



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS

ANA ROSA BOTELHO PONTES

**DETECÇÃO DE *Mycobacterium lepra* POR PCR EM “SWAB” NASAL E
“SWAB” DA LINFA DO LÓBULO DA ORELHA DE PACIENTES HANSENIANOS.**

BELÉM

2007



ANA ROSA BOTELHO PONTES

**DETECÇÃO DE *Mycobacterium leprae* POR PCR EM “SWAB” NASAL E
“SWAB” DA LINFA DO LÓBULO DA ORELHA DE PACIENTES HANSENIANOS.**

Dissertação apresentada à Pós-Graduação da Universidade Federal do Pará, Núcleo de Medicina Tropical, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Doenças Tropicais, área de Patologia das Doenças Tropicais, orientado pela Profa. Dra. Edna Aoba Yassui Ishikawa.

BELÉM

2007

P813d Pontes, Ana Rosa Botelho
Detecção de *Mycobacterium leprae* por PCR em “SWAB”
Nasal e “SWAB” da linfa do Lóbulo da orelha de pacientes
hansenianos / Ana Rosa Botelho Pontes, orientadora Edna
Aoba Yassui Ishikawa. – 2007.

Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Pará. Núcleo de Medicina
Tropical. Belém, 2007.

1. Doenças. 2. Hanseníase - Diagnóstico. 3. Hanseníase – Tratamento. I.

Título



ANA ROSA BOTELHO PONTES

**DETECÇÃO DE *Mycobacterium leprae* POR PCR EM “SWAB” NASAL E
“SWAB” DA LINFA DO LÓBULO DA ORELHA DE PACIENTES HANSENIANOS.**

Dissertação apresentada à Pós-Graduação da Universidade Federal do Pará, Núcleo de Medicina Tropical, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Doenças Tropicais, área de Patologia das Doenças Tropicais, orientado pela Profa. Dra. Edna Aoba Yassui Ishikawa.

Data de aprovação: 30 de novembro de 2007

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Arival Cardoso de Brito
Núcleo de Medicina Tropical – UFPA

Prof^a. Dr^a. Marília Brasil Xavier
Núcleo de Medicina Tropical - UFPA

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

Prof^a Dr^a Maisa Silva de Sousa
Núcleo de Medicina Tropical – UFPA (Suplente)

A minha mãe Rosinha, pelo esforço, dedicação e perseverança na educação dos filhos, contribuindo, assim, para a minha formação.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter quebrado todas as barreiras do meu caminho e permitido que eu alcançasse essa vitória.

A Prof^a Dr^a. Edna Aoba Yassui Ishikawa, pela paciência, dedicação e disponibilidade na orientação deste trabalho.

Ao meu marido João Luiz pela compreensão e companheirismo e as minhas queridas filhas Natália, Raíssa e Isabela, pelo incentivo, apoio, carinho e amor que sempre me deram.

A minha mãe Rosinha, mulher de fibra e de visão futurista, que sempre labutou pela educação dos filhos.

Aos meus amados irmãos Francisco, Fernando, Ângela, Marileno, Benedito, Waldecy, Acenildo e Cibitinho (*in memorian*) pelo amor, união e amizade.

À minha sogra Lenita Guimarães pelo carinho, dedicação e incentivo demonstrado durante a execução deste trabalho.

À amiga Ana Cristina Moreira pelo apoio, dedicação e disponibilidade dispensada no decorrer desses estudos.

Às minhas sobrinhas Thais e Amanda Brilhante pelo estímulo e carinho.

A amiga Maria das Graças Carvalho pela amizade sincera e parceria de conhecimentos científicos.

À amiga Vanessa Guimarães, pela presteza e colaboração que sempre me deu todas as vezes que requisitei.

À grande amiga Alcinéa Corrêa que por tantos anos me dedicou sua amizade e sempre me apoiou nos momentos difíceis.

À prof^a Dr^a Marília Brasil pela efetiva contribuição no desenvolvimento desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Juarez Quaresma pela cooperação na análise dos exames histopatológicos.

À Prof^a Dr^a Maria da Conceição Pinheiro pelas orientações e incentivo no prosseguimento dessa pesquisa.

À Prof^a Doutoranda Márcia Bragança, pelo incentivo, oportunidades profissionais e pelas demonstrações de afeto e amizade sincera.

Ao Prof. Dr. Luiz Fernando de Paiva Neves pela compreensão, incentivo e oportunidades que me levaram à realização do mestrado.

À Sra. Horenice Cabral – Secretária de Saúde do Município de Itaituba pelo apoio dispensado durante os trabalhos de pesquisas.

Às Enfermeiras Flávia e Márcia e equipe do Hospital Municipal de Itaituba pela colaboração e apoio durante o atendimento dos pacientes.

À Técnica de laboratório Jacira Nascimento pela análise dos exames de baciloscopia.

À Secretária do Curso de Mestrado - Maria do Socorro Cardoso e Sr. William – Gerente Administrativo, pela dedicação e disponibilidade demonstrada durante o desenvolvimento desses estudos.

À Enfermeira Shirlene Freitas pelo apoio e colaboração dedicada durante a coleta de informações no Ambulatório do Núcleo de Medicina Tropical.

À amiga Luciana Rosa pelo apoio durante a formatação deste trabalho.

À Profa. Karla Barros pela revisão gramatical deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem o convite para avaliação desta dissertação.

A todos os pacientes envolvidos nesta pesquisa, por me concederem a oportunidade de adquirir novos conhecimentos em prol da melhoria da qualidade de vida dos hansenianos.

Ao Núcleo de Medicina Tropical e Universidade Federal do Pará pela viabilização deste trabalho.

Ào CNPq e FINEP por ter proporcionado o apoio financeiro para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao CESUPA, pela colaboração e infra-estrutura dispensada, que contribuiu de forma efetiva para a conclusão deste estudo.

A todos aqueles que de forma direta ou indireta cooperaram para o planejamento, operacionalização e finalização desta pesquisa.

“São fúteis e cheias de erros as ciências que não nasceram da experimentação, mãe de todo conhecimento” .

(Leonardo da Vinci)

RESUMO

Recentemente vários estudos têm usado a técnica Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) para detecção do DNA do *Mycobacterium leprae*, em diversas amostras biológicas, demonstrando alta sensibilidade. O objetivo deste trabalho foi avaliar a sensibilidade da PCR na detecção de *M. leprae* em “swab” nasal e “swab” da linfa do lóbulo da orelha de pacientes hansenianos e comparar os resultados da PCR com a baciloscopia e histopatologia e formas multibacilares (MBs) e paucibacilares (PBs) da hanseníase. Foram coletadas amostras de secreção nasal e linfa do lóbulo da orelha de 24 pacientes hansenianos. Para amplificação do DNA foram testados três pares de primers: S13 e S62, R1 e R2, LP1 e LP2 que amplificam fragmentos de DNA de 531 pb, 372pb e 129pb, respectivamente. Os iniciadores LP1 e LP2 expressaram maior sensibilidade, independente das amostras clínicas. Os resultados da PCR foram altamente significativos para as amostras de secreção nasal ($p < 0.0000$) e significativos para os espécimes de linfa do lóbulo da orelha ($p = 0.0000$). Comparando os resultados da PCR, usando os primers LP1 e LP2 e conservante lise 1, com a baciloscopia e histopatologia, os estudos apontaram que a PCR, em amostras de secreção nasal, obteve maior sensibilidade para as formas MBs (41,67%), seguida da baciloscopia (25%) e histopatologia (8,33%). Nas formas PBs, a sensibilidade foi considerada a mesma entre a PCR e Histopatologia (8,33%). A baciloscopia não apresentou sensibilidade (0%). Nas amostras da linfa do lóbulo da orelha, a baciloscopia demonstrou maior sensibilidade para as formas MBs (25%), seguido da PCR (20,83%) e histopatologia (16,7%). Nas formas PBs, a PCR e Histopatologia apresentaram a mesma sensibilidade (4,17%). Não houve sensibilidade na baciloscopia (0%). A PCR, apesar de não demonstrar uma sensibilidade de 100% é uma ferramenta com perspectivas futuras para auxiliar no monitoramento do tratamento e cura dos pacientes hansenianos.

Palavras Chave – Hanseníase. *Mycobacterium leprae*. PCR

ABSTRACT

Recently some studies have used Polymerase Chain Reaction (PCR) technique for detection of the *Mycobacterium leprae* DNA, in diverse biological samples, demonstrating high sensitivity. The objective of this work was to evaluate the sensitivity of the PCR in the detection of *M. leprae* in nasal swab and lymph swab from ear lobe of leprosy patients and to compare the results of the PCR with the bacilloscopy and histopathology and multibacillary and paucibacillary forms of leprosy. Nasal secretion samples and lymph of the lobe of the ear of 24 leprosy patients had been collected. For amplification of the DNA three pairs of primers had been tested: S13 and S62, R1 and R2, LP1 and LP2 that amplify fragments of 531 DNA of pb, 372pb and 129pb, respectively. The primers LP1 and LP2 had expressed greater sensitivity, independent of the clinical samples. The results of the PCR had been highly significant for the nasal secretion samples ($p < 0.0000$) and significant for specimens of lymph of the lobe of the ear ($p = 0.0000$). Comparing the results of the PCR, using primers LP1 and LP2 and conservante lise 1, with the bacilloscopy and histopathology, the studies had pointed that the PCR, in nasal secretion samples, got greater sensitivity for the MBs forms (41,67%), followed of the bacilloscopy (25%) and histopathology (8,33%). In the PBs forms, sensitivity was considered same between the PCR and the histopathology (8,33%). The bacilloscopy did not present sensitivity (0%). In the samples of the lymph of the lobe of the ear, the bacilloscopy demonstrated to greater sensitivity for the MBs forms (25%), followed of the PCR (20,83%) and histopathology (16,7%). In the PBs forms, the PCR and histopathology had presented same sensitivity (4,17%). It did not have sensitivity in the bacilloscopy (0%). The PCR, although not to demonstrate a 100% sensitivity it is a tool with future perspectives to assist in the monitoring of the treatment and cure of the leprosy patients.

Key-Words: Leprosy. *Mycobacterium leprae*. PCR

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - SITUAÇÃO DA HANSENÍASE NA AMÉRICA LATINA.	22
FIGURA 2 - TAXA DE PREVALÊNCIA DA HANSENÍASE NO BRASIL, NO ANO DE 2006.	28
FIGURA 3 - MYCOBACTERIUM LEPRAE EM ESFREGAÇO CUTÂNEO VISTO À MICROSCOPIA ÓPTICA	30
FIGURA 4 - BACILO DE HANSEN	30
FIGURA 5 - PADRÃO DE RESPOSTA NA HANSENÍASE	34
FIGURA 6 – FORMAS CLÍNICAS DA HANSENÍASE	39
FIGURA 7 – ESPECTRO CLÍNICO DA HANSENÍASE	
FIGURA 8 – REPRESENTAÇÃO DA CORRELAÇÃO ENTRE AS AMOSTRAS CLÍNICAS DE SECREÇÃO NASAL, CONSERVADAS EM SOLUÇÃO DE LISE 1 E A BACILOSCOPIA, COM PRIMER LP1 E LP2.	65
FIGURA 9 – CORRELAÇÃO ENTRE AS AMOSTRAS CLÍNICAS DA SECREÇÃO NASAL, CONSERVADAS EM SOLUÇÃO DE LISE 1 E A HISTOPATOLOGIA, COM PRIMER LP1 E LP2.	66

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Nº DE NOVOS CASOS DE HANSENÍASE DETECTADOS NOS 17 PAÍSES MAIS ENDÊMICOS RELATANDO NO MÍNIMO 1000 NOVOS CASOS DURANTE 2005, EM COMPARAÇÃO COM 1993, 2002, 2003 E 2004.	24
TABELA 2 – SITUAÇÃO DA HANSENÍASE NOS PAÍSES QUE AINDA NÃO ALCANÇARAM A META DE ELIMINAÇÃO DA DOENÇA	25
TABELA 3 - SITUAÇÃO DA HANSENÍASE NA REGIÃO DAS AMÉRICAS NO INÍCIO DE 2006	27
TABELA 4 - VALOR DA MÉDIA DA LEITURA CLÍNICA DA REAÇÃO DE MITSUDA (MM), ANÁLISE HISTOLÓGICA DA REAÇÃO DE MITSUDA (ESCORE) E NÍVEIS ANTI PGL-1 USANDO ELISA NO SORO DE PACIENTES HANSENIANOS. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO A MÉDIA ± DESVIO PADRÃO NOS TIPOS CLÍNICOS DA HANSENÍASE	35
TABELA 5 - DESIGNAÇÃO DOS INICIADORES COM SUAS SEQUÊNCIAS E AMPLICONS	55
TABELA 6 – RESULTADOS DA BACILOSCOPIA EM RELAÇÃO À CLASSIFICAÇÃO DA DOENÇA	59
TABELA 7 – RESULTADOS DA HISTOPATOLOGIA EM RELAÇÃO À CLASSIFICAÇÃO DA DOENÇA	59
TABELA 8 – RESULTADOS DA PCR EM AMOSTRAS CLÍNICAS, CONSERVADAS EM SOLUÇÃO DE LISE 1, USANDO OS INICIADORES LP1 E LP2, S13 E S62 E R1 E R2	60
TABELA 9 – RESULTADOS DA PCR EM AMOSTRAS CLÍNICAS, CONSERVADAS EM SOLUÇÃO DE LISE 2, USANDO OS INICIADORES LP1 E LP2, S13 E S62 E R1E R2.	61
TABELA 10 – RESULTADOS DA PCR, NAS AMOSTRAS CLÍNICAS DE SECREÇÃO NASAL E LINFÁ DO LÓBULO DA ORELHA, CONSERVADAS EM SOLUÇÃO DE LISE 1, COM PRIMERS LP1 E LP2.	62
TABELA 11 – RESULTADOS DA PCR, EM AMOSTRAS CLÍNICAS DA SECREÇÃO NASAL E LINFÁ DO LÓBULO DA ORELHA, CONSERVADAS EM SOLUÇÃO DE LISE 2, COM PRIMER LP1 E LP2.	62

TABELA 12 – POSITIVIDADE DOS RESULTADOS DA PCR, EM ESPÉCIMES DE SECREÇÃO NASAL E LINFA DO LÓBULO DA ORELHA, COM INICIADORES LP1 E LP2, CONSERVADAS EM SOLUÇÃO DE LISE 1 E 2 63

TABELA 13 – COMPARAÇÃO DA SENSIBILIDADE DA PCR COM A BACILOSCOPIA, HISTOPATOLOGIA E CLASSIFICAÇÃO, EM AMOSTRAS IMERSAS EM SOLUÇÃO DE LISE 1, USANDO INICIADORES LP1/LP2. 64

