANEN, M. MA, G.F. and KONTTINEN, Y.T. Regulation of macrophage activation, 60: 2334-2346, 2003.

MACARTHUR, W. Medieval leprosy in the British Isles. *Lepr Rev* ;24:8-19,1953.

MARTELLI, C.M.T.; STEFENI, M.M.A.; PENNA, G.O.; ANDRADE, A.L.S.S.; Endemias e epidemias brasileiras, desafios e perspectivas de investigação científica: hanseníase. *Rev. Bras. Epidemiol.* V5, n3, 2002.

MARTINEZ, A.N.; LAHIRI, R.; PITTMAN, T.L.; SCOLLARD, D.; TRUMAN, R.; MORAES, M.O.M.; WILLIAMS, D.L. Molecular determination of *Mycobacterium leprae* Viability by Use of Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol 47(7), p. 2124-2130, 2009.

MEDZHITOV, R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* vol. 449/18. October, 2007.

MAIDEN, M.C.J. Putting leprosy on the map. *Nature genetics*, vol 41 number 12, 2009.

MEIMA, A. *et al.* Disappearance of leprosy from Norway: an exploration of critical factors using an experimental modelling approach. *Int. J. Epidemiol.*, v. 31, p. 991-1000, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. ***Vigilância em Saúde: situação epidemiológica da hanseníase no Brasil.*** SVS/DVE/PNCH. Brasília, 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, Departamento de Informática do sistema único de saúde (SUS/DATASUS). Acompanhamento da Hanseníase. Disponível em: <http://w3.datasus.gov.br/datasus>, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. Programa nacional de eliminação da hanseníase. V carta de eliminação da hanseníase, Pará, 2006.

MIZUNO, K.; OKAMOTO, H. & HORIO, T. Muramyl dipeptide and mononuclear cell supernatant induce Langhans-type cells from human monocytes. *J. Leukoc. Biol.*, v. 70: 386-394, 2001.

MONOT, M.; HONORÉ, N.; GARNIER, T.; ZIDANE, N.; SHERAFI, D.; PANIZ-MONDOLFI, A.; MATSUOKA, M.; TAYLOR, G.M.; DONOGHUE, H.D.; BOUWMAN, A.; MAYS, S.; WATSON, C.; LOCKHOOD, D.; KHAMISPOUR, A.; DOWLATI, Y.; JIANPING, S.; REA, T.H.; VERA-CABRERA, L.; STEFANI, M.M.; BANU, S.; MACDONALD, M.; SAPKOTA, B.R.; SPENCER, J.S.; JÉRÔME, T.; HARSHMAN, K.; SINGH, P.; BUSSO, P.; GATTIKER, A.; ROUGEMONT, J.; BRENNAN, P.J.; COLE, S.T. Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. *Nature genetics*, vol 41 number 12, 2009.

MONOT, M.; HONORÉ, N.; GARNIER, T.; ARAOZ, R.; COPPÉE, J.-Y.; LACROIZ, C.; SOW, S.; SPENCER, J.S.; TRUMAN, R.W.; WILLIAMS, D.L.; GELBER, R.; VIRMOND, M.; FLAGEUL, B.; CHO, S.-N.; JI, B.; PANIZ-MONDOLFI, A.; CONVIT, J.; YOUNG, S.; FINE, P.E.; RASOLOFO, V.; BRENNAN, P.J. & COLE, S.T. On the origin of leprosy. *Science*, vol 308, 2005.

MURRAY, P. ***Microbiologia médica.*** 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

- OCHOA, M. T., VALDERRAMA, L., OCHOA, A. Lepromatous and tuberculoid leprosy: clinical presentation and cytokine responses. *Int.J.Dermatol.* 35, 786-790, 1996.
- OTTON, R. Obtenção de linfócitos de modelos animais. In: Como cultivar células. PERES, C. M & CURI, R (eds.). Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan S.A. 2005. p. 106-109.
- PANDYA, S. S. The international leprosy conference, Berlin 1897: the politics of segregation. *História, Ciência, Saúde – Manguinhos*. Vol. 10 (suplemento 1): 161-177, 2003.
- RAFI, A.; DONOGHUE, H.D.; STANFORD, J.L. Application of polymerase chain reaction from the detection of *Mycobacterium leprae* DNA in specimens from treated leprosy patients. *Int. J. Lep.* Vol 34, p 255-273, 1994.
- RAMAPRASAD, P.; FERNANDO, A.; MADHALE, S.; RAO, J.R.; EDWARD, V.K.; SAMSON, P.D.; KLATSER, P.R.; DE WIT, M.Y.; SMITH, W.C.; CREE, I.A. Transmission end protection in leprosy: indications of the role of mucosal immunity. *Lepr. Rev.* Vol 68, p 301-15, 1997.
- RAMBUKKANA, A. How does *Mycobacterium leprae* target the peripheral nervous system? *Trends Microbiol.* v.8, p.23-28, 2000.
- RAMBUKKANA, A. ZANAZZI, G. TAPINOS, SALZER, J. L. Contact-Dependent Demyelination by *Mycobacterium leprae* in the Absence of Immune Cells. *Science* 296, 927 (2002); DOI:10.1126/science. 1067631.
- REES, R. J. W. The microbiology of leprosy. In: HASTINGS, R. C. **Leprosy**. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1985. Cap. 3, p. 31-52.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratorial manual. Cold Spring Harbor Laboratory Prees, New York, USA, 1989.
- SALGADO, C. G. & CRUZ, C. A. V. Hanseníase: Análise dos dados epidemiológicos brasileiros em relação ao resto do mundo, com especial ênfase à Região norte do Brasil. *Coleção de Estudos Regionais sobre os Objetivos de Desenvolvimento do Milênio* v.Região Norte, p.184-190, 2007.
- SATYARAJ, E. Emerging paradigms in immunonutrition. *Top Companion Ani Med.* Nestlé Purina Research, St. Louis, MO, USA. 26(1): 25-32, 2011 (in process).