TABELA 14 – CORRELAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS AS AMOSTRAS CLÍNICAS DE SECREÇÃO NASAL, CONSERVADAS EM LISE 1, E A BACILOSCOPIA, COM INICIADORES LP1 E LP2. 65

TABELA 15 – CORRELAÇÃO ENTRE AS AMOSTRAS CLÍNICAS DE SECREÇÃO NASAL, CONSERVADAS EM LISE 1, E A HISTOPATOLOGIA, COM INICIADORES LP1 E LPP2 - BELÉM 66

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>a.C</i>	<i>Antes de Cristo</i>
<i>BAAR</i>	<i>Bacilo álcool ácido resistente</i>
<i>BB</i>	<i>Bordeline bordeline</i>
<i>BL</i>	<i>Borderline lepromatosa</i>
<i>BT</i>	<i>Borderline tuberculóide</i>
<i>DNA</i>	<i>Ácido desoxirribonucléico</i>
<i>dNTPs</i>	<i>Deoxinucleotídeos</i>
<i>EDTA</i>	<i>Ácido etilenodiamino tetra-acético</i>
<i>ELISA</i>	<i>Ensaio imunoenzimático</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii, e outros</i>
<i>HCL</i>	<i>Ácido clorídrico</i>
<i>HD</i>	<i>Hanseníase dimorfa</i>
<i>HI</i>	<i>Hanseníase indeterminada</i>
<i>HLA</i>	<i>Antígeno leucocitário humano (Human lymphocyte antigens)</i>
<i>HLA-DR</i>	<i>Antígeno leucocitário humano de classe II, alelo DR</i>
<i>HT</i>	<i>Hanseníase tuberculóide</i>
<i>HV</i>	<i>Hanseníase virchowiana</i>
<i>ICAM-1</i>	<i>Molécula de adesão intercelular 1</i>
<i>IFN-γ</i>	<i>Interferon gama</i>
<i>IgE</i>	<i>Imunoglobulina E</i>

<i>IgG</i>	<i>Imunoglobulina de cadeia Y</i>
<i>IL-10</i>	<i>Interleucina 10</i>
<i>IL-2</i>	<i>Interleucina 2</i>
<i>IL-4</i>	<i>Interleucina 4</i>
<i>IL-5</i>	<i>Interleucina 5</i>
<i>KCl</i>	<i>Cloreto de potássio</i>
<i>L</i>	<i>Lepromatosa</i>
<i>LL</i>	<i>Lepromatosa- lepromatosa</i>
<i>MB</i>	<i>Multibacilar</i>
<i>MBs</i>	<i>Multibacilares</i>
<i>MgCl₂</i>	<i>Cloreto de Magnésio</i>
<i>MHC</i>	<i>Complexo principal de histocompatibilidade (major histocompatibility complex)</i>
<i>MHD</i>	<i>Mal de Hansen dimorfa</i>
<i>MHI</i>	<i>Mal de Hansen indeterminada</i>
<i>MHT</i>	<i>Mal de Hansen tuberculóide</i>
<i>MHV</i>	<i>Mal de Hansen virchowiana</i>
<i>mL</i>	<i>Mililitro</i>
<i>mM</i>	<i>Milimolar</i>
<i>NK</i>	<i>Células natural killer</i>
<i>Nm</i>	<i>Nanomolar</i>
<i>OD</i>	<i>Lóbulo da orelha direita</i>
<i>OE</i>	<i>Lóbulo da orelha esquerda</i>
<i>Pb</i>	<i>Pares de base</i>

<i>PB</i>	<i>Paucibacilar</i>
<i>PBs</i>	<i>Paucibacilares</i>
<i>PCR</i>	<i>Reação em cadeia mediada pela polimerase</i>
<i>PGL-1</i>	<i>Glicolípídeo – fenólico 1</i>
<i>pH</i>	<i>Potencial hidrogênico</i>
<i>Pmoles</i>	<i>Picomoles</i>
<i>Primer</i>	<i>Iniciador</i>
<i>RNA</i>	<i>Ácido ribonucléico</i>
<i>RNase A</i>	<i>Enzima RNase A</i>
<i>RNI</i>	<i>Reativos intermediários do nitrogênio</i>
<i>ROI</i>	<i>Reativos intermediários do oxigênio</i>
<i>Rpm</i>	<i>Rotações por minuto</i>
<i>S</i>	<i>Segundos</i>
<i>Swab</i>	<i>Cotonete</i>
<i>TE</i>	<i>Tampão Tris – EDTA</i>
<i>TGF-β</i>	<i>Fator transformador do crescimento-beta</i>
<i>TNF-α</i>	<i>Fator de necrose tumoral - alfa</i>
<i>Tris</i>	<i>2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol</i>
<i>TT</i>	<i>Tuberculóide</i>
<i>UV</i>	<i>Radiação Ultravioleta</i>
<i>κDa</i>	<i>Quilo Daltons</i>
<i>Hm</i>	<i>Nanômetro</i>
<i>ηg</i>	<i>Nanograma</i>

μL	<i>Microlitro</i>
<i>Mm</i>	<i>Micrômetro</i>
μg	<i>Micrograma</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A HANSENÍASE	20
1.2. IMUNOPATOLOGIA	29
1.3. CLASSIFICAÇÃO DA DOENÇA	38
1.3.1. DIAGNÓSTICO CLÍNICO E LABORATORIAL	42
2. OBJETIVOS	48
2.1. OBJETIVO GERAL	48
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	48
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	49
3.1. TIPO DE ESTUDO	49
3.2. POPULAÇÃO DE ESTUDO	49
3.3. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	49
3.4. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	50
3.5. COLETA E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS	50
3.5.1. Extração de DNA	52
3.5.2. Amplificação do DNA do <i>M. leprae</i> por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	55
	57
3.6. ANÁLISE DOS DADOS	57
4. RESULTADOS	58
4.1 . EXTRAÇÃO DO DNA EM ESPÉCIMES DE SECREÇÃO NASAL E LINFA DO LÓBULO DA ORELHA	58

4.2. RESULTADOS DA BACILOSCOPIA E HISTOPATOLOGIA	58
4.3. RESULTADO DA REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE	60
5. DISCUSSÃO	67
6. CONCLUSÃO	74
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
APÊNDICES	
ANEXOS	

1. INTRODUÇÃO

1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A HANSENÍASE

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica, causada pelo *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), que afeta predominantemente a pele, nervos periféricos e membranas mucosas, com alta prevalência no mundo, constituindo uma das endemias de prioridade pela Organização Mundial da Saúde (OMS) pelo seu poder incapacitante, que marginaliza e interrompe a capacidade produtiva de milhares de pacientes (HASTINGS, 1988). A lepra, no Brasil, tem muitos sinônimos, como morféia, hanseníase e elefantíase-dos-gregos (SANTOS ,2003).

Sua origem ainda permanece obscura para os pesquisadores, porém, parece ser uma das mais antigas doenças manifestadas no homem. As referências mais remotas são de 600 a.C. e procedem da Ásia que, juntamente com a África, podem ser considerados o berço da doença. Está presente em todos os países sul-americanos, com exceção do Chile (OPROMOLLA, 2000).

No Brasil, as primeiras citações da doença são de 1816 e referem-se à existência de hospitais para internação dos doentes, como: Hospitais da Corte e Hospitais dos Lázaros, no Rio de Janeiro, e Santa Casa de Misericórdia de São João Del Rei (Minas Gerais). Neste último, segundo registros, o internamento para os doentes funcionava no fundo do quintal da instituição e os pacientes eram segregados por sexo. Registram-se, nas décadas de 1940 e 1950, a existência de

preventórios nos estados do Maranhão, Ceará, Paraíba e Santa Catarina, enfatizando o cotidiano das crianças hansenianas internadas. As publicações da época apresentavam denúncias de maus-tratos e abandono dos internos e das próprias instituições que acolhiam os lázaros, como eram denominados à época os hansenianos. No Pará, as primeiras referências da doença são da mesma época dos registros nacionais (1816), ocasião em que foi inaugurado o Hospital de Tucunduba, seguindo a inauguração de outros como: Lazarópolis do Prata (em São João Pessoa, a 150 km de Belém, 1924), asilo Santa Teresinha (em Belém, em 1931), colônia de Marituba (1937), leprosário no Tocantins (1938), leprosário no baixo Amazonas (1938), asilo Frei Gil Vilanova e educandário Eunice Weaver, em Belém (SANTOS, 2003).

Apesar da descoberta do *M. leprae* em 1873, por Gerhard Henrik Amauer Hansen, um tratamento mais específico para a hanseníase só foi introduzido na década de 1940, com dapsona e seus derivados. Contudo, com o aparecimento de cepas resistentes à dapsona, foi desenvolvido, em 1991, um regime de tratamento mais efetivo, a poliquimioterapia, usando um coquetel de drogas combinadas: rifampicina, clofazimina e dapsona, para pacientes multibacilar (MB) e rifampicina e dapsona para pacientes paucibacilar (PB), evitando a resistência e encurtando o período de tratamento (www.WHO.int/trd/diseases/leprosy.htm). Entre os medicamentos, a rifampicina é o mais importante, portanto, está incluída no tratamento de ambos os tipos da doença (WHO, 2002).

A Organização Mundial de Saúde e seus associados criaram a “Aliança Global de Eliminação da hanseníase” em 1999, com o objetivo de alcançar a redução

da carga da doença no final de 2005, uma meta originalmente prevista para 2000. (GROATHOUSE, 2004).

Atualmente, a estratégia global de controle da hanseníase, baseada na detecção precoce da doença, e o tratamento, usando a terapia multidrogas, tem tido efeito dramático no número de pacientes hansenianos registrados para o tratamento, mas não tem demonstrado efeito na interrupção da transmissão (SMITH, 2004).

O mapa a seguir (Figura 1) mostra a situação da hanseníase na América Latina, em 2006.



Figura 1 – Mapa da prevalência da hanseníase na América Latina.

Fonte: OMS, 2006

A estratégia para eliminar a hanseníase como um problema de saúde pública ajudou determinados países na redução da carga da doença. No início de 2005, o registro global de prevalência da hanseníase era de 286.063 casos e o número de novos casos detectados no ano de 2004 foi de 407.791; com uma diminuição de aproximadamente 107 000 novos casos detectados durante 2004 comparados com o ano de 2003. Esta diminuição foi devida, principalmente, à redução do número de novos casos na Índia, onde houve uma redução de 29% quando comparado aos dados de 2003 (WHO, 2005). Os novos dados divulgados no segundo semestre de 2006 mostram que o registro global da doença continua a declinar, sendo registrado, no início de 2006, 219.826 casos, enquanto o número de novos casos referidos em 2005 foi de 296 499. A detecção global dos novos casos continua mantendo uma redução significativa: com uma diminuição de, aproximadamente, 110.000 casos (27%) durante 2005, quando comparado com o número de novos casos reportados durante 2004 (WHO, 2006)

A Tabela 1, a seguir, mostra os 17 países onde o número de novos casos reportados, durante 2005, foi de no mínimo 1000 casos. Esses países são responsáveis por 94% de todos os novos casos detectados globalmente. Desde 2002, tem-se observado uma tendência no aumento da detecção na República Democrática do Congo, Indonésia e as Filipinas.

Tabela 1 - Número de novos casos de hanseníase detectados nos 17 países mais endêmicos relatando no mínimo 1000 novos casos durante 2005, em comparação com 1993, 2002, 2003 e 2004.

Países	Nº de novos casos detectados				
	1993	2002	2003	2004	2005
Angola	339	4 272	2 933	2 109	1 877
Bangladesh	6 943	9 844	8 712	8 242	7 882
Brasil	34 235	38 365	49 206	49 384	38 410
China	3 755	1 646	1 404	1 499	1 658
República Democrática do Congo	3 927	5 037	7 165	11 781	10 737
Egito	1 042	1 318	1 412	1 216	1 134
Etiópia	4 090	4 632	5 193	4 787	4 698
Índia	456 000	473 658	367 143	260 063	161 457
Indonésia	12 638	12 377	4 641	16 549	19 695
Madagascar	740	5 482	5 104	3 710	2 709
Moçambique	1 930	5 830	5 907	4 266	5 371
Myanmar	12 018	7 386	3 808	3 748	3 571
Nepal	6 152	13 830	8 046	6 958	6 150
Nigéria	4 381	5 078	4 799	5 276	5 024
Filipinas	3 442	2 479	2 397	2 254	3 130
Sri Lanka	944	2 214	1 925	1 995	1 924
República Unida de Tanzânia	2 731	6 497	5 279	5 190	4 237
Total Global	590 933	620 638	514 718	407 791	296 499

Fonte: adaptado de World Health Organization , 2006.

A queda da prevalência da hanseníase não tem sido, contudo, acompanhada pela diminuição da taxa de detecção de novos casos. A redução observada na prevalência teria sido causada pelo encurtamento da duração do tratamento e remoção dos registros dos pacientes curados ou negligentes, antes de uma redução na transmissão da infecção de *M. leprae* (BRITTON, 2004).

A hanseníase é efetivamente controlada pelo regime de poliquimioterapia (PQT). Contudo, largos números de novos casos continuam sendo detectados em áreas do mundo, onde a doença é altamente endêmica, apesar da aplicação do programa de PQT desde 1982 (GROATHOUSE, 2004).

Essa doença ainda permanece como um problema de saúde pública em seis países, quais sejam: Brasil, República Democrática do Congo, Madagascar, Moçambique, Nepal, e Tanzânia. Nesses países a meta de eliminação da hanseníase ainda precisaria ser alcançada. Juntos, esses países contribuíram, aproximadamente, com 23% da detecção dos novos casos globais e 24% dos casos registrados no início de 2006, como mostra a Tabela 2 (World Health Organization, 2006).

Tabela 2 – Situação da hanseníase nos países que ainda não alcançaram a meta de eliminação da doença.

Países	Prevalência ^a registrada			Nº de novos casos detectados ^b		
	início 2004	início 2005	início 2006	Durante 2003	Durante 2004	Durante 2005
Brasil	79 908 (4.6)	30 693 (1.7)	27 313 (1.5)	49 206 (28.6)	49 384 (26.9)	38 410 (20.6)
República Democrática do Congo	6 891 (1.3)	10 530 (1.9)	9 785 (1.7)	7 165 (13.5)	11 781 (21.1)	10 737 (18.7)
Madagascar	5 514 (3.4)	4 610 (2.5)	2 094 (1.1)	5 104 (31.1)	3 710 (20.5)	2 709 (14.6)
Moçambique	6 810 (3.4)	4 692 (2.4)	4 889 (2.5)	5 907 (29.4)	4 266 (22.0)	5 371 (27.1)
Nepal ^c	7 549 (3.1)	4 699 (1.8)	4 921 (1.8)	8 046 (32.9)	6 958 (26.2)	6 150 (22.7)
República Unida de Tanzânia	5 420 (1.6)	4 777 (1.3)	4 190 (1.1)	5 279 (15.4)	5 190 (13.8)	4 237 (11.1)
Total	112 092	60 001	53 192	80 707	81 289	67 614

^a Taxas de Prevalência são mostradas entre parênteses: número de casos por 10 000 habitantes.

^b Taxas de detecção de novos casos são mostradas entre parênteses: número de casos por 100 000 habitantes.

^c Dados incompletos: detecção de casos reportados em 2005 corresponde a novembro de 2004 a novembro de 2005.

Fonte: adaptado de World Health Organization, 2006.

Na distribuição geográfica atual da hanseníase identificamos uma diminuição significativa na carga global da doença desde a introdução da poliquimioterapia em 1982. Aproximadamente meio milhão de casos são estimados para permanecer em todo o mundo, principalmente na Ásia e subcontinentes africanos. Desde 2001 vem se observando um declínio na detecção anual global de casos, contudo não houve tendência na diminuição dos casos na região africana e na região das Américas. Alguns fatores, como melhoramento na cobertura dos serviços, melhor qualidade da comunidade e maiores esclarecimentos, poderiam estar contribuindo para esse aumento em alguns desses países. O Brasil registrou um aumento de novos casos detectados de 34.235 em 1993 para 38 410 em 2006. Desses, 19.515 são casos de hanseníase multibacilar (BM). Embora o Brasil tenha apresentado redução significativa de sua prevalência de 16,4 por 10.000 habitantes em 1985, para 1,5 por 10.000 habitantes no início de 2006, aproximando-se da meta de eliminação proposta pela OMS, com a redução de sua prevalência para 1 caso por 10.000 habitantes no ano de 2005, continua ocupando o segundo lugar em números de casos e considerado pela OMS como área de alta endemicidade (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006). A Tabela 3 retrata a situação da hanseníase nas Américas no início de 2006.

Tabela 3 – Situação da hanseníase na região das Américas no início de 2006.

Pais	Prevalência Registrada	Deteccão de Casos novos	Casos novos MB	Casos novos Mulheres	casos novos crianças	Incapacidade Casos novos Grau 2	Recaída
Argentina	775	484	348	198	5	8	11
Bolívia	NR	114	41	47	11	2	1
Brasil	27 313	38 410	19 515	17 796	3 259	1 890	1 433
Chile	NR	1	0	1	0	0	0
Colômbia	1017	585	402	0	19	57	35
Costa Rica	33	11	8	6	0	3	0
Cuba	226	208	173	93	8	7	5
República Dominicana	301	155	99	78	25	5	2
Equador	178	116	73	41	0	0	3
El Salvador	10	6	4	3	0	0	0
Guatemala	6	3	3	0	0	0	0
Guiana	NR	28	19	13	5	4	NR
Jamaica	19	9	6	2	1	3	2
México	776	289	218	108	8	32	43
Panamá	9	3	2	0	0	0	1
Paraguai	735	480	373	187	19	38	0
Peru	26	26	19	12	2	1	55
Santa Lúcia	NR	5	3	2	0	0	NR
Suriname	37	42	22	12	7	3	0
Trinidad e Tobago	46	31	15	11	7	1	2
Uruguai	8	6	6	2	0	2	2
Venezuela	1 389	768	496	261	56	47	32
TOTAL	32 904	41 780	21 845	18 873	3 432	2 107	1 627

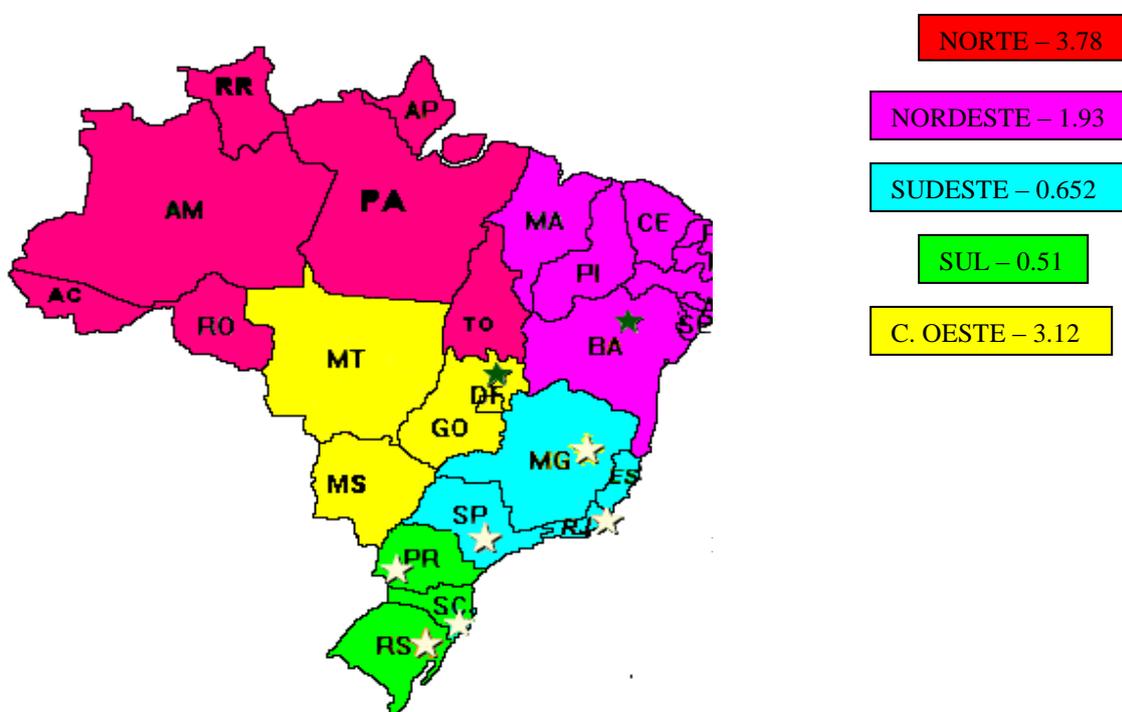
NR – não declarados

Fonte: adaptado da OMS, 2006.

Apesar da importante redução do coeficiente de prevalência da hanseníase no Brasil, em 2006, somente as regiões Sul e Sudeste já alcançaram a meta de eliminação, algumas regiões demandam intensificações das ações para eliminação, entre estas a região Norte (SINAN, 2007). O Nordeste apresentou o maior número de casos novos detectados e a mais alta prevalência registrada, seguido das regiões Norte e Sudeste. No que se refere à taxa de prevalência por 10.000/habitantes, a região Norte continua mantendo a primeira posição, com 3.78, acompanhada pelo Centro Oeste (3.12) e Nordeste (1.93), respectivamente. Analisando a deteção de novos casos e prevalência registrada na região Norte, o Pará continua como o maior detentor, aparecendo, em segundo lugar, o estado do

Tocantins. Observando a situação da hanseníase nos estados da região Norte, o Pará apresentou um declínio significativo na taxa de prevalência por 10.000/habitantes, passando a ocupar a quarta posição entre os estados desta região (3.98), ficando em primeiro lugar o estado de Roraima (6.30), seguido do Tocantins (6.27) e Rondônia (5.66). (SINAN, 2007).

A Figura 2 mostra a taxa de prevalência da hanseníase no Brasil, por 10.000/habitantes, no ano de 2006.



A Figura 2 – Taxa de prevalência da hanseníase no Brasil, por 10.000/habitantes, no ano de 2006.

Fonte: adaptado de SINAN, 2007.

Segundo dados da Secretaria Estadual de Saúde do Pará (SESPA), o Pará é considerado o detentor do maior número de novos casos de hanseníase da região Norte, apresentando um contexto hiperendêmico da doença, principalmente nos municípios de Novo Repartimento, Jacundá e Pacajá, onde se observa que, a

cada ano, aumenta o número de casos. Esses municípios estão localizados ao longo das rodovias mais importantes e relacionados a grandes projetos de desenvolvimento do estado, como áreas de extração mineral (SESPA, 2007).

O município de Belém registrou, no ano de 2006, 490 casos da doença, sendo o bairro do Guamá considerado de maior prevalência, seguido dos bairros do Marco, Tapanã, Terra Firme, Jurunas e Marambaia (SESMA, 2007).

1.2. IMUNOPATOLOGIA

O período de incubação da doença é de 2 a 5 anos e é causada pelo *M. leprae* que, além do homem, pode infectar outros animais, como tatus, chimpanzés e macacos. Membro da família Mycobacteriaceae, tem a forma de um bastonete reto ou ligeiramente encurvado, com 1,5 a 8 micra de comprimento por 0,2 a 0,5 micron de largura. É corado em vermelho pela fucsina e não se descora pela lavagem no álcool e ácido, sendo, portanto, um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR). Nos esfregaços de pele e nos cortes histopatológicos, os bacilos são vistos isolados, em agrupamentos variados ou dispostos em arranjos especiais chamados de globias (GOULART, 2002).

É um parasita intracelular obrigatório encontrado, predominantemente, nos macrófagos. O crescimento ótimo é observado em 27-30°C, o que é refletido, clinicamente, nas áreas mais frias do corpo, como pele, mucosa nasal e nervos

superficiais periféricos (particularmente nas células de Schwann), sítios predominantes da infecção (KATOCH, 2002).

A Figura 3 mostra bacilos corados pelo método de **Ziehl-Neelsen**, os quais são observados íntegros em forma de bastonetes retos ou ligeiramente encurvados, isolados ou em agrupamentos denominados globias, que parecem ser uma forma de defesa da bactéria. A Figura 4 revela o bacilo de Hansen visto à microscopia eletrônica.

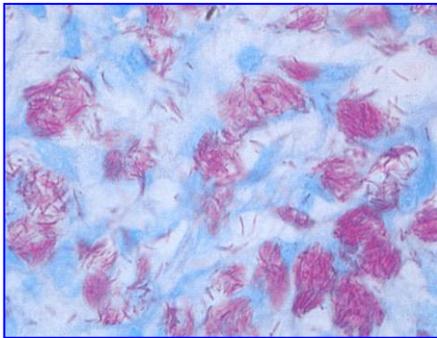


Figura 3 - *Mycobacterium leprae* em esfregaço cutâneo visto à microscopia óptica
Fonte: Leiker & Nunzi (1981)



Figura 4 - Bacilo de Hansen
Fonte: OMS

O principal meio de transmissão da doença é provavelmente pela propagação de aerossol de secreções nasais e gotículas do trato respiratório de pacientes não tratados com doença severa, embora possa ocorrer pelo contato com a pele não íntegra. Vários estudos indicam que a transmissão ocorre principalmente pela inalação e a cavidade nasal seria a porta de entrada e saída do bacilo (JOB, 1990;1991; MCDERMOTT-LANCASTER, 1990).

O homem é considerado a única fonte de infecção da hanseníase. O contágio dá-se através de uma pessoa doente, portadora do bacilo de Hansen, não

tratada que o elimina para o meio exterior, contagiando pessoas suscetíveis. No entanto, para que a transmissão ocorra é necessário um contato direto com a pessoa doente não tratada. O aparecimento da doença na pessoa infectada pelo bacilo e suas diferentes manifestações clínicas dependem, dentre outros fatores, da relação bacilo/hospedeiro e pode ocorrer após um longo período de incubação, de 2 a 7 anos. Dentre as pessoas que adoecem, algumas apresentam resistência ao bacilo, constituindo os casos paucibacilares (PB) que abrigam uma pequena quantidade de bacilos no organismo, insuficiente para infectar outras pessoas, portanto, possuem baixa carga bacilar, não sendo consideradas fontes importantes de transmissão da doença. Um número menor de pessoas não apresenta resistência ao bacilo, que se multiplica no organismo passando a ser eliminado para o exterior, podendo infectar outras pessoas, constituindo casos multibacilares (MB), considerados a fonte de infecção e manutenção da cadeia epidemiológica da doença (OMS, 2002).

Quando ocorre a infecção pelo *M. leprae*, a resposta imune específica depende de fatores relacionados ao bacilo e ao hospedeiro. A resposta imune resistente e suscetível parece ser regulada por duas subpopulações de células T: Th1 e Th2. As células T que produzem Interleucina 2 (IL-2) e interferon γ (IFN- γ), chamadas de Th1, aumentam a imunidade mediada pelas células. O IFN- γ ativa o macrófago e a IL-2 estimula o crescimento de Células T antígeno-específicas, resultando em doença mais branda ou a cura. As células T que produzem Interleucina 4 (IL-4), Interleucina 5 (IL-5) e Interleucina 10 (IL-10), chamadas de Th2, aumentam a resposta humoral. A IL-4 estimula a produção de IgE e ambas. A IL-4 e IL-10 estimulam células B e inibem ativação de macrófago resultando em infecção progressiva. A abundância de IL-2 e IFN- γ em lesões tuberculóides (TT) deve

contribuir para o estado de imunidade resistente nesses pacientes. O IFN- γ aumenta a produção de reativos intermediários do oxigênio e nitrogênio levando à morte ou restrição de micobactérias e outros patógenos intracelulares. O IFN- γ aumenta também a expressão de HLA-DR (antígeno leucocitário humano de classe II, alelo DR) e molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), que facilitam a interação célula acessória – célula T. A IL-2 aumenta a produção de IFN- γ . A Interleucina 12 (IL-12) poderá dirigir a resposta das células T para um padrão de citocinas tipo 1, pois estimula células natural *killer* (NK) a liberar IFN- γ , o qual predispõe as células T em direção ao padrão Th1. IL-12 induz células T *naïve* a produzir citocinas Th1. Ao contrário das lesões tuberculóides (TT), citocinas do tipo 2 ou Th2, IL-4, IL-5 e IL-10 devem contribuir para a ineficácia da resposta imune e a falha de ativação do macrófago nesses indivíduos. Nas lesões lepromatosas (LL), a IL-4 está bastante aumentada quando comparada às lesões TT. A IL-4 pode contribuir para o aumento de anticorpos específicos contra o glicolípido – fenólico 1 (PGL-1) em pacientes LL e tem habilidade para estimular proliferação Th2. IL-4 pode levar ao aumento da proliferação bacteriana (GOULART, 2002).