- SCOLLARD, D. M., L. B. ADAMS, T. P. GILLIS, J. L. KRAHENBUHL, R. W. TRUMAN, AND D. L. WILLIAMS. The Continuing Challenges of Leprosy. *Clinical Microbiology Reviews*, Apr. 2006, p. 338–381 Vol. 19, No. 2/0893-85 doi:10.1128/CMR.19.2.338–381.2006.
- SHEPARD, C. C. Acid-fast bacilli in nasal excretions in leprosy, and results of inoculation of mice. *Am. J. Hyg.* 1960, Vol. 71: 147-157.
- SILVA, B.D.S.; SOUZA, M.R.; KIPNIS, T.L.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A.P. Avaliação dos anticorpos séricos totais antiglicolípídeos fenólico de *Mycobacterium leprae* em indivíduos portadores de hanseníase e seus contatos domiciliares no estado de goiás, Brasil. *Revista de Patologia Trpical*, vol 38(3):187-196, 2009.
- SINAN NET – PARÁ, Secretaria de Estado de Saúde Pública do Estado do Pará. Disponível em: <<http://www.sespa.pa.gov.br/cgi-bin/tabnet?sespa/sinan/notindivinet>>. Acesso em 20 de abril de 2011.
- SINAN/SVS (DATASUS), Ministério da Saúde do Brasil. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/hanseniase/bases/Hansbrnet.def>>. Acesso em 20 de abril de 2011.
- SPENCER, J.S.; KIM, H.J.; WHEAT, W.H.; CHATTERJEE, D.; BALAGON, M.V.; CELLONA, R.V.; TAN, E.V.; GELBER, R.; SAUNDERSON, P.; DUTHIE, M.S.; REECE, S.T.; BURMAN, W.; BELKNAP, R.; KENZIE, W.R.M.; GELUK, OSKAM, L.; DOCKRELL, H.M.; BRENNAN, P.J. Analysis of antibody responses to *Mycobacterium leprae* phenolic glycolipid I, lipoarabinomannan, and recombinant proteins to define disease subtype-specific antigenic profiles in leprosy. *Clinical and Vaccine Immunology*, vol 18, n2, p 260-267, 2011.
- TALHARI et al. **Hanseníase**. 4^a ed. Manaus: Instituto Superior de Estudos na Amazônia, 2006.
- TAMAKI, K; STINGL, G; GULLINO, M; *et al.* Ia antigens in mouse skin are predominantly expressed on Langerhans cell. *Journal of Immunology*. 123(2), 784-787, 1979.
- TRAUTMAN, J. R. A brief history of Hansen's disease. *Bulletin of the New York Academy of Medicine*. Vol. 60, Nº. 7, September 1984.
- TRIPATHI, S., BRUCH, D., KITTUR, D. S. Ginger extract inhibits LPS induced macrophage activation and function. *BMC.Complement Altern.Med.* v.8, p.1, 2008.

VISSA, V. D. and BRENNAN, P. The genome of *Mycobacterium leprae*: a minimal mycobacterial gene set. *Genome Biology*, 2(8) reviews 1023.1 – 1023.8, 2001.

WALKER, M.M. & RAPLEY, R. *Guia de Rotas na Tecnologia do Gene*. Atheneu Editora, 1999.

WORLD HEALTH ORGANISATION. *Guia para eliminação da hanseníase*. 1^a ed. 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Weekly Epidemiological Record*, No. 33, 15 de agosto de 2008, 83, 293-300.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Weekly Epidemiological Record*, No. 35, 27 de agosto de 2010, 85, 337-348.

WHO – World Health Organization. *Weekly epidemiological record*. Nº 35, 85, 337 – 348, 27 august 2010.

WU, Q.; LI, K.; YIN, Y.; SHU, H.; WEI, W.; LIU, Q.; YE, G. A study on the methods for early serological diagnosis of leprosy and their potential use. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.*, v67, n3, p302-5, 1999.

YOUNG, G. Prospects for molecular epidemiology of leprosy. *Lepr Rev*, 74, 11-17, 2003.

ZODPEY, S.P. Protective effect of bacillus Calmette Guérin (BCG) vaccine in the prevention of leprosy: A meta-analysis. *Indian J Dermatol Venereo Leprosol*, vol 73, issue 2, 2007.

9. ANEXOS

9.1. ANEXO I – Parecer de comitê de ética em pesquisa em seres humanos.



Universidade Federal do Pará

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS DO INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

Carta: 06/08 CEP-ICS/UFPA Belém, 21 de fevereiro de 2008.

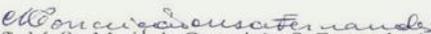
Ao:
Prof. Dr. Cláudio Guedes Salgado

Senhor Pesquisador,

Temos a satisfação de informar que seu projeto de pesquisa **“Detecção e análise da variação genotípica do mycobacterium leprae de casos-índice e comunicantes em regiões endêmicas do Estado do Pará”** de Protocolo nº197/07, CEP-ICS/UFPA, foi apreciado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará, na reunião do dia 04 de dezembro de 2007.

Assim, Vossa Senhoria tem o compromisso de entregar o relatório parcial do mesmo até o dia 30 de dezembro de 2008, no CEP-ICS/UFPA, situado no Campus Universitário do Guamá, Campus profissional, no Complexo de sala de aula do ICS – sala 13 (Altos).

Atenciosamente,


Prof. M. Sc. Maria da Conceição S. Fernandes.
Coordenadora do CEP-ICS/UFPA

Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará (CEP-ICS/UFPA) - Complexo de Sala de Aula/ CCS - Sala 13 - Campus Universitário do Guamá, nº 01, Guamá – CEP: 66075-110 - Belém-Pará. Tel./Fax. 3201-8028/3201-7735 E-mail: cepccs@ufpa.br

9.2. ANEXO II– Questionário e ficha de avaliação dos casos-índice e comunicantes

Detecção e Análise da Variação Genotípica do *Mycobacterium leprae* de Casos-índice e de Comunicantes, em Regiões Endêmicas do Estado do Pará.

486256/2007-3

Este projeto tem a participação das seguintes instituições:



Universidade Federal do Pará
Instituição Coordenadora



Laboratório
de Dermatologia-Imunologia



Dr. Marcelo Cândia

Unidade de Referência Especializada
Dr. Marcelo Cândia



Conselho Nacional de Desenvolvimento
Científico e Tecnológico

Número de série: 0999



ÍNDICE

TERMOS DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	01
INFORMAÇÕES PESSOAIS	07
INFORMAÇÕES DOMICILIARES	08
CONTATO COM HANSENÍASE	09
DIAGNÓSTICO	10
LABORATÓRIO	12
TRATAMENTO	13
RECIDIVA	14
COMUNICANTES	17
AValiação Neurológica Simplificada	27
INSTRUÇÕES PARA PREENCHIMENTO	29
ANOTAÇÕES	31



LABORATÓRIO DE DERMATO-IMUNOLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DO PACIENTE

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ - URE "MARCELLO CANDIA".