No desenvolvimento da resposta imune logo após a entrada da micobactéria nos macrófagos, o próprio bacilo induz a produção de fator de necrose tumoral α (TNF- α) e fator transformador do crescimento-beta (TGF- β) pelos macrófagos infectados. De um lado, o TNF- α promove a ativação de macrófagos para a destruição intracelular do agente infeccioso e potencializa o efeito Th1, por outro lado TGF- β desativa macrófagos, aumenta a proliferação bacilar e contrapõe os efeitos de TNF- α , com predomínio de resposta Th2. Na hanseníase é possível

que haja dualidade e fatores outros que determinam a definição da predominância de resposta e, conseqüentemente, a forma clínica (YAMAMURA, 1991).

Dependendo da subpopulação de linfócitos T e da atividade macrofágica, haverá predominância de mecanismos de defesa ou disseminação da doença, expressos clinicamente pelas formas tuberculóide (TT) ou lepromatosa (LL). A presença de citocinas $TNF-\alpha$ e $IFN\gamma$ e os mediadores de oxidação como reativos intermediários do oxigênio (ROI) e do nitrogênio (RNI) são elementos fundamentais para destruição bacilar no interior do macrófago (FOSS, 1997; GOULART, 2002). A Figura 5 mostra os padrões de respostas na hanseníase.

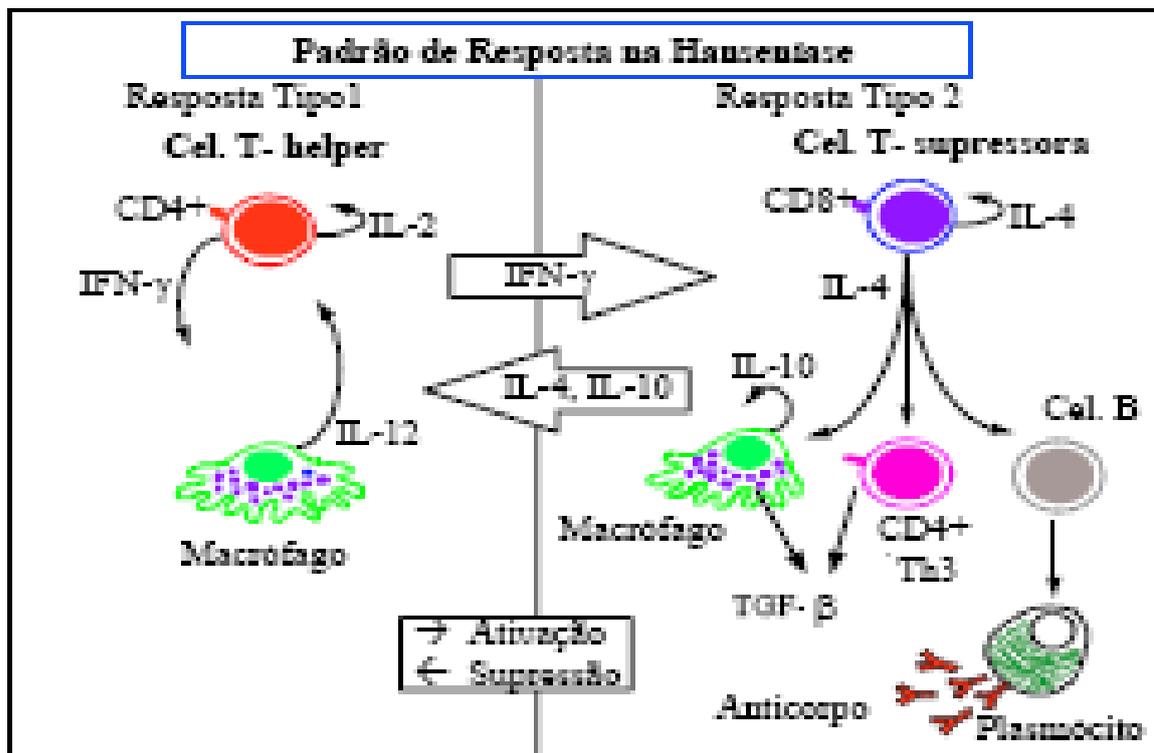


Figura 5 – Padrão de resposta na hanseníase.

Fonte: Goulart (2002).

O que poderá acontecer após a fagocitose do bacilo, sua destruição ou multiplicação, pode ser determinado por mecanismos imunológicos que envolvem a apresentação do complexo principal de histocompatibilidade (major histocompatibility complex – MHC) e pelo antígeno leucocitário humano (Human lymphocyte antigens - HLA), ambos herdados geneticamente. Os complexos HLA DR estariam associados à resistência à doença e HLA DQ à susceptibilidade (DE VRIES, 1991). Macrófagos procedentes de doentes da forma maligna da hanseníase, as formas Virchowiana ou Lepromatosa, possuem deficiência específica da capacidade de destruir o *M. leprae*, quando comparados com os procedentes de doentes da forma clínica benigna da hanseníase, a forma tuberculóide e indivíduos não doentes (GODAL, 1973).

A capacidade de resposta imune pode ser avaliada pela reação de Mitsuda ou Teste de Lepromin, que consiste na injeção intradérmica de suspensão de bacilos mortos pelo calor, cuja leitura é feita depois de quatro semanas. Com resultado positivo quando há formação de pápula infiltrada, observados valores mais altos de diâmetro nos pacientes paucibacilares quando comparados às formas multibacilares. A avaliação histológica da reação de Mitsuda mostra uma indicação do estado de reatividade do tecido ao antígeno do *M. leprae* e por isso é considerado um índice de resistência do paciente à doença. A composição morfológica e celular do infiltrado das lesões cutâneas na hanseníase depende da intensidade da imunidade mediada pelas células. A classificação histológica se baseia em seis critérios: Escore zero, infiltrado não inflamatório; Escore I, infiltrado mononuclear não granulomatoso; Escore II, infiltrado composto de células epiteliais escassas, sem formação granulomas; Escore III, granuloma tuberculóide incompleto com células epiteliais agregadas; Escore IV, granuloma tuberculóide

frouxo; Escore V, granuloma tuberculóide sem padrão nodular; e Escore VI, granuloma tuberculóide com padrão nodular (MAEDA, 2003).

A Tabela 4 demonstra a relação entre a leitura clínica da Reação de Mitsuda, análise histológica e níveis de anticorpos anti-PGL1 no soro de pacientes hansenianos.

Tabela 4 - Valor da média da leitura clínica da reação de Mitsuda (mm), análise histológica da reação de Mitsuda (escore) e níveis anti PGL-1 usando ELISA no soro de pacientes hansenianos. Os resultados estão expressos como a média \pm desvio padrão nos tipos clínicos da hanseníase (e controle para sorologia).

Classificação Hanseníase	Nº de pacientes	Leitura clínica (mm) \pm DP	Análise Histológica (escore) \pm DP	Sorologia Anti PGL-1
TT	10	12.05 \pm 5.96	4.10 \pm 1.29	74.10 \pm 60.86
BT	11	7.86 \pm 3.63	3.73 \pm 1.10	238.90 \pm 248.86
BB	5	3.40 \pm 2.19	1.80 \pm 0.45	806.80 \pm 430.69 ^b
BL + LL	18	1.50 \pm 1.50 ^a	0.94 \pm 1.51 ^a	914.39 \pm 374.39 ^a
Sorologia controle	38	-	-	38.42 \pm 41.72

^a diferença significativa do grupo BT e TT (P < 0.01), teste de Kruskal-Wallis.

^b diferença significativa do grupo TT.

Fonte: adaptado de Maeda (2003)

As manifestações clínicas da hanseníase são determinadas pela resposta imune celular do hospedeiro. Há um amplo espectro de resposta no hospedeiro para *M. leprae* o que pode ser evidenciado nos achados clínicos e histológicos. Quando a resposta imune celular não é induzida o paciente manifesta a forma lepromatosa com proliferação bacteriana, levando a uma infecção cutânea disseminada. Os estudos apontam que o baixo número de Células T nas lesões de hanseníase na forma lepromatosa é na maioria exclusivamente de células T CD8+, com poucas células T CD4+ presentes. Ao contrário, nos pacientes com forma tuberculóide, há

uma predominância de Células T CD4+ nas lesões, com a resposta imune celular, contribuindo para a defesa do hospedeiro e restringindo a proliferação de micobactérias, levando a uma forma branda da doença ou à cura (GOULART, 2002).

Associando-se o resultado dessa reação com a carga, pode-se avaliar a potencialidade da resposta imune pelo paciente. Dessa maneira, os pacientes suscetíveis, com menor resistência ao bacilo, apresentam carga bacilar elevada e Mitsuda negativo e os pacientes resistentes ao bacilo apresentam hiperreatividade imunológica (Mitsuda positivo) e carga bacilar negativa. Formas clínicas e imunológicas intermediárias nesses espectros podem apresentar um equilíbrio entre estes dois fatores (FOSS, 1997; GOULART, 2002).

A resposta humoral é inefetiva para eliminação dos bacilos e pode ser avaliada pela detecção de anticorpos específicos (Anti- PGL1), para o glicolípido fenólico da parede do *Mycobacterium leprae*, que não apresenta reação cruzada com outras micobactérias. Altas concentrações no sangue periférico estão relacionadas à acentuada carga bacilar, encontrada nas formas borderline lepromatosa (BL) e lepromatosa (L), diferente dos pacientes tuberculóides, que apresentaram títulos semelhantes aos controles sadios (ABULAFIA; VIGNALE, 2001; FOSS; 1997).

Em concomitância com estudos de PGL-1 no soro de pacientes, também os componentes de nervos periféricos vêm sendo considerados como alvos imunológicos. Gangliosídeos, importantes constituintes da membrana plasmática, são abundantes no sistema nervoso e anticorpos antigangliosídeos estão associados à

neuropatia. A presença de anticorpos antigangliosídeos pode ser importante no desencadeamento da neuropatia hansênica ou surgir em consequência do dano neural. O estudo desses anticorpos no soro dos pacientes hansênicos pode ajudar na monitorização do curso da doença (KRAHENBUHL; ADAMS, 1994).

1.3. CLASSIFICAÇÃO DA DOENÇA

A hanseníase apresenta um espectro de formas clínicas que dependem da interação do bacilo com a resposta imune do hospedeiro, traduzindo-se clinicamente por formas menos agressivas até as mais agressivas. Dentre as classificações, a mais utilizada em Saúde Pública é a classificação de Madrid, proposta durante o VI Congresso Internacional de Leprologia, realizado em Madrid, em 1953, baseada em quatro critérios: clínico, imunológico, histológico e bacteriológico. Essa classificação considera-se a doença em duas formas polares imunologicamente estáveis: hanseníase tuberculóide (HT) e hanseníase virchowiana (HV); e dois grupos imunologicamente instáveis: hanseníase indeterminada (HI) e hanseníase dimorfa (HD). (OMS e OPAS, 1989). Agrupa como forma paucibacilares as formas indeterminadas (MHI) e tuberculóide (MHT); e como multibacilares as formas dimorfa (MHD) e virchowiana (MHV) (DE MATOS, 2001). A figura 6 evidencia as formas clínicas da hanseníase.

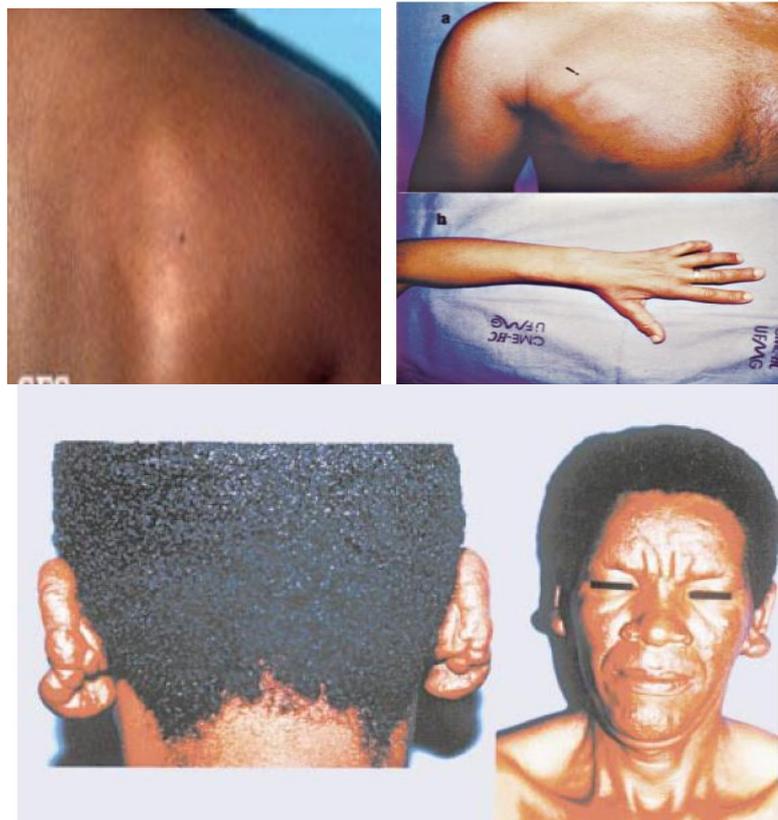


Figura 6 – Formas clínicas da hanseníase

Fonte: Revista de Medicina Tropical (2003).

Tendo em vista que a hanseníase não é estável em sua forma clínica, Ridley e Jopling (1966) propuseram uma classificação com um sistema de cinco grupos que expressavam a imunidade dos pacientes em: LL, BL, BB (lepromatoso, borderline lepromatoso e borderline), que são considerados como multibacilares; e BT e TT (borderline tuberculóide e tuberculóide) que são considerados como paucibacilares; além de uma forma clínica inicial, HI (indeterminada), que pode evoluir para quaisquer das formas anteriores (DE MATOS, 2001, SANTOS, 2001). A Figura 7 - Mostra o espectro clínico da hanseníase.

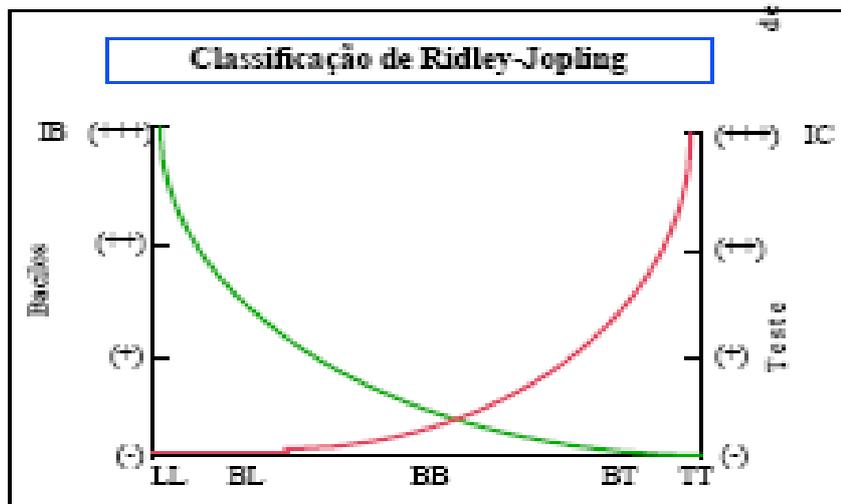


Figura 7 – Espectro clínico da hanseníase.