Eu _____,
 Doc: _____, fui convidado(a) a participar do estudo "Detecção e análise da variação genotípica do *Mycobacterium leprae* de casos-índice e comunicantes em regiões endêmicas do Estado do Pará" e recebi do seu pesquisador responsável, informações que me fizeram entender, sem dificuldades ou dúvidas, os seguintes aspectos:

O estudo tem por objetivo, identificar características relacionadas às pessoas, aos seus modos de vida, ao meio ambiente e à genética da bactéria que causa a hanseníase, buscando entender mais sobre a transmissão da doença e melhorando sua prevenção e seu tratamento.

Os participantes deste estudo responderão a um questionário, serão submetidos à biópsia de pele, à coleta de sangue e de secreção nasal, realizadas por médicos e profissionais de saúde experientes, sempre com a finalidade de diagnosticar a doença. Suas casas serão visitadas, para que seja realizado o mapeamento da doença por ruas e bairros do município. As pessoas de convívio mais próximo aos participantes, também serão examinadas e submetidas à coleta de sangue e de secreção nasal de forma rápida e sem dor, desde que devidamente autorizado, bem como, serão orientadas sobre os sinais e sintomas da hanseníase.

A pesquisa será realizada em ambiente seguro, com material limpo e descartável, utilizando medicamentos confiáveis, oferecidos gratuitamente pelo sistema único de saúde e administrados por um longo período, com acompanhamento e atenção a qualquer complicação pela unidade de saúde.

A coleta de sangue poderá causar dor e pequena reação no local e a biópsia cutânea um pequeno ferimento na pele.

Sempre que desejar, serão fornecidos esclarecimentos sobre todas as etapas do estudo e a qualquer momento, o participante poderá recusar-se a continuar no estudo e retirar seu consentimento, sem que isso lhe traga qualquer penalidade ou prejuízo.

Está garantido o cumprimento do que fora informado acima, a gratuidade de todos os procedimentos e o sigilo da identidade dos participantes.

Finalmente, tendo compreendido todas as informações sobre a minha participação no estudo e estando consciente dos meus direitos, das minhas responsabilidades, dos riscos e dos benefícios que a minha participação implica, concordo em participar deste estudo e, para isso, DOU O MEU CONSENTIMENTO.

 Assinatura ou impressão dactiloscópica do(a) voluntário(a) ou responsável legal.

Local: _____ Data: ____/____/____

Prof. Dr. Claudio Guedes Salgado

CRM-PA 5062

Laboratório de Dermato-Imunologia

Av. João Paulo II, 113, Marituba, Pará, Brasil. Fone: (91) 3256-9097



LABORATÓRIO DE DERMATO-IMUNOLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DO COMUNICANTE

0999 **A**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ - URE "MARCELLO CANDIA".

Eu, _____,
 Doc: _____, fui convidado(a) a participar do estudo "Detecção e análise da variação genotípica do *Mycobacterium leprae* de casos-índice e comunicantes em regiões endêmicas do Estado do Pará" e recebi do seu pesquisador responsável, informações que me fizeram entender, sem dificuldades ou dúvidas, os seguintes aspectos:

O estudo tem por objetivo, identificar características relacionadas às pessoas, aos seus modos de vida, ao meio ambiente e à genética da bactéria que causa a hanseníase, buscando entender mais sobre a transmissão da doença e melhorando a prevenção e o tratamento.

Os participantes deste estudo responderão a um questionário, serão submetidos à coleta de sangue e de secreção nasal, realizadas por médicos e profissionais de saúde experientes, sempre com a finalidade de diagnosticar a doença. Suas casas serão visitadas, para que seja feito um mapeamento da doença por ruas e bairros do município.

A pesquisa será realizada em ambiente seguro, com material limpo e descartável. A coleta de sangue poderá causar dor e pequena reação no local e a coleta de secreção nasal será realizada de forma rápida e indolor.

A participação nesta pesquisa é voluntária e, sempre que desejar, serão fornecidos esclarecimentos sobre todas as etapas do estudo. A qualquer momento, o participante poderá recusar-se a continuar no estudo e retirar seu consentimento, sem que isso lhe traga qualquer penalidade ou prejuízo.

Está garantido o cumprimento do que fora informado acima, a gratuidade de todos os procedimentos e o sigilo da identidade dos participantes.

Finalmente, tendo compreendido todas as informações sobre a minha participação no estudo e estando consciente dos meus direitos, das minhas responsabilidades, dos riscos e dos benefícios que a minha participação implica, concordo em participar deste estudo e, para isso, DOU O MEU CONSENTIMENTO.

Assinatura ou impressão dactiloscópica do(a) voluntário(a) ou responsável legal.

Local: _____ Data: ____/____/____

Prof. Dr. Cláudio Guedes Salgado
 CRM-PA 5062
 Laboratório de Dermato-Imunologia
 Av. João Paulo II, 113. Marituba, Pará, Brasil. Fone: (91) 3256-9097

02



INFORMAÇÕES PESSOAIS

- 1 Nome: _____
- 2 Nascimento: ____/____/____ 3 Idade: ____ anos 4 Gênero: M F
- 5 Naturalidade (Cidade/UF): _____
- 6 Estado Civil: Solteiro Casado(a) União estável Separado(a) Viúvo(a)
- 7 Cor da Pele/Etnia: Negra Branca Parda Amarela Indígena
- 8 Escolaridade (em anos de estudos concluídos):
 1 a 3 4 a 7 8 a 12 13 ou mais Não se aplica
- Maior grau de escolaridade atingido:
 Nenhum Ensino Fundamental Ensino Médio Ensino Superior
- 9 Ocupação: _____
 Em exercício Afastado Temporariamente Desocupado
- 10 Renda do núcleo familiar:
 Sem renda < 1 Salário mínimo 1 Salário mínimo
 Até 2 salários mínimos Até 3 salários mínimos > 3 Salários mínimos
- 11 O núcleo familiar é beneficiado com algum tipo de transferência governamental?
 Não
 Sim. Qual? Aposentadoria Pensão permanente Pensão temporária
 Programa oficial de auxílio: _____
 Outro: _____
- 12 Já sofreu privação alimentar?
 Sim Não