Fonte: Goulart (2002)

A forma clínica tuberculóide (TT) resulta em doença localizada, com vigorosa resposta celular, com poucos bacilos e lesões limitadas. Na forma clínica lepromatosa (LL) há uma suscetibilidade ao *M. leprae*, com a proliferação disseminada do bacilo resultando em lesões de pele difusas e doença grave, associada a uma potente resposta humoral. Nos pacientes borderline tuberculóide (BT), borderline-bordeline (BB) e borderline lepromatoso (BL) há uma redução progressiva da resposta imune celular, acompanhada por lesões de pele e nervos mais numerosas, com o aumento da carga bacilar e dos níveis de anticorpos. (GOULART, 2002).

Em 1982, a Organização Mundial de Saúde visando a uma praticidade no tratamento dos pacientes com a poliquimioterapia, propôs a classificação que se fundamenta nos aspectos clínicos por meio de lesões apresentadas pelo paciente. Assim, pacientes com baciloscopia positiva, com 6 ou mais lesões, serão

considerados multibacilares (hanseníase dimorfa e hanseníase virchowiana) e pacientes com baciloscopia negativa e número de lesões menor que 6 serão classificados como paucibacilares (Hanseníase Indeterminada e Hanseníase Tuberculóide) (WHO, 1982).

Ridley, em 1971, instituiu a classificação pelo índice baciloscópico, avaliando a densidade dos bacilos vivos e mortos nos esfregaços de lesões cutâneas, corados pelo método de Ziehl-Neelsen e tomando como base o número de bacilos vivos em um campo microscópico médio, através da objetiva de imersão em óleo, utilizando, para isso, uma escala logaritma de sua autoria (WHO, 2002).

Os indivíduos que apresentam sinais e/ou sintomas dermatoneurológicos compatíveis com a hanseníase realizam a baciloscopia de área suspeita. O material deve ser coletado de quatro sítios, segundo recomendações do Ministério da Saúde: lóbulo da orelha direita (OD), lóbulo da orelha esquerda (OE), cotovelos direito ou esquerdo e da lesão. Na inexistência de lesões cutâneas, coleta-se dos cotovelos direito e esquerdo. O material é corado pelo método de Ziehl-Neelsen. Este exame é de grande relevância para o tratamento da doença, haja vista que classifica os pacientes em multibacilares e paucibacilares. Assim, são considerados multibacilares as formas clínicas dimorfa e virchowiana, com índice baciloscópico diferente de zero em qualquer um dos sítios de coleta e paucibacilares, as formas clínicas indeterminada e tuberculóide, com índice baciloscópico igual a zero em qualquer dos sítios de coleta de material (OMS; OPAS, 1989).

1.3.1. DIAGNÓSTICO CLÍNICO E LABORATORIAL

A doença manifesta-se, inicialmente, através de lesões de pele: manchas esbranquiçadas ou avermelhadas com perda de sensibilidade, sem evidência de lesão nervosa troncular. Estas lesões de pele ocorrem em qualquer região do corpo, mas, com maior frequência, na face, orelhas, nádegas, braços, pernas e costas, podendo acometer também a mucosa nasal. Com a evolução da doença, manifestam-se as lesões nervosas, principalmente nos troncos periféricos. Podem aparecer nervos enfartados e doloridos, diminuição de sensibilidade nas áreas por eles inervadas, como olhos, mãos e pés, assim como redução da força muscular pelos nervos comprometidos. Essas lesões são responsáveis pelas incapacidades e deformidades características da hanseníase (WHO, 2002).

O diagnóstico da hanseníase é clínico e baseado na existência de um ou de três sinais cardinais (placas avermelhadas ou hipopigmentadas com perda de sensibilidade, espessamento dos nervos periféricos e bacilo álcool ácido resistente (AFB) nas manchas de pele ou no material de biópsia). A confiança desses sinais tem sido extensivamente revista (THE INTERNACIONAL LEPROSY ASSOCIATION TECHNICAL FORUM, 2002). Na Etiópia, o uso desses três critérios resultou em sensibilidade de 97% com um valor preditivo positivo de 98% para o diagnóstico da hanseníase. Em estudos de cortes em pacientes de Bangladeshi e Etiópia, 96% e 91% de pacientes com doença multibacilar e 86% e 76% daqueles com doença paucibacilar tinham alargamento de um ou mais nervos. Nas manchas de pele, a detecção do bacilo álcool ácido resistente intradérmico tem alta especificidade, mas baixa sensibilidade, devido a aproximadamente 70% de todos os pacientes

hansenianos apresentarem manchas negativas. Contudo, as manchas de pele são importantes, pois identificam a maioria dos pacientes infecciosos e aqueles com maiores riscos de reincidência (BRITON, 2004).

Embora 70% das lesões de pele da hanseníase tenham a sensibilidade reduzida, as 30% não-anestésicas ocorrem em pacientes com doença multibacilar, que são infecciosos possuem alto risco de desenvolvimento de incapacidades se comparados àqueles com doença paucibacilar (BRITTON, 2004).

Em parte, a identificação do *M. leprae* é difícil devido à inabilidade do bacilo para crescimento *in vitro*. O diagnóstico da hanseníase é baseado na detecção microscópica do bacilo álcool ácido resistente (BAAR) em esfregaço de tecido em combinação com a avaliação histopatológica e clínica. Mas, uma detecção confiável requer no mínimo 10^4 organismos por grama de tecido, o que leva à baixa sensibilidade, particularmente para pacientes no fim do espectro tuberculóide da hanseníase, quando os bacilos álcool ácido-resistentes são raros ou ausentes (DE ALMEIDA, 2004).

Os testes sorológicos e cutâneos atualmente disponíveis não apresentam sensibilidade e especificidade necessárias para servirem como métodos diagnósticos capazes de detectar e quantificar *M. Leprae* (DE WIT, 1991). Existe a possibilidade de que indivíduos sejam soropositivos, devido a uma infecção passada. Ao contrário, eles devem ser colonizados com o bacilo antes de a resposta imune ser disparada (DE WIT, 1993).

Anticorpos PGL-1, específico para o *Mycobacterium leprae*, estão presentes em 90% dos pacientes portadores da forma lepromatosa não tratados, mas somente 40-50% dos pacientes com doença paucibacilar e 1-5% de controles saudáveis (BRITTON, 2004).

Embora a terapia multidroga tenha sido bem sucedida em reduzir a prevalência da doença, o índice anual não tem declinado na maioria dos países onde a doença é altamente endêmica. Além disso, um número significativo de pacientes com hanseníase apresenta dano nervoso e incapacidades no momento do diagnóstico. Métodos confiáveis para a identificação de indivíduos subclínicamente infectados ou outros reservatórios potenciais para a propagação da doença e métodos para a detecção precoce de pacientes com hanseníase, antes que ocorram as incapacidades, ainda não estão disponíveis. Recentemente, um número de investigadores tem usado a reação em cadeia de polimerase (PCR) para ampliar várias seqüências genômicas do *M. leprae*, com o intuito de melhorar a detecção quando baixos números de bactérias estão presentes (KURABACHEW, 1998).

A reação em cadeia de polimerase (PCR) é uma técnica *in vitro*, a qual permite a amplificação de uma região específica do ácido desoxiribonucleico (DNA) que está entre duas regiões de seqüência conhecida de DNA (NEWTON; GRAHAN, 1994).

A reação em cadeia de polimerase (PCR), método molecular, apresenta posição de destaque dentre os exames de alta sensibilidade pela possibilidade de amplificar ou multiplicar fragmentos ou vestígios de DNA de células, inserindo as bacterianas, permitindo, desta forma, sua fácil detecção (SANTOS, 2007)

O método da PCR para a identificação do DNA, codifica proteínas do *M. leprae* de 65 kDa, 18 kDa e seqüências repetitivas do *M. leprae*, foi introduzido como sendo mais sensível e específico que a examinação do bacilo álcool-ácido resistente (DE ALMEIDA, 2004).

A introdução recente da reação em cadeia da polimerase (PCR) forneceu oportunidade sem precedentes para detecção específica, sensível e rápida do DNA do *Mycobacterium leprae* em espécimes clínicas. Estudos utilizando biópsias de pele de pacientes com hanseníase têm demonstrado que a técnica da PCR é capaz de aumentar a sensibilidade da detecção do bacilo, sugerindo vantagem da técnica quando comparada ao exame histopatológico e baciloscópico convencionais (MARTELLI, 2002).

O número de amostras clínicas que podem ser usadas para a detecção da *M. leprae*, através da PCR, tem se expandido e inclui linfa de pele, sangue, biópsia de pele e nervo e secreção nasal (SANTOS, 1999). Contudo, as ferramentas da PCR ainda não estão disponibilizadas completamente nas unidades básicas de saúde para detecção da bactéria em espécimes clínicos de pacientes hansenianos. Um estudo da PCR com espécimes de biópsias de pacientes hansenianos obteve resultado positivo em, aproximadamente, 61% de biópsias de pacientes hansenianos negativas para o bacilo álcool-ácido-resistente, indicando que a PCR é uma importante ferramenta para o diagnóstico laboratorial dessa doença (YOON, 1993).

A reação em cadeia de polimerase (PCR) para detecção de DNA do *M. leprae* em código de genes específicos ou seqüências repetidas é potencialmente sensível e específico, já que este detecta o DNA da bactéria em 95% de pacientes multibacilar e 55% de paucibacilar (BRITTON, 2004).

A PCR tem demonstrado sua aplicação para detecção específica de pequenos números de bacilos *Mycobacterium leprae* em espécimes biológicas (DE WIT, 1993).

A aplicação clínica da PCR para detecção do DNA dessa bactéria em biópsia da mucosa nasal em pacientes hansenianos não tratados e em seus contatos, em estudos realizados em Uberlândia, MG, Brasil, obteve uma sensibilidade de 69.2%, uma especificidade de 89.9% e uma acurácia de 82.8%, tendo demonstrado que o bacilo invade a mucosa, passando através do turbinato inferior nasal para alcançar o sangue periférico (PATROCÍNIO, 2005).

Indivíduos saudáveis em países endêmicos de hanseníase têm mostrado “swabs” nasais positivos para *M. leprae*, usando a PCR (SMITH, 2004).

Estudos apontam que a cavidade nasal de pacientes hansenianos está envolvida no transporte e propagação do bacilo, sendo o nariz considerado uma das prováveis portas de entrada do bacilo (DE WIT, 1993).

Nos países desenvolvidos, a técnica de PCR para detectar o DNA do *Mycobacterium leprae* tem sido utilizada para auxiliar diagnóstico de casos mais

difíceis. Contudo, o elevado custo e a sofisticada tecnologia empregada são entraves para sua incorporação no diagnóstico de rotina na hanseníase, permanecendo como um importante instrumento de pesquisa no auxílio da compreensão da epidemiologia da doença na comunidade (MARTELLI, 2002).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a sensibilidade da PCR na detecção de *Mycobacterium leprae* em “swab” nasal e “swab” da linfa do lóbulo da orelha de pacientes hansenianos;

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar qual o melhor método de extração de DNA para o diagnóstico por PCR;
- Verificar qual o melhor conservante para as amostras e observar o melhor primer (iniciador) para o diagnóstico por PCR;
- Comparar a sensibilidade da PCR com a baciloscopia e a histopatologia nas formas multibacilares e paucibacilares da hanseníase.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. TIPO DE ESTUDO

Foi realizado um estudo transversal para avaliar a sensibilidade do uso da PCR na detecção de *M. leprae* em espécimes de “swab” nasal e “swab” da linfa do lóbulo da orelha de pacientes hansenianos, nas diversas formas clínicas, segundo a classificação de Ridley e Jopling, comparando com a baciloscopia e histopatologia.

3.2. POPULAÇÃO DE ESTUDO

Foram coletadas amostras de 24 pacientes, atendidos no ambulatório do Núcleo de Medicina Tropical (NMT) da Universidade Federal do Pará (UFPA), em Belém e no Hospital Municipal de Itaituba, portadores das diversas formas clínicas da hanseníase, diagnosticados e classificados segundo os critérios clínicos e laboratoriais do Ministério da Saúde – Brasil, no período de maio de 2006 a agosto de 2007.

3.3. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos os pacientes com diagnóstico de hanseníase, idade a partir de 15 anos, de ambos os sexos, procedentes de todos os estados do Brasil, com reações hansênicas, virgens ou não de tratamento para a hanseníase,

portadores de outras doenças associadas e que concordaram em participar da pesquisa.

3.4. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos dos estudos os pacientes menores de 15 anos, diabéticos, doentes mentais, portadores de outras doenças neurológicas e grávidas.

3.5. COLETA E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS

Primeiramente os pacientes passaram por uma avaliação clínica, com vistas à análise da real necessidade de exames laboratoriais e moleculares para o tratamento da doença. Todos os indivíduos que participaram do estudo foram informados sobre a pesquisa, de maneira acessível, sendo solicitado assinatura de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice B), conforme rege a Resolução 196/96, do Conselho Nacional de Saúde, no sentido de possibilitar a coleta de material biológico e registros de seus prontuários.

Este trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do NMT da UFPA, sob o protocolo de Nº 10/2006 – CEP/NMT (Anexo A).

De cada paciente foram coletadas duas amostras de secreção nasal com o auxílio de “swabs” estéreis (CB Products Indústria Brasileira) esfregando suavemente várias vezes contra o segmento anterior da cavidade nasal. Após a colheita da secreção nasal, o final do “swab” foi cortado, sendo um “swab” imerso

em 400 µl de solução de LISE UM (1mg/ml de proteinase K em 100 mM de Tris-HCl, pH 8,5, 0,05% Tween 20) e refrigerado imediatamente. E o outro “swab” imerso em 400 µl de solução de LISE DOIS (10 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1 mM Tris, 1% SDS) e mantido em temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram transportadas ao laboratório de Biologia Molecular do NMT da UFPA, para análise.

Foram coletadas, ainda, de cada cliente duas amostras de linfa do lóbulo da orelha, com auxílio de “swabs” estéreis, após excisão local com bisturi para preparação de lâminas de rotina, com vistas à pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes. O tratamento, imersão e conservação dessas amostras seguiram a mesma metodologia descrita para os espécimes nasais.

De todos os pacientes estudados foram coletadas biópsias de lesões suspeitas, utilizando punch de nº 3 mm, para efeito de análise histopatológica e comparação com os resultados da PCR, obtidos nesta pesquisa. Esse procedimento foi realizado pelos acadêmicos do curso de Medicina da UFPA, sob a supervisão docente, e o material foi analisado no Laboratório Histopatológico do Núcleo de Medicina Tropical. O exame baciloscópico foi realizado no laboratório de análises clínicas do próprio Núcleo.

Também foram colhidas secreção nasal e linfa do lóbulo da orelha, de pacientes lepromatosos, com auxílio de “swabs” estéreis, utilizando os métodos descritos acima, com a finalidade de otimizar vários parâmetros para a reação de PCR.

3.5.1. Extração de DNA

Com o intuito de determinar qual o melhor método de extração de DNA para o diagnóstico por PCR, foram testados dois protocolos que denominaremos de tipo 1 e tipo 2 , conforme descritos a seguir.

Protocolo tipo 1

Os espécimes de secreção nasal e linfa do lóbulo da orelha, conservados em solução de Lise 1, foram incubados sob óleo mineral a 60 °C durante toda a noite e posteriormente submetidos a 97 °C por 15 minutos, para inativar a proteinase K, de acordo com Jadhav et al (2001). Em seguida, foram centrifugados por 10 segundos a 10.000 x g. Dois microlitos (2µl) da amostra foram usados em cada reação de PCR.

Protocolo tipo 2

Os espécimes de linfa do lóbulo da orelha e secreção nasal foram tratados com tampão de lise 2 (10 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1 mM Tris, 1% SDS). Foi adicionada à suspensão proteinase K (numa concentração final de 50 µg/ml), seguida de incubação a 42 °C durante 2 horas. O DNA foi obtido por meio de extração, utilizando o fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1), conforme Sambrook *et al.* (1989) e precipitado com 1/10 do seu volume pela adição de solução de acetato de sódio 3M, pH 7,0 e 2 ½ volumes de etanol absoluto gelado. Foi mantido a -20°C por 8 horas ou mais, e depois centrifugado a 10.000 x g por 10

minutos à temperatura ambiente. Todo o sobrenadante foi desprezado e o sedimento seco, depois suspenso em 30 µl de tampão TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0), mantido a 4°C até o momento do uso.

Tendo em vista que os ensaios com os protocolos acima referidos não demonstraram resultados satisfatórios na extração do DNA, foi utilizado o método do fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1), descrito por Sambrook *et al.* (1989), com modificações, denominado de **protocolo tipo 3**, abaixo especificado.

- 1) Retirar os “swabs” e centrifugar as amostras por menos de 1 minuto. Em seguida, adicionar a cada tubo o fenol tamponado e a mistura de clorofórmio - álcool - isoamílico 1:1 para o volume da amostra.
- 2) Agitar manualmente os tubos por 5 minutos.
- 3) Centrifugar a 5000 rotações por minuto (rpm), por 10 minutos. Retirar o sobrenadante e transferir para um microtubo de 1,5 ml, adicionar o fenol tamponado e a mistura de clorofórmio:álcool isoamílico 1:1 para o volume de sobrenadante.
- 4) Repetir as etapas 2 e 3 por duas vezes.
- 5) Adicionar a cada tubo, mistura de clorofórmio:álcool isoamílico 1:1 para o volume do sobrenadante.
- 6) Agitar manualmente os tubos por 5 minutos. Retirar o sobrenadante e transferir para um microtubo de 1,5 ml, adicionar solução de acetato de sódio 3M, pH 7,0, com 1/10 do seu volume e 2 ½ volumes de etanol absoluto gelado para o volume de sobrenadante.
- 7) Agitar manualmente os tubos e congelar a -20°C até a precipitação do etanol.
- 8) Descongelar as amostras em temperatura ambiente por 15 a 30 minutos.

- 9) Centrifugar a 13000 rpm, por 15 minutos.
- 10) Descartar o etanol por inversão, retirando o excesso em papel toalha.
- 11) Lavar o tubo com 500 μ l de etanol a 75%.
- 12) Agitar no vortex.
- 13) Centrifugar por 5 minutos a 13000 rpm.
- 14) Repetir as etapas 10, 11, 12 e 13 por três vezes.
- 15) Retirar o excesso de etanol com a pipeta e secar em estufa por 10 minutos, a 37°C.
- 16) Desprezar todo o sobrenadante e o sedimento seco suspenso em 30 μ l de tampão TE morno (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0).
- 17) Homogeneizar manualmente e levar ao banho maria úmido, à temperatura de 52°C, por 5 minutos.
- 18) Proteger os tubos com parafilme m e estocar a -20°C, até a amplificação por meio da reação em cadeia de polimerase.

3.5.2. Amplificação do DNA do *M. leprae* por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As amostras foram testadas com diferentes pares de iniciadores, descritos na literatura, preparados pela Invitrogen, conforme evidencia a tabela 5 a seguir.

Tabela 5- Designação dos iniciadores com suas seqüências e amplicons.

Designação Do iniciador	Seqüência	Amplicon	Referências
S13-S62	5' CTC CAC CTG GAC CGG CGA T 3' 5' GAC TAG CCT GCC AAG TCG 3'	531 pb	Hartskeerl <i>et al.</i> , 1989 De Wit <i>et al.</i> , 1993
R1-R2	5' CGG CCG GAT CCT CGA TGC AC 3' 5' GCA CGT AAG CTT GTC GGT GG 3'	372 pb	Woods & Cole, 1989, 1990
LP1-LP2	5' TGC ATG TCA TGG CCT TGA GG 3' 5' CAC CGA TAC CAG CGG CAG AA 3'	129 pb	Donoghue <i>et al.</i> , 2001

Cada reação de amplificação consistiu em um volume final de 25 µl contendo 2,5 U/µl de Taq DNA polimerase (GIBCO), 200 µM de cada dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂, 50 mM de KCl, 100 mM de Tris-HCl, pH 8,5, com 50 ηg dos oligonucleotídeos sintéticos (iniciadores) por reação e 2 µl de DNA extraído. Foram utilizados DNA de pacientes lepromatosos, como controle positivo, e água destilada, como controle negativo, em cada experimento.

As reações em cadeia de polimerase foram realizadas em termociclador (Eppendorf mastercycler personal), conforme as condições apresentadas, a seguir, para cada par de iniciadores.

Iniciadores S13 e S62 - 95°C por 3 minutos; seguido de 03 ciclos de 94°C por 2 minutos; 55°C por 2 minutos e 72°C por 3 minutos; e 30 ciclos de 94 °C por 1 min; 55 °C por 1 min e 72°C por 1 min. Iniciadores R1 e R2 - 95°C por 3 minutos;

seguido de 32 ciclos de 94°C por 1 minuto; 60°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto; e 72°C por 10 minutos. Para LP1 e LP2 - 95°C por 5 minutos, 58°C por 2 minutos e 72°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos; 58°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto; e 72°C por 10 minutos.

O produto de PCR foi fracionado em eletroforese horizontal em gel de agarose a 1%, em tampão TAE. O fragmento amplificado de DNA foi corado com 45µl de brometo de etídio (concentração final de 0,5 µg/ml) e as bandas visualizadas em transluminador de UV e registradas por captador de imagens.

3.6. ANÁLISE DOS DADOS

A análise estatística foi realizada utilizando o aplicativo BIOESTAT 3.0 (AYRES et al, 2004). Os resultados foram comprovados pelos seguintes testes: **TESTE Q DE COCHRAN** – para testar a probabilidade de resultados positivos em cada primer, nos diversos espécimes biológicos; **TESTE EXATO DE FISHER** - para identificar qual a forma clínica que apresentou mais resultados positivos, nas amostras de linfa do lóbulo da orelha e secreção nasal, com os iniciadores LP1 e LP2, conservadas em solução de Lise 1 e solução de Lise 2; **TESTE DE CORRELAÇÃO LINEAR DE PEARSON** - para medir o grau de dependência entre as variáveis: amostras da linfa do lóbulo da orelha e secreção nasal, conservadas em solução de Lise 1 e Lise 2, usando os iniciadores LP1 e LP2, e a correlação com a baciloscopia e histopatologia. A significância estatística adotada foi menor ou igual a 0,05 em todos os testes.

4. RESULTADOS

4.1. EXTRAÇÃO DO DNA EM ESPÉCIMES DE SECREÇÃO NASAL E LINFA DO LÓBULO DA ORELHA

Para a extração do DNA dos espécimes de secreção nasal e linfa do lóbulo da orelha, em solução de Lise um, foi utilizado o **protocolo tipo um**, método que mostrou resultados insatisfatórios.

Para os espécimes de linfa do lóbulo da orelha e secreção nasal, tratados com tampão de lise dois, adotou-se o **protocolo tipo dois**, com resultados, também, não eficazes, apresentando-se com várias bandas inespecíficas durante a visualização no transluminador UV.

Após os ensaios com os métodos acima referidos e sem sucessos na extração, amplificação e visualização das bandas de DNA foi utilizado o **Protocolo tipo três**. Vários testes foram realizados, no sentido de padronizar o método. Assim, esse protocolo se mostrou como o melhor método de extração de DNA nesta pesquisa.

4.2 RESULTADOS DA BACILOSCOPIA E HISTOPATOLOGIA

Dos vinte e quatro pacientes estudados, dezesseis foram classificados como multibacilares (MB) e oito como paucibacilares (PB). Comparando a classificação com os resultados da baciloscopia, seis dos pacientes MB apresentaram resultado positivo (25%) e dez resultado negativo (41,67) e todos os

oito paucibacilares tiveram resultado negativo (33,33%) (Tabela 6). Quanto à histopatologia, dos dezesseis pacientes multibacilares, dois obtiveram resultados positivos (8,33%) e quatorze com resultados negativos (58,34%) e dos oito paucibacilares, dois (25%) se mostraram positivos e seis negativos (25%), de acordo com a Tabela 6 e 7.

Tabela 6 – Resultados da baciloscopia em relação à classificação da doença

Classificação	Baciloscopia				Total	
	Positivo		Negativo		N	%
	N	%	N	%		
MB	06	25	10	41,67	16	66,67
PB	00	00	08	33,33	08	33,33
TOTAL	06	25	18	75	24	100

MB – multibacilar e PB - paucibacilar

Tabela 7 – Resultados da histopatologia em relação à classificação da doença

Classificação	Histopatologia				Total	
	Positivo		Negativo		N	%
	N	%	N	%		
MB	02	8,33	14	58,34	16	66,67
PB	02	8,33	06	25,00	08	33,33
TOTAL	04	16,66	16	83,33	24	100,00

MB – multibacilar e PB - paucibacilar

4.3. RESULTADO DA REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE

Os resultados evidenciaram que, dentre os marcadores LP1 e LP2, S13 e S62 e R1 e R2, usados no diagnóstico da PCR, em amostras de linfa do lóbulo da orelha e secreção nasal, conservadas em solução de **lise um**, os iniciadores LP1 e LP2 apresentaram maior positividade na PCR, por amplificarem um fragmento de DNA de 129pb. As amostras de secreção nasal demonstraram alta positividade nos resultados da PCR, com marcadores LP1 e LP2 ($p < 0.0000$), independentemente das formas PB e MB da doença. Assim, das vinte e quatro amostras, doze obteve resultado positivo (50%) e doze resultado negativo (50%). Os resultados da PCR, nos espécimes de linfa do lóbulo da orelha, também mostraram uma sensibilidade significativa ($P = 0.0224$), com o uso desses iniciadores, demonstrando que, das vinte e quatro amostras, seis foram positivas (25%) e dezoito negativas (75%). Diante do exposto, os estudos estatísticos afirmaram que a probabilidade de resultados positivos não é a mesma em cada primer, de acordo com a tabela 8.

Tabela 8 – Resultados da PCR em amostras clínicas, conservadas em solução de Lise 1, usando os iniciadores LP1 e LP2, S13 e S62 e R1 e R2.

Amostras	Classificação	Resultado PCR LP1/LP2	Resultado PCR S13/S62	Resultado PCR R1/R2	Significância estatística ^α
Linfa do lóbulo da orelha (24)	PB - 8	1/8	0/8	0/8	P=0.0224
	MB – 16	5/16	4/16	1/16	
Secreção nasal (24)	PB - 8	2/8	0/8	0/8	P< 0.0000
	MB – 16	10/16	2/16	0/16	

$\alpha = 0,05$ - Teste Q de Cochran – PB – paucibacilar e MB - multibacilar

No que diz respeito aos resultados da PCR, com os iniciadores LP1 e LP2, S13 e S62 e R1 e R2, em amostras de linfa do lóbulo da orelha e secreção nasal, conservadas em solução de **lise dois**, usados na reação, não houve diferenciação nos resultados entre os mesmos; a probabilidade de resultado positivo é a mesma em cada primer. Os resultados confirmaram, ainda, que a solução de lise dois não demonstrou funcionalidade, tanto em relação aos iniciadores, como, em quaisquer dos espécimes biológicos (Tabela 9).

Tabela 9 – Resultados da PCR em amostras clínicas, conservadas em solução de Lise 2, usando os iniciadores LP1e LP2, S13 e S62 e R1e R2.

Amostras	Formas clínicas	Resultado PCR LP1/LP2	Resultado PCR S13/S62	Resultado PCR R1/R2	Significância estatística^α
Linfa do lóbulo da orelha (24)	PB - 8	1/8	0/8	0/8	P= 1.0000
	MB - 16	1/16	0/16	0/16	
Secreção Nasal (24)	PB - 8	0/8	0/8	0/8	P= 1.0000
	MB - 16	1/16	0/16	0/16	

$\alpha = 0.05$ - Teste Q de Cochran – PB – paucibacilar e MB - multibacilar

Para verificação da melhor positividade da PCR nas amostras clínicas da linfa do lóbulo da orelha e secreção nasal, conservadas em solução de lise um, com os primers LP1 e LP2, foi utilizado o Teste Exato de Fisher que considerou os resultados não significativos, ou seja, a probabilidade de resultado positivo é a mesma em ambas as formas clínicas. Os resultados evidenciaram que a solução de Lise um apresentou a mesma funcionalidade na conservação das referidas amostras independente das formas multibacilares e paucibacilares, conforme descrito na Tabela 10.

Tabela 10 – Resultados da PCR, nas amostras clínicas de Secreção Nasal e Linfa do Lóbulo da Orelha, conservadas em solução de Lise 1, com primers LP1 e LP2.