INFORMAÇÕES DOMICILARES

- 13] Endereço: _____
 Ponto de referência: _____
- 14] Bairro/Cidade/UF: _____ 15] CEP: _____ - _____
- 16] Zona: Urbana Rural Urbana/Rural Ignorado
- 17] Fones: (____) _____ Cel: (____) _____ Contato: (____) _____
- 18] Georreferenciamento do domicílio
 Não Sim Latitude: ____° ____' ____" Longitude: ____° ____' ____"
- 19] Tempo de residência no domicílio: _____
- 20] Número de cômodos na casa: _____ 21] Total de moradores: _____ Pessoas
- 22] Há dormitório(s) com densidade acima de 2 pessoas? Sim Não
- 23] Residências anteriores:
 (Bairro/Cidade/UF): _____ Por quanto tempo? _____
 (Bairro/Cidade/UF): _____ Por quanto tempo? _____
- 24] Expectativa de mudança? Não Sim. Bairro/Cidade/UF: _____
- 25] Abastecimento de água:
 Rede de água encanada Poço "boca larga"
 Poço artesiano Outro: _____
- 26] Água para consumo: Mineral Filtrada, fervida ou clorada Coada ou nenhum outro método
- 27] Rede de esgoto: Pública Fossa Outro: _____
- 28] Destino do lixo: Coleta Queima Enterra A céu aberto
- 29] Domicílio subnormal? Sim Não



CONTATO COM HANSENÍASE

30. Conviveu com caso(s) de hanseníase, previamente?

Não Sim Quantos? 1 2 3 4 5 6 7 ou mais

30.1 Nome: _____

Grau de Parentesco: Pais Namorado(a) Parente não Consanguíneo

Irmãos Cônjuge Não Parente

Filho(a) Parente Consanguíneo

Tipo de convívio: Intra-domiciliar Extra-domiciliar

Período de convivência: < 1 1 a 2 2 a 5 5 a 10 > 10 anos

Há mais de 10 anos? Sim Não

30.2 Nome: _____

Grau de Parentesco: Pais Namorado(a) Parente não Consanguíneo

Irmãos Cônjuge Não Parente

Filho(a) Parente Consanguíneo

Tipo de convívio: Intra-domiciliar Extra-domiciliar

Período de convivência: < 1 1 a 2 2 a 5 5 a 10 > 10 anos

Há mais de 10 anos? Sim Não

30.3 Nome: _____

Grau de Parentesco: Pais Namorado(a) Parente não Consanguíneo

Irmãos Cônjuge Não Parente

Filho(a) Parente Consanguíneo

Tipo de convívio: Intra-domiciliar Extra-domiciliar

Período de convivência: < 1 1 a 2 2 a 5 5 a 10 > 10 anos

Há mais de 10 anos? Sim Não



DIAGNÓSTICO

31) Data do diagnóstico: ____/____/____ 32) Unidade de Saúde: _____

33) Prontuário: _____ 34) SINAN: _____

35) Recidiva: Não Sim

36) Foto: Não Sim. Registro: _____

37) Grau de Incapacidade física no diagnóstico:

0 1 2 Não realizado

38) Cicatriz BCG:

Número de cicatrizes: 0 1 2 Duvidosa

Diâmetro das cicatrizes _____ mm; _____ mm.

39) Tipos de lesões:

S - Somente área hipoestésica

M - Mácula hipocrômica

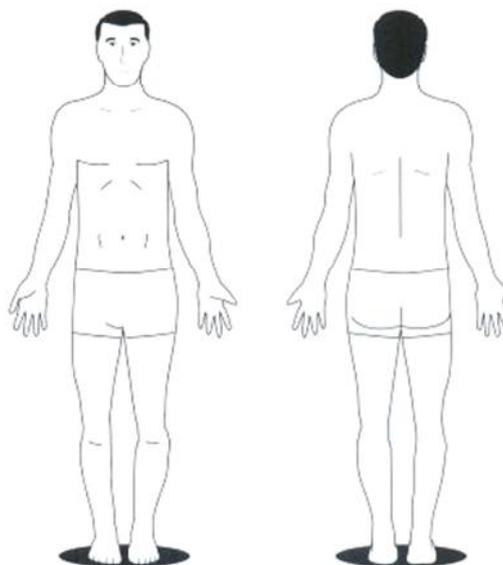
T - Tubérculo

P - Placa

F - Fóvea

I - Infiltração

N - Nódulo



40) Número de lesões: 1 2 3 4 5 6 ou mais



DIAGNÓSTICO

41) Forma clínica:

I T BT BB BV V Neural pura

42) Classificação operacional:

PB MB

43) Co-morbidades:

Diabetes Melitus Sim Não

Hipertensão Arterial Sistêmica Sim Não

Neoplasias Sim Não

Outras: _____

44) Co-infecções:

HIV Sim Não

Tuberculose Sim Não

Hepatite C Sim Não

Outras: _____



45) **Baciloscopia:** Positiva Negativa Não realizada

IB: _____

IM: _____

Data e local do teste: ____/____/____, _____

Técnico responsável: _____

46) **Histopatologia:** I T BT BB BV V Não realizada

47) **Sorologia:**

ELISA (Anti-PGL1): _____ DO: _____ Cut-off: _____

Data e local do teste: ____/____/____, _____

Técnico responsável: _____

Não realizada

48) **Diagnóstico molecular:**

Positivo Negativo Não realizado

49) **Sensibilidade medicamentosa - Sequenciamento:**

rpoB mutação Não Sim Não realizado

folP mutação Não Sim Não realizado

gyrA mutação Não Sim Não realizado

50) **Genotipagem:**

Não realizado

**51** Esquema de tratamento: PQT/PB 6 doses PQT/MB 12 doses PQT/MB 24 doses Esquema alternativo: _____**52** Reação hansênica antes do tratamento: Não Sim

Tipo de reação:

 1 2 Mista Neurite isolada

Tratamento:

 Prednisona Talidomida Outro: _____


RECIDIVA

* Procedência das informações: Prontuário Paciente Acompanhante

53. Data do 1º diagnóstico: ____/____/____

54. Quantos episódios de recidiva o paciente já apresentou? _____

55. Local do 1º diagnóstico: _____

Mesma US Outra US US Referência

56. Tipos de lesões observadas no 1º diagnóstico

S - Somente área hipoestésica

M - Mácula hipocrômica

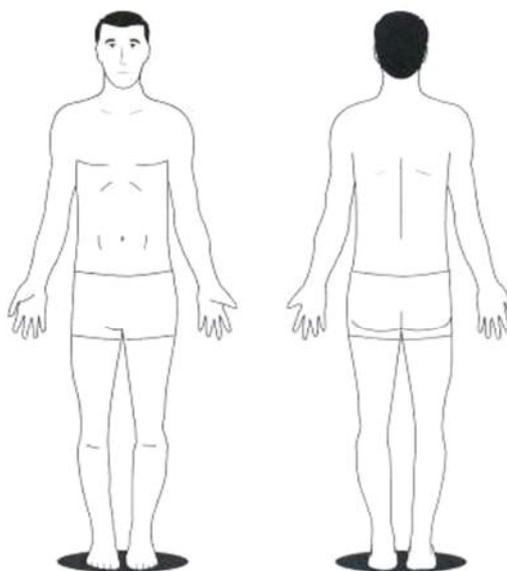
T - Tubérculo

P - Placa

F - Fóvea

I - Infiltração

N - Nódulo



57. Número de lesões:

1 2 3
 4 5 6 ou mais

58. As lesões observadas no 1º diagnóstico desapareceram após o tratamento?

Sim Não

59. Forma clínica no 1º diagnóstico:

I T BT BB BV V Neural pura Não sabe informar

60. Classificação operacional: PB MB

61. Esquema terapêutico após o 1º diagnóstico:

PQT/PB 6 doses PQT/MB 12 doses PQT/PB 24 doses

DNDS + PQT ROM Esquema alternativo: _____



62) Grau de Incapacidade física no 1º diagnóstico:

0 1 2 Não realizado Não sabe informar

63) Apresentou reação durante o 1º tratamento?

Sim Não

Tipo de reação:

Tipo 1 Tipo 2 Mista Neurite isolada

Tratamento:

Prednisona Talidomida Outros

Resposta:

Boa Ruim

64) N° de trocos nervosos afetados no 1º diagnóstico:

0 1 2 ou mais

Radial direito Radial esquerdo

Ulnar direito Ulnar esquerdo

Mediano direito Mediano esquerdo

Fibular direito Fibular esquerdo

Tibial direito Tibial esquerdo

Outros _____

Não sabe informar

65) Baciloscopia no 1º diagnóstico:

Positiva Negativa Não realizada Não sabe informar

IB: _____

IM: _____

66 Histopatologia no 1º diagnóstico:

I T BT BB BV V Não realizada

67 Apresentou reação hansênica no período pós-alta?

Sim Não

Tipo de reação: Tipo 1 Tipo 2 Mista Neurite isolada Não sabe informar

Quanto tempo após a alta?

Menos de 3 meses De 3 a 12 meses Mais de 12 meses

Quantos episódios reacionais?

1 2 3 4 5 Mais de 5

Esquema de Tratamento:

Prednisona. Período: _____ meses

Talidomida. Período: _____ meses

P + T. Período: _____ meses

Outro: _____ Período _____ meses

Tratamento Contínuo: Sim Não

Resposta: Boa Ruim

68 Apresentou outra doença durante o período pós-alta?

Não

Sim, Qual? _____



COMUNICANTE

69 Comunicantes do paciente:



0999

69.1 Nome: _____

69.1.1 Grau de Parentesco:

- Pais Namorado(a) Parente não Consanguíneo
 Irmãos Cônjuge Não Parente
 Filho(a) Parente Consanguíneo

69.1.2 Período de convivência: _____

69.1.3 Tipo de convívio: Intra-domiciliar Extra-domiciliar

Telefone: (____) _____ ; (____) _____ ; (____) _____

Endereço: _____

Ponto de referência: _____

Georeferenciamento do domicílio:

Não Sim Latitude: ____° ____' ____" Longitude: ____° ____' ____"

69.1.4 Cicatriz BCG:

Número de cicatrizes: 0 1 2 Duvidosa

Diâmetro das cicatrizes _____ mm; _____ mm.

69.1.5 Forma clínica: I T BT BB BV V Neural pura

69.1.6 Classificação Operacional: PB MB

69.1.7 Presença de lesões: Sim Não



0999

A

69.1.8 Tipos de lesões:

S - Somente área hipoestésica

M - Mácula hipocrômica

T - Tubérculo

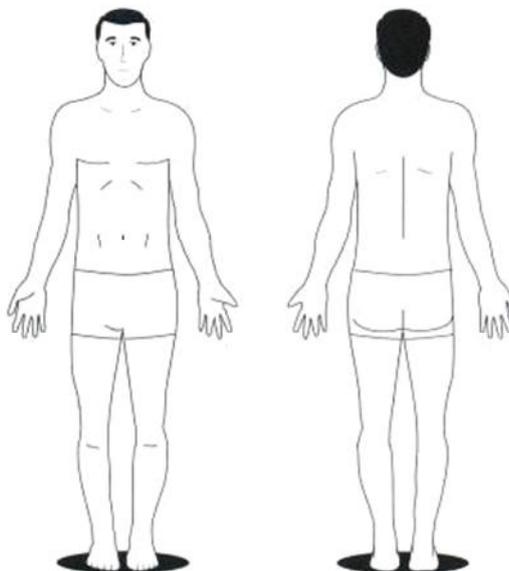
P - Placa

F - Fóvea

I - Infiltração

N - Nódulo

Número de lesões:

 1 2 3 4 5 6 ou mais**69.1.9 Sorologia:**

ELISA (Anti-PGL1): _____ DO: _____ Cut-off: _____

Data e local do teste: ____/____/____, _____

Técnico responsável: _____

69.1.10 Diagnóstico molecular: Positivo Negativo Não realizado**69.1.11 Comunicante foi diagnosticado como caso novo?** Não Sim. Ver questionário, número de série: _____