Amostras	Categoria Clínica	Lise 1	Significância estatística ^α
Secreção Nasal (24)	PB – 8	2/8	P=0.1930
	MB – 16	10/16	
Linfa do lóbulo da orelha (24)	PB - 8	1/8	P=0.1189
	MB – 16	5/16	

$\alpha = 0,05$ - Teste Exato de Fisher - PB – paucibacilar e MB - multibacilar

Foi verificada, também, a positividade da PCR nas amostras clínicas da linfa do lóbulo da orelha e secreção nasal, conservadas em solução de lise dois, com os primers LP1 e LP2, o **Teste Exato de Fisher** indicou que a probabilidade de resultado positivo, com esse conservante, é a mesma em ambas as formas clínicas. A solução de Lise dois não demonstrou funcionalidade para a conservação das referidas amostras, provavelmente interferindo nos resultados da PCR (Tabela 11).

Tabela 11 – Resultados da PCR, em amostras clínicas da secreção nasal e linfa do lóbulo da orelha, conservadas em solução de Lise 2, com primer LP1 e LP2.

Amostras	Classificação	Lise 2	Significância estatística ^α
Secreção Nasal (24)	PB – 8	0/8	P=1.0000
	MB – 16	1/16	
Linfa do lóbulo da orelha (24)	PB - 8	1/8	P=1.0000
	MB – 16	1/16	

$\alpha = 0.05$ - Teste Exato de Fisher - PB – paucibacilar e MB - multibacilar

Com relação aos conservantes de solução de lise um e lise dois, usando os primers LP1 e LP2, os estudos demonstraram que os resultados da PCR foram altamente significantes em amostras de secreção nasal ($p < 0.0000$) e significantes nos espécimes da linfa do lóbulo da orelha ($P = 0.0224$), quando amostras foram

conservadas em lise um. Com relação à solução de lise dois, os resultados apontaram uma funcionalidade não significativa ($p=1.0000$), tanto nas amostras de secreção nasal, como nos espécimes linfa do lóbulo da orelha. Diante do exposto, os resultados confirmaram que a solução de lise um apresentou maior positividade nos resultados da PCR, quando comparada com a solução de lise dois, usando os iniciadores LP1 e LP2, independente dos espécimes biológicos e classificação operacional da doença (Tabela 12).

Tabela 12 – Positividade dos resultados da PCR, em espécimes de secreção nasal e linfa do lóbulo da orelha, com iniciadores LP1 e LP2, conservadas em solução de lise 1 e 2.

Amostras	Classificação	Lise 1	Lise 2	Significância estatística ^α	
				Lise 1	Lise 2
Secreção Nasal (24)	PB – 8	2/8	0/8	P<0.0000	P=1.0000
	MB – 16	10/16	1/16		
Linfa do lóbulo da orelha (24)	PB – 8	1/8	1/8	P=0.0224	P=1.0000
	MB – 16	5/16	1/16		

$\alpha = 0,05$ - Teste Q de Cochran - PB – paucibacilar e MB - multibacilar

Comparando os resultados da PCR, nas condições abaixo especificadas, com a baciloscopia e histopatologia, os estudos apontaram que a PCR, em amostras de secreção nasal, obteve maior sensibilidade para as formas multibacilares (41,67%), seguida de baciloscopia (25%) e histopatologia (8,33%). Nas formas paucibacilares, a sensibilidade foi considerada a mesma entre a PCR e Histopatologia (8,33%). A baciloscopia não apresentou sensibilidade (0%).

Na amostras da linfa do lóbulo da orelha, a baciloscopia demonstrou maior sensibilidade para as formas multibacilares (25%), seguido da PCR (20,83%)

e histopatologia (16,7%). Quanto às formas paucibacilares, a PCR e histopatologia apresentaram a mesma sensibilidade (4,17%). Não houve sensibilidade na baciloscopia (0%).

Tabela 13 – Comparação da sensibilidade da PCR com a baciloscopia, histopatologia e classificação, em amostras imersas em solução de lise 1, usando Iniciadores Lp1/Lp2.

Amostras	Formas	Resultado PCR + LP1/LP2		Baciloscopia +		Histopatologia +	
		N	%	N	%	N	%
Linha do lóbulo da orelha (24)	PB - 8	1/8	4,17	0/8	0,0	1/8	4,17
	MB - 16	5/16	20,83	6/16	25	4/16	16,7
Secreção Nasal (24)	PB - 8	2/8	8,33	0/8	0,0	2/8	8,33
	MB - 16	10/16	41,67	6/16	25	2/16	8,33

Para medir o grau de dependência entre os resultados da PCR, usando os primers Lp1 e Lp2, nas amostras clínicas de secreção nasal, conservadas em solução de lise um e a baciloscopia, foi aplicado o Teste de Correlação Linear de Pearson que considerou não significativa a correlação entre os resultados da PCR e a baciloscopia, nas condições acima referidas ($r = 0,3849$ e $p = 0,0632$). Essa correlação, ainda, se encontra representada na Figura 8.

Tabela 14 – Correlação entre os resultados das amostras clínicas de secreção nasal, conservadas em lise 1, e a baciloscopia, com Iniciadores LP1 e LP2.

Amostras	Formas clínicas	Resultado PCR LP1/LP2	Baciloscopia
Secreção Nasal (24)	PB - 8	2/8	0/8
	MB - 16	10/16	6/16

Teste de Pearson - r (Pearson)= 0,3849 e $p=0,0632$.

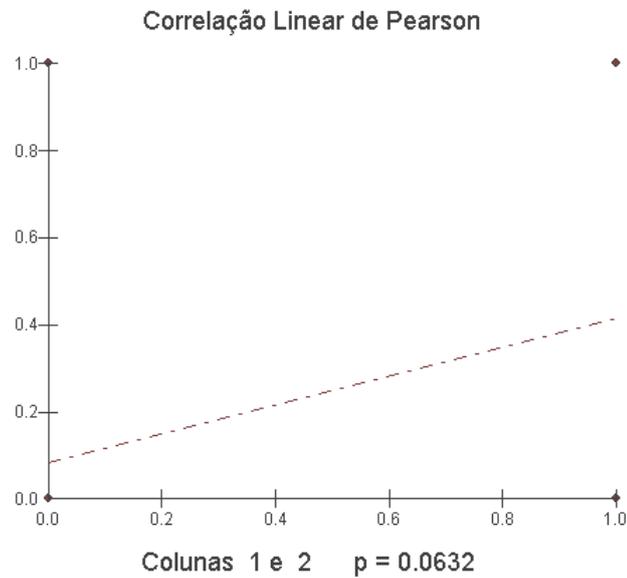


Figura 8 – Representação da correlação entre as amostras clínicas da secreção nasal, conservadas em solução de Lise 1 e a baciloscopia, com primer LP1 e LP2.

Para verificação da correlação entre os resultados da PCR, usando os primers LP1 e LP2, em amostras biológicas de secreção nasal, conservadas em solução de lise um e a histopatologia, foi usado o Teste de Correlação Linear de Pearson que considerou significativa a correlação entre os resultados da PCR e a histopatologia ($r = 0.4471$ e $p = 0,0284$), nas condições supramencionadas. Essa correlação está, também, evidenciada na Figura 9.

Tabela 15 – Correlação entre as amostras clínicas de secreção nasal, conservadas em lise 1, e a histopatologia, com Iniciadores LP1 e LPp2 - Belém

Amostras	Classificação	Resultado PCR LP1/LP2	Histopatologia	Significância estatística
Secreção Nasal (24)	PB - 8	2/8	2/8	P= 0.0284
	MB - 16	10/16	2/16	

Teste de Pearson - r (Pearson)= 0.4471 e $p= 0.0284$.

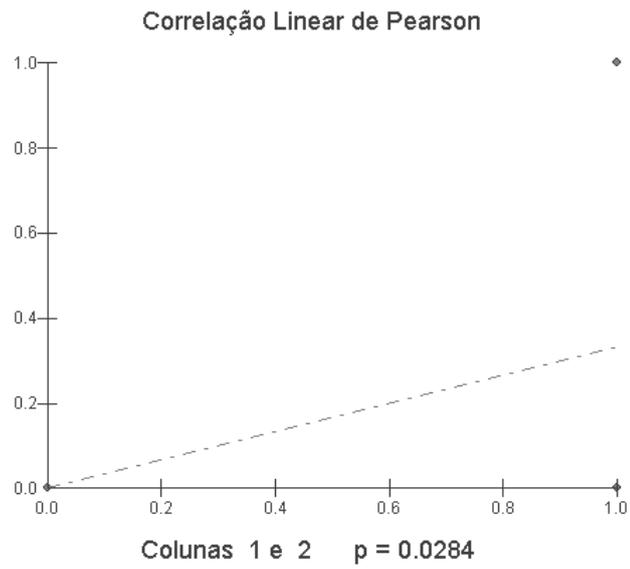


Figura 9 – Correlação entre as amostras clínicas da secreção nasal, conservadas em solução de Lise 1 e a histopatologia, com primer LP1 e LP2.

5 DISCUSSÃO

A identificação do *M. leprae* é, em parte, difícil devido à inabilidade do crescimento do bacilo *in vitro*. O diagnóstico da hanseníase é baseado na detecção microscópica do bacilo álcool-ácido-resistente em lesões de pele, em combinação com o histopatológico e avaliação clínica. Contudo, a baciloscopia apresenta uma baixa sensibilidade, devido requerer no mínimo 10^4 organismos por grama de tecido, especialmente, em pacientes paucibacilares (ALMEIDA, 2004). O estudo em questão apontou que a baciloscopia apresentou maior sensibilidade nas formas multibacilares, do que nas paucibacilares, independente das amostras clínicas, tipos de conservantes e temperatura, conforme mencionadas na metodologia. Com relação à histopatologia, os resultados demonstraram a mesma sensibilidade, usando as mesmas condições para a baciloscopia.

As lesões de pele são consideradas um dos sinais cardinais da hanseníase e, em associação com o exame clínico, seria o diagnóstico “padrão ouro” para a hanseníase. Entretanto, a sensibilidade das lesões isoladas é baixa. Recentemente, diversas pesquisas têm analisado a amplificação do DNA, por meio da PCR, para amplificação de várias seqüências genômicas do *M. leprae* para elevar a detecção, nos casos de baixa carga bacilar. Assim, o método da PCR para identificação do DNA foi introduzido como um método de diagnóstico que apresenta maior sensibilidade e especificidade do que a baciloscopia (ALMEIDA, 2004).

Para a extração do DNA das amostras de secreção nasal e linfa do lóbulo da orelha, independente do conservante e da temperatura adotados nos estudos, foi utilizado o método do fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1), descrito por Sambrook *et al.* (1989), com modificações. Vários ensaios foram necessários, com o intuito de padronizar o método.

Atualmente, vários pesquisadores têm estudado o uso da PCR para a detecção do *M. leprae*, usando primers oligonucleotídeos para direcionar a replicação (amplificação) de uma seqüência alvo particular do DNA da bactéria, com vistas ao nível de detecção (PLIKAYTIS *et al.*, 1990). Assim sendo, vários primers foram descritos na literatura como: **S13-S62** (HARTSKEERL *et al.*, 1989); DE WIT *et al.*, (1993), **R1-R2** (WOODS; COLE, 1989, 1990) e **LP1-LP2** (DONOGHUE *et al.*, 2001).

Nesta pesquisa, as amostras foram testadas com esses três pares de iniciadores, com o objetivo de verificar suas eficiências na detecção do *M. leprae*. Assim, os resultados evidenciaram que os primers **LP1 e LP2**, usados no diagnóstico da PCR, em amostras de linfa do lóbulo da orelha e secreção nasal, conservadas em solução de lise um, em temperatura – 20 °C, apresentaram maior positividade, sendo essa intensificada nas amostras de secreção nasal, onde o **teste Q de Cochran** registrou alta positividade ($P < 0.0000$), independente da classificação das categorias paucibacilares e multibacilares. Conforme a literatura, a rota da infecção da hanseníase permanece ainda desconhecida, embora diversos estudos apontem a via nasal como a porta de entrada e saída da bactéria (GROATHOUSE *et al.*, 2004).

Estudos revelaram um valor potencial dos testes de diagnóstico da PCR em biópsias de mucosa nasal de pacientes e seus contatos. A identificação do ponto inicial da infecção seria o mais difícil e importante no estudo da transmissão do *M. leprae*. O PCR demonstra ser um método de diagnóstico promissor na mensuração da infecção subclínica. Provavelmente, um número de indivíduos infectados definidos como não assintomáticos existe e devem ter função ativa na transmissão da doença (PATROCÍNIO *et al*, 2005). Essa proposição foi visualizada nos resultados obtidos neste estudo, no momento em que foi revelada alta positividade nas amostras de secreção nasal ($P < 0.0000$).

Vários estudos são unânimes em confirmar a presença de bacilos no muco nasal, considerando de valor diagnóstico o exame deste, bem como profilático associado com o exame clínico e a pesquisa de bacilos nas lesões cutâneas. Foi encontrada elevada porcentagem de positividade nos doentes Lepromatosos e Bordeline, havendo a necessidade de exames repetidos, haja vista que estes podem se apresentar por vezes negativos (MARTINS *et al*, 2005). Nas amostras da linfa do lóbulo da orelha, esses iniciadores apresentaram, também, uma positividade significativa ($P = 0,0224$). Os estudos confirmaram que os iniciadores LP1 e LP2 demonstraram maior sensibilidade do que os comumente usados e descritos por HARTSKEERL *et al* (1989) e WOODS; COLE (1989,1990) provavelmente por amplificar uma menor seqüência de pares de bases. Assim, tornam-se mais bem sucedidos na amplificação de DNA danificado e fragmentado, ou seja, esses primers apresentam maior sensibilidade na detecção do DNA de *M. leprae*, em amostras nas quais a qualidade e quantidade de DNA residual são

consideravelmente baixas, sendo a aplicação mais apropriada para estudos com pacientes hansenianos tratados. (DONOGHUE *et al*, 2001). Os estudos apontaram, ainda, que a probabilidade de resultados positivos, na PCR, não é a mesma em cada primer.

Nestes estudos, os resultados da PCR revelaram que o número de casos positivos é maior nas formas multibacilares do que nas formas paucibacilares, expressando maior carga bacilar nas formas MB do que nas PB. Entretanto, considerando que os tipos PB carregam poucos organismos que nenhum desses casos seria detectado por exame microscópico, os 36.4% de positividade da PCR se tornou mais significativo, mostrando claramente uma vantagem em torno da exame microscópico (WICHTTWECHKARN *et al*, 1995). Nesta pesquisa, os resultados foram concordantes com o autor referido, confirmando que as formas multibacilares apresentam maior positividade para a PCR (20,83%) do que as formas paucibacilares (4,16%), contudo, a PCR conseguiu identificar o DNA do *M. leprae* em dois dos oito pacientes paucibacilares.

Vários estudos, na literatura, têm usado o tampão de LISE UM, descrito por De Wit *et al*, 1991, para a conservação de diversas amostras biológicas, na detecção de *M. leprae*, pela PCR, demonstrando sensibilidade significativa nos resultados. Assim, neste trabalho, os resultados revelaram que a solução de Lise um evidenciou maior positividade nos resultados da PCR, com os iniciadores LP1 e LP2, independente da classificação operacional da hanseníase e amostras clínicas.

Os resultados confirmaram, também, que a solução de lise dois, usada para a conservação das amostras clínicas, não demonstrou funcionalidade nos resultados da PCR, provavelmente pela interferência de fatores, como, tempo de espera para análise e a conservação em temperatura ambiente; não alcançando, dessa forma, o objetivo almejado de sua aplicação em pesquisas de campo.

Neste estudo, foi medida a correlação entre os resultados da PCR, em amostras de secreção nasal, conservadas em solução de lise um, usando os primers LP1 e LP2 e a baciloscopia. Para tal, foi aplicado do Teste de Correlação Linear de Pearson que considerou não significativa a correlação, ou seja, os resultados da PCR não apresentaram grau de dependência com a baciloscopia ($r=0.3849$ e $p=0.0632$). Segundo os autores Andrade e colaboradores (1996), se a baciloscopia fosse o único critério para a classificação dos pacientes, 20% dos casos MBs seriam considerados como PBs. A baciloscopia mostra-se negativa (IB=0) nas formas tuberculóide e indeterminada, fortemente positiva na forma virchowiana e revela resultado variável na forma dimorfa (ARAÚJO, 2003).

Estudos confirmam que dos 10,4% dos pacientes multibacilares são classificados pela baciloscopia como paucibacilares. Esse erro na classificação dos pacientes conduziria a um tratamento inadequado, aumentando o risco de recidivas e o período em que o paciente se mantém como fonte de infecção. Por outro lado, dos pacientes definidos como paucibacilares pela baciloscopia, 16,2% eram multibacilares, sendo submetidos desnecessariamente a tratamentos que provavelmente poderiam levar a efeitos adversos graves e a elevação dos gastos nos serviços de saúde, bem como, sobrecarga para a equipe de monitoramento desses pacientes (GALLO *et al*, 2003).

O mesmo teste foi utilizado para medir a correlação entre os resultados da PCR e a histopatologia, em amostras de secreção nasal, nas mesmas condições acima descritas. Os resultados confirmaram que houve uma significativa correlação entre os resultados ($r=0.4471$

e $p=0.0284$). Os achados de *M. leprae* são cruciais para a confirmação do diagnóstico precoce da hanseníase, assim, foi sugerido que os estudos da PCR, para detecção do bacilo, seja feito, tanto quanto possível, em conjunto com o exame histopatológico (JOB *et al*, 1997).

Durante os estudos a PCR não demonstrou ser o método mais eficaz para identificação do *M. leprae*. Como perspectivas, outras pesquisas, incluindo novos marcadores e conservantes, seriam necessárias para elevar a sensibilidade desse método, com o intuito de monitorar o tratamento e à cura dos pacientes hansenianos, evitando, assim, a utilização de outros métodos de diagnósticos invasivos para o controle dessa doença.

6. CONCLUSÃO

- O estudo constatou que, o melhor método de extração de DNA, em amostras de linfa do lóbulo da orelha e secreção nasal foi do fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1), descrito por Sambrook et al. (1989), com modificações, conforme protocolo descrito neste trabalho.
- **Dentre os primers usados na PCR, os iniciadores LP1 e LP2, expressaram maior sensibilidade, tanto para os espécimes de secreção nasal, como para as amostras de linfa do lóbulo da orelha, com o conservante de lise um.**
- **As amostras de secreção nasal evidenciaram uma positividade altamente significativa ($p < 0.0000$), independente das formas multibacilares e paucibacilares da doença, sendo, também, observada uma sensibilidade significativa ($p = 0.0000$) com as amostras de linfa do lóbulo da orelha.**
- No que diz respeito à positividade da PCR nas amostras clínicas da linfa do lóbulo da orelha e secreção nasal, usando os primers LP1 e LP2, conservadas em lise dois, o estudo demonstrou que a probabilidade de resultado positivo, com esse conservante, é a mesma nas formas clínicas estudadas.
- Quanto à funcionalidade dos conservantes de lise um e lise dois, com primers LP1 e LP2, os resultados da PCR, com solução de lise um, foram

altamente significantes em amostras de secreção nasal e significantes nos espécimes da linfa do lóbulo da orelha.

- A solução de lise dois expressou uma funcionalidade não significativa nas diversas amostras clínicas estudadas. Os resultados apontaram que a solução de lise um demonstrou maior positividade na PCR, com os iniciadores LP1 e LP2, independente das classificações clínicas e amostras biológicas.
- **A PCR, em amostras de secreção nasal, conservadas em solução de lise um, com os primers LP1 e LP2, obteve maior sensibilidade (41,67%), para as formas multibacilares, seguido da baciloscopia (25%) e histopatologia (8,33%). Em amostras da linfa do lóbulo da orelha, nas formas multibacilares, a baciloscopia revelou maior sensibilidade (25%), seguido da PCR (20,83%) e histopatologia (16,7%).**
- **Em amostras de secreção nasal, nas formas paucibacilares, a PCR, usando o mesmo primer e conservante acima mencionado, demonstrou sensibilidade equivalente à histopatologia (8,33%); a baciloscopia não apresentou sensibilidade (0%). Resultados semelhantes foram obtidos em amostras da linfa do lóbulo da orelha, em formas paucibacilares, onde a PCR e histopatologia apresentaram a mesma sensibilidade (4,17%); a baciloscopia não revelou eficácia (0%).**
- **A solução de lise um, mantida sob refrigeração, apresentou-se como a melhor forma de conservação dos espécimes, tanto de secreção nasal como da linfa do lóbulo da orelha, nos estudos moleculares.**

- Houve uma correlação não significativa entre os resultados da PCR, usando os primers LP1 e LP2, nas amostras clínicas de secreção nasal, conservadas em solução de lise um e a baciloscopia e uma significativa correlação entre os resultados da PCR e a histopatologia.

- Nas amostras de linfa do lóbulo da orelha, a baciloscopia se mostrou mais sensível para as formas multibacilares, enquanto que a histopatologia demonstrou melhores resultados para as formas paucibacilares.

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

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

ANDRADE, V.L.G; MOREIRA, T.A; AVELLEIRA, J.C.R; MARQUES, A.B; BAYONA, M. **Paucibacilar ou Multibacilar? Uma Contribuição para os Serviços de Saúde.** Hansen Int. 1996; 21(2):6-13.

ARAUJO, M.G. **Hanseníase no Brasil.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Uberaba, v.36, n.3, 2003.

AYRES, M; AYRES, M.J; AYRES, D.L; SANTOS, A.S. Bio Estat 3.0 - **Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas.** Sociedade Civil Mamirauá. MCT - CNPq, 2004.

BRITTON, W. J; LOCKWOOD D.N.J. **Leprosy.** The Lancet. 2004. v. 363, p. 1209-1219.

DE 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 Polymerase Chain Reaction in the Blood and Nasal *Mycobacterium leprae* Secretion of Brazilian Household Contacts.** Mem Inst

Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. 2004. 99(5):509-512.

DE MATOS HJ; DUPPRE, N; ALVIM, M. F. S; VIEIRA, L. M. M; SARNO, E. N; STRUCHINER, C. J. **Leprosy epidemiology in a cohort of household contacts in Rio de Janeiro (1987-1991)**. Caderno de Saúde Pública. 2001. 15:533-542.

DE VRIES, R.R. **Genetic control of immunopathology induced by *M. leprae***. Am. J. Trop. Hyg. 1991. v.44, p.12-16.

DE WIT, M. Y.L; DOUGLAS J.T; McFADDEN J; KLASTSER P.R. **Polymerase Chain Reaction for the Detection of *Mycobacterium leprae* in Nasal Swab Specimens**. Journal of Clinical Microbiology. 1993.

DE WIT, M.Y.L; FABER W.R; KRIEG, S.R; DOUGLAS, J.T LUCAS, S.B; ASUWAT, N.M; PATTYN, S.R; HUSSAIN, R; PONNIGHAUS, J.M; HARTSKEERL, R. A; KLASTSER, P.R. **Application of a Polymerase Chain Reaction for the detection of *Mycobacterium leprae* in Skin Tissues**. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 29, 1991.

DONOGHUE, HOLTON J; SPIGELMAN M. **PCR primers that can detect low levels of *Mycobacterium leprae* DNA**. J. Med. Microbiol, 2001. Vol. 50, p. 177-182.

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

GALLO, M.E.N; JÚNIOR, L.A.N.R; ALBUQUERQUE, E.C.A; NERY, J.A.C; SALES, A.M. **Alocação do paciente hanseniano na poliquimioterapia: correlação da classificação baseada no número de lesões cutâneas com os exames baciloscópicos.** Ver. Brás. Dermatol, Rio de Janeiro, 78(4): 415-424. 2003.

GODAL T; SAMUEL R.D; MYRVANG, B; SONG, Y.R. **Characterization of the cellular immune defect in lepromatous leprosy: a specific lack of circulating mycobacterium leprae-reactive lymphocytes.** Clin. Exp. Immunol. Oxford, v. 9, 1973.

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

GOULART, I.M.B; PENNA, G.O; CUNHA, G. **Imunopatologia da hanseníase: a complexidade da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2002. v.35, p.365-375.

GROATHOUSE, NA; RIVOIRE B; KIM K; LEE H; CHO S-N; BRENNAN P. J; VISSA V.D. **Multiple Polymorphic Loci for Molecular Typing of Strains of *Mycobacterium leprae*.** Journal of Clinical Microbiology. 2004. P 1666-1672.

HARTSKEERL, R.A; DE WIT, M.Y.L; KLATSER, P.R. 1989. **Polymerase Chain Reaction for the Detection of *Mycobacterium leprae*.** J. Gen. Microbiol. 135:2357-2364.

HASTINGS, R.C; GILLS,TP; KRAHENBUHL, J.L; FRANZBLAU, S.G. **Leprosy**. Clinical Microbiology reviews. 1988. P 330-348.

JOB, C.K, V. DRAIN, D.L. WILLIAMS, GILLIS, T. P. **Comparison of polymerase chain detection technique with other methods for detection of M. leprae in tissues of wild ninebanded armadillos**. Lepr. Rev. 1991. v. 62, p.362-373.

JOB, C.K.. **Nasal mucosa and abraded skin are the two routes of entry of M. leprae**. Star. 49 (3):1. 1990.

JOB, C.K; JAYAKUMAR, j; WILLIAMS D. L; GILLIS, T.P. **Role of Polymerase Chain Reaction in the Diagnosis of Early**. Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis. 1997. 65(4); 461-4.

JADHAV,R.S. MACDONALD,M; BRUNE, G;OSKAM,L. **MILEP2 Study Group. Simplified PCR detection method for nasal Mycobacterium leprae**. Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis. 69 (2001)299-307.

KATOCH V. M. **Advances in the diagnosis and treatment of leprosy**. Exp. Rev. Mol. Med. 2002. disponível em : <http://www.expertreviews.org/02004763h.htm>.

KRAHENBUHL, J; ADAMS, B. **The role of the macrophage in resistance to the leprosy bacillus**. Immunology Series. 1994. 60: 281-302.

KURABACHEW, M; WONDIMU,A; RYON,J.J. **Reverse Transcription-PCR Detection of mycobacterium leprae in Clinical Specimens.** Journal of Clinical Microbiology. 1998, p. 1352-1356.

MAEDA M. S; ROTTA, O; MICHALANY, N.S; CAMARGO, Z.P; SUNDERKOTTER,C; YAMASHITA, J.T. **Comparison between anti-PGL-1 serology and Mitsuda reaction: clinical reading, microscopic findings and immunohistochemical analisis.** Lepr Rev. 2003. v.74, p. 263-274.

MARTELLI C.M.T; STEFANI, M.M DE; PENNA, G.O; ANDRADE A.L.S.S.de. **Endemias e epidemias brasileiras, desafios e perspectivas de investigação científica: hanseníase.** Rev. Bras. Epidem. v. 5. 2002.

MARTINS, A.C.C; CASTRO,J.C; MOREIRA,S.M. **Estudo retrospectivo de dez anos de endoscopia das cavidades nasais de pacientes com hanseníase.** Revista Brasileira de Otorrinolaringologia. V.71, n.5, 609-16. 2005.

MCDERMOTT-LANCASTER, R.D, and A.C. MC-DOUGALL. **Mode of transmission and histology of M. leprae infection in nude mice.** Int. J. Exp. Pathol. 1990. V. 71, p. 689-700.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia para o Controle da hanseníase.** Brasília (DF), 2002.

NEWTON, C.R; GRAHAM, A. **PCR.** BIOS Scientific Publishers Limited, 1994.

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

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

PATROCINIO, L.G; GOULART, I.M.B; GOULART, L.R; PATROCÍNIO, J.A; FERREIRA, F.R; FLEURY, R.N. **Detection Of M. Leprae In Nasal Mucosa Biopsies By The Polymerase Chain Reaction**. Sciencedirect – FEMS – Immunology and medical Microbiology, v. 44, Issue 3. 2005. p. 311-316.

PLIKAYTIS, B.B; GELBER,R.H; SHINNICK, T.M. **Rapid and Sensitive Detection of Mycobacterium leprae Using a Nested-primer Gene Amplification Assay**. J. Clin. Microbiol. 1990. 28:1913-1917.

REPORT OF THE INTERNATIONAL LEPROSY ASSOCIATION TECHNICAL FORUM. Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis. v. 70. 2002: p.1-62.

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

SAMBROOK, J., Frisch, E. F & Maniatis, T. **Molecular Clonig: A Laboratory Manual** (Cold Spring Harbor laboratory, new York, 1989).

SANTOS A.R; BALASSIANO, V; OLIVEIRA, M. L. W; PEREIRA, M. A. da S; SANTOS, P. B, DEGRAVE, W. M; SUFFYS, P. N. **Detection of Mycobacterium**

***leprae* DNA by Polymerase Chain Reaction in the Blood of Individuals, Eight years after completion of anti-leprosy therapy.** Mem Inst Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. 2001. vol. 96(8): 1129-1133.

SANTOS A.R; DEGRAVE, W. M; SUFFYS, P. N. **Use of Polymerase Chain Reaction in Leprosy Research.** Indian J Lepr. V.71, 1999. p.101-110.

SANTOS, AR; De MIRANDA, A.B; SARNO E.N; SUFFYS, P.N, DEGRAVE,W.M. **Use of PCR mediated amplification of *Mycobacterium leprae* DNA in differents types of clinical