Observações:

LABORATÓRIO DE DERMATO-IMUNOLOGIA


AVALIAÇÃO NEUROLÓGICA SIMPLIFICADA

FACE	1•	/	/	2•	/	/	3•	/	/
Nariz	D		E	D		E	D		E
Queixa principal									
Ressecamento (S/N)									
Ferida (S/N)									
Perfuração de septo (S/N)									
Olhos	D		E	D		E	D		E
Queixa principal									
Fecha olhos s/ força (mm)									
Fecha olhos c/ força (mm)									
Triquiase (S/N) / Ectrópio (S/N)									
Dimin. sensib. córnea (S/N)									
Opacidade da córnea (S/N)									
Catarata (S/N)									
Acuidade visual									
Membros superiores	1•	/	/	2•	/	/	3•	/	/
Queixa principal									
Palpação de nervos	D		E	D		E	D		E
Ulnar									
Mediano									
Radial									

Legenda: N = normal E = espessado D = dor

Avaliação da força	1•	/	/	2•	/	/	3•	/	/
	D		E	D		E	D		E
Abrir dedo mínimo Abdução do 5º dedo (nervo ulnar) 									
Elevar o polegar Abdução do polegar (nervo mediano) 									
Elevar o polegar Extensão do punho (nervo radial) 									

Legenda: F = Forte D = Diminuída P = Paralisado ou 5 = Forte, 4 = Resistência Parcial, 3 = Movimento completo, 2 = Movimento parcial, 1 = Contração, 0 = Paralisado

Inspeção e avaliação sensitiva

1•	/	/	2•	/	/	3•	/	/
D		E	D		E	D		E
								

Legenda: Caneta/filamento lilás (2 g): Sente  Não sente **X** ou Monofilamentos: seguir cores

Garra móvel: M Garra rígida: R Reabsorção:  Fenda: 

LABORATÓRIO DE DERMATO-IMUNOLOGIA


AVALIAÇÃO NEUROLÓGICA SIMPLIFICADA

Membros superiores	1•	/	/	2•	/	/	3•	/	/
Queixa principal									
Palpação de nervos	D		E		D		E		
Fibular									
Tibial Posterior									

Legenda: N = normal E = espessado D = dor

Avaliação da força	1•	/	/	2•	/	/	3•	/	/
	D		E		D		E		
Elevar o hálux Extensão de hálux (nervo fibular)									
Elevar o pé Dorsiflexão de pé (nervo fibular)									

Legenda: F = Forte D = Diminuída P = Paralisado ou 5 = Forte, 4 = Resistência Parcial, 3 = Movimento completo, 2 = Movimento parcial, 1 = Contração, 0 = Paralisado

Inspeção e avaliação sensitiva

1•		2•		3•	
D	E	D	E	D	E
					

Legenda: Caneta/filamento lilás (2 g): Sente Não sente ou Monofilamentos: seguir cores
Garra móvel: M Garra rígida: R Reabsorção:  Ferida: 

CLASSIFICAÇÃO DO GRAU DE INCAPACIDADE (OMS)

DATA DA AVALIAÇÃO	OLHOS		MÃOS		PÉS		MAIOR GRAU		ASSINATURA
	D	E	D	E	D	E	D	E	
Aval. diagnóstico / /									
Aval. diagnóstico / /									

LEGENDA PARA PREENCHIMENTO DO GRAU DE INCAPACIDADE

GRAU	CARACTERÍSTICAS
0	Nenhum problema com os olhos, mãos e pés decorrente da hanseníase
I	Diminuição ou perda da sensibilidade nos olhos Diminuição ou perda da sensibilidade nas mãos e/ou pés (não sente 2 g ou toque da caneta)
II	Oíhos: lagofalmo e/ou ectrópio; triquíase; opacidade corneana central; acuidade visual menor que 0, 1 ou não conta dedos a 6 m. Mãos: lesões tróficas e/ou traumáticas; garras; reabsorção; pé caído; contratura do tornozelo.

MONOFILAMENTOS

COR	Gramas
Verde	0,05
Azul	0,2
Lilás	2,0
Verm. fechado	4,0
Verm. cruzado	10,0
Verm. aberto	300,0
Preto	s/resposta



1. Preencher com nome completo do paciente, sem abreviações.
2. Preencher com a data de nascimento do paciente (dia/mês/ano) de forma completa.
3. Anotar a idade do paciente.
4. Assinalar a categoria referente ao sexo do paciente.
5. Preencher com o nome completo do município e com a sigla do Estado onde o paciente nasceu.
6. Assinalar a categoria referente ao estado civil do paciente.
7. Assinalar a cor da pele/etnia auto-declarada pelo paciente.
8. Assinalar o número de anos de estudo concluídos pelo paciente. Considerar cada série concluída com aprovação como um ano de estudo. (Ex.: O paciente cursou 4 anos, porém não concluiu o último ano, este paciente então deverá ser incluído na categoria de 1 a 3). Este campo não se aplica para pacientes com idade inferior a 7 anos. Em seguida, assinalar o maior grau de escolaridade concluído pelo paciente.
9. Anotar a atividade desempenhada pelo paciente no setor formal, informal ou autônomo. Em caso de afastamento temporário ou desemprego, considerar a última atividade exercida pelo paciente. Marcar, em seguida, a situação atual do paciente referente ao exercício de sua atividade.
10. Assinalar a renda mensal do núcleo familiar do paciente, considerando o somatório da renda de todos os membros da família, que residem no mesmo domicílio que o paciente.
11. Assinalar se o núcleo familiar do paciente recebe algum tipo de transferência governamental, incluindo aposentadoria, pensão, ou programa oficial de auxílio. Em resposta positiva, deve-se especificar o tipo de transferência. (Ex.: Bolsa-família; Bolsa-escola).
12. Assinalar se o paciente já vivenciou a fome, em algum momento de sua vida.
13. Anotar o tipo de logradouro (Ex.: Avenida, Rua, Travessa), nome completo e o número da residência do paciente, além de um ponto de referência.
14. Anotar o bairro, o município e a sigla do Estado onde o paciente reside.
15. Anotar o código de endereçamento postal do logradouro da residência do paciente.
16. Assinalar o tipo de zona da residência do paciente. Deve-se considerar zona urbana, a área com características estritamente urbana; rural, área com características estritamente rural e urbana/rural, a área com aglomeração populacional que se assemelha à área urbana.
17. Anotar o código de área e o número de telefone residencial, celular ou de um contato próximo do paciente.
18. Assinalar se a residência do paciente foi georreferenciada. Em resposta positiva, registrar os pontos de latitude e longitude.
19. Anotar há quanto tempo o paciente reside no domicílio atual.
20. Anotar o número de cômodos existente na residência do paciente, desconsiderando o número de banheiros.
21. Anotar o número total de moradores da residência.
22. Assinalar se na residência, há pelo menos um dormitório ocupado por mais de duas pessoas ao mesmo tempo.
23. Assinalar o bairro, o município, a sigla do Estado e o tempo de moradia na última e na penúltima residência do paciente, respectivamente.
24. Assinalar se o paciente tem expectativa de mudança próxima. Em resposta positiva, anotar o bairro, o município e a sigla do Estado de destino.
25. Assinalar a procedência do abastecimento de água na residência do paciente.
26. Assinalar o tipo de água utilizada para consumo pelo paciente.
27. Assinalar o tipo de rede de esgoto presente na residência do paciente.
28. Assinalar o destino do lixo utilizado na residência do paciente.
29. Assinalar se a residência do paciente é considerada subnormal ou não. O domicílio subnormal é aquela habitação carente dos serviços públicos e que não apresenta condições físicas para a moradia e, geralmente, está localizada em área irregular (propriedade particular, pública ou de preservação ambiental), a exemplo de invasões, favelas, assentamentos, palafitas, etc.
30. Assinalar se o paciente já conviveu, previamente, com algum caso de hanseníase. Em resposta positiva, marcar o número total de contatos e, em seguida, anotar o nome completo dos três contatos mais próximos e frequentes relatados pelo paciente, selecionando o grau de parentesco, o tipo de convívio, o período de convivência e se a mesma ocorreu há mais de 10 anos.
31. Anotar a data em que o paciente foi diagnosticado com hanseníase. Em caso de recidiva, anotar a data do diagnóstico atual.
32. Anotar o nome completo da Unidade de Saúde em que foi realizado o diagnóstico.
33. Anotar o número de prontuário do paciente na Unidade de Saúde.
34. Anotar o número do SINAN do paciente.
35. Assinalar se o paciente é um caso de recidiva ou não.
36. Assinalar se o paciente foi fotografado ou não. Para resposta positiva, anotar o número de registro das imagens.
37. Assinalar o grau de incapacidade física resultante da avaliação por ocasião do diagnóstico, segundo as normas técnicas vigentes.
38. Assinalar o número de cicatrizes resultantes da vacina BCG. A cicatriz pode ser observada no braço direito do paciente. Em caso de dúvida quanto a sua presença, assinalar a categoria intitulada duvidosa. Na presença da cicatriz, medir com uma régua milimetrada transparente, o seu diâmetro transversal e longitudinal. Fazer a média dos dois resultados e anotá-la com a unidade mm.
39. Marcar no esquema do corpo humano, os tipos de lesões nas posições correspondentes às observadas no paciente no momento do diagnóstico, utilizando suas respectivas siglas.
40. Assinalar o número de lesões apresentadas pelo paciente no momento do diagnóstico.
41. Assinalar a classificação clínica do paciente, segundo Ridley-Jopling, no momento do diagnóstico.



42. Assinalar a classificação operacional do paciente atribuída, segundo normas técnicas vigentes, no momento do diagnóstico.
43. Assinalar a presença ou ausência de diabetes mellitus, hipertensão arterial sistêmica e neoplasias, concomitantes à hanseníase. Caso o paciente apresente outras doenças não mencionadas, deve-se anotá-las.
44. Assinalar a presença ou ausência de co-infecções por tuberculose, HIV e hepatite C. Caso o paciente apresente outras infecções não mencionadas, deve-se registrá-las.
45. Assinalar o resultado positivo ou negativo da baciloscopia do paciente, no momento do diagnóstico, ou se for o caso, a sua não realização.
Para o resultado positivo de baciloscopia, registrar os índices morfológico(IM) e baciloscópico(IB), assim como, a data, o local onde a baciloscopia foi realizada e o nome do técnico responsável pela execução do teste (não rubricar).
46. Assinalar a forma clínica do paciente indicada pela histopatologia, na ocasião do diagnóstico, ou a sua não realização.
47. Anotar o resultado do ensaio imunoenzimático Anti-PGL 1 do paciente, bem como os valores de densidade óptica, de cut-off, a data, o local onde o teste foi realizado, além do nome do técnico responsável ensaio (não rubricar).
48. Assinalar a presença ou ausência de mutações nos genes *rpoB*, *folP* e *gyrA*, ou a não realização do teste.
49. Anotar os resultados de genotipagem do *Mycobacterium leprae* ou assinalar a não realização do teste.
50. Assinalar o resultado positivo, negativo ou a não realização do diagnóstico molecular.
51. Assinalar o esquema terapêutico estabelecido para o paciente, por ocasião do diagnóstico. Em caso de tratamento alternativo, deve-se especificá-lo.
52. Assinalar a presença ou a ausência de reação hanseníca antes de iniciar o tratamento. Em respostas positivas, deve-se marcar o tipo de reação apresentada pelo paciente, assim como o tratamento que lhe fora atribuído.
*Assinalar a procedência das informações solicitadas ao paciente para responder as questões de número 53 a 58.
53. Anotar a data do primeiro diagnóstico de hanseníase do paciente.
54. Registrar o número de episódios de recidiva apresentados pelo paciente.
55. Anotar o nome completo da Unidade de Saúde (US) em que foi realizado o primeiro diagnóstico de hanseníase do paciente e, em seguida, assinalar se esta é a mesma US atual, outra ou de referência.
56. Marcar os tipos de lesões encontradas no paciente, utilizando suas respectivas siglas, no esquema do corpo humano, em posições correspondentes às relatadas no primeiro diagnóstico do paciente.
57. Assinalar o número de lesões apresentadas pelo paciente em seu primeiro diagnóstico.
58. Assinalar se as lesões apresentadas no primeiro diagnóstico desapareceram após o tratamento.
59. Assinalar a classificação clínica do paciente, segundo Ridley-Jopling, no primeiro diagnóstico.
60. Assinalar a classificação operacional do paciente, atribuída no primeiro diagnóstico do paciente, segundo normas técnicas vigentes.
61. Assinalar o esquema terapêutico estabelecido para o paciente, no primeiro diagnóstico. Em caso de tratamento alternativo, deve-se especificá-lo.
62. Anotar o grau de incapacidade física do paciente resultante da avaliação no primeiro diagnóstico.
63. Assinalar a presença ou a ausência de reação durante o tratamento inicial do paciente. Em resposta positiva, deve-se assinalar o tipo de reação, o tratamento atribuído e a qualidade da resposta a este tratamento.
64. Registrar o número de troncos nervosos afetados, na ocasião do primeiro diagnóstico. Em resposta positiva, assinalar quais troncos nervos foram afetados.
65. Assinalar o resultado positivo ou negativo da baciloscopia no primeiro diagnóstico do paciente, ou se for o caso, a sua não realização ou o desconhecimento do resultado.
66. Assinalar a forma clínica, segundo o resultado da histopatologia, no primeiro diagnóstico do paciente.
67. Assinalar a presença ou a ausência de reação no período pós-alta do primeiro diagnóstico do paciente. Em resposta positiva, deve-se assinalar o tipo de reação apresentada pelo paciente, o período de tempo entre a alta e o aparecimento de reação, o número de episódios reacionais, o tratamento atribuído, a continuidade deste tratamento e a qualidade da resposta do paciente.
68. Assinalar a presença ou a ausência de outras enfermidades após a alta do paciente. Em resposta positiva, deve-se especificá-las.
69. Anotar o nome completo das cinco pessoas que residem (ou residiram nos últimos 10 anos) com o paciente ou que mantiveram convivência próxima e freqüente. Em se tratando de paciente com recidiva, considerar os comunicantes desde o primeiro diagnóstico.
Para cada comunicante registrado, deve-se selecionar o grau de parentesco, o período e o tipo de convivência estabelecida com o paciente. Para os comunicantes cuja convivência for extra-domiciliar, anotar o endereço, com ponto de referência e registrar os pontos de latitude e longitude do georreferenciamento da residência do paciente. Assinalar ainda, as informações requeridas referentes à cicatriz BCG, à forma clínica, à classificação operacional, à presença, ao número de lesões observadas e aos resultados da triagem sorológica e da confirmação molecular.
Se o comunicante for considerado um caso novo, anotar o número de série do questionário.

9.3. ANEXO III – Ficha de identificação dos escolares.

LABORATÓRIO DE DERMATO-IMUNOLOGIA

E 0901

1) Nome: _____

2) Nome da mãe: _____

3) Nome do pai: _____

4) Nascimento: ____/____/____ 5) Idade: ____ anos 6) Gênero: M F

7) Naturalidade (Cidade/UF): _____

8) Cor da Pele/Etnia: Negra Branca Parda Amarela Indígena

9) Série atual: _____

10) Endereço: _____

Ponto de referência: _____

11) Bairro/Cidade/UF: _____ 12) CEP: _____ - _____

13) Fones: (____) _____ Cel.: (____) _____ Contato: (____) _____

14) Georreferenciamento do domicílio

Não Sim Latitude: ____° ____' ____" Longitude: ____° ____' ____"

15) Número de cicatrizes BCG:

Número: 0 1 2 Duvidosa Diâmetro: 5,5 mm 3,5 mm

16) Sorologia:

ELISA (Anti-PGL1): _____ DO: _____ Cut-off: _____ Não realizada

17) Diagnóstico molecular: Positivo Negativo Não realizado

18) Sensibilidade medicamentosa - Sequenciamento:

rpoB mutação Não Sim Não realizado

folP mutação Não Sim Não realizado

gyrA mutação Não Sim Não realizado

19) Genotipagem: _____ Não realizada

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ - URE "MARCELLO CANDIA".

A equipe de pesquisadores coordenada pelo Professor Dr. Claudio Guedes Salgado está realizando o estudo **"Detecção e análise da variação genotípica do Mycobacterium leprae de casos-índice e de comunicantes, em regiões endêmicas do Estado do Pará"**, do qual gostaríamos que seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade participasse e, para isso, precisamos de sua autorização.

O estudo tem por objetivo identificar características relacionadas às pessoas, aos seus modos de vida, ao meio ambiente e à genética do micróbio que causa a hanseníase, para entender melhor sobre a transmissão da doença, melhorando sua prevenção e tratamento.

As crianças e os adolescentes que participarem deste estudo, serão submetidas à coleta de sangue e de secreção nasal, realizada por médicos e profissionais de saúde experientes, sempre com a finalidade de identificar o *M. leprae*. Suas casas serão visitadas, para que seja feito um mapeamento dos casos de hanseníase por bairros e ruas.

A pesquisa será realizada em ambiente seguro, com material limpo e descartável. A coleta de sangue poderá causar dor e pequena reação no local. E a coleta de secreção nasal será realizada de forma rápida e indolor.

A participação nesta pesquisa é voluntária e seu filho participará apenas se você autorizar. Sempre que desejar, será fornecido esclarecimentos sobre cada uma das etapas do estudo. A qualquer momento, o participante poderá recusar-se a continuar no estudo e retirar seu consentimento, sem que isso lhe traga qualquer penalidade ou prejuízo.

Está garantido o cumprimento do que fora informado acima, a gratuidade de todos os procedimentos e o sigilo da identidade dos participantes.

DECLARAÇÃO DE PAIS OU RESPONSÁVEIS

Tendo compreendido perfeitamente tudo o que me foi informado, AUTORIZO QUE MEU FILHO(A) _____, PARTICIPE DESTA ESTUDO, SEM QUE PARA ISSO EU TENHA SIDO FORÇADO OU OBRIGADO.

Assinatura ou impressão dactiloscópica do(a) pai/mãe ou responsável legal.

Doc.: _____

Local: _____, Data: ____/____/____

Prof. Dr. Claudio Guedes Salgado
CRM-PA 5062
Laboratório de Dermato-Imunologia
Av. João Paulo II, 113. Marituba, Pará, Brasil. Fone: (91) 3256-9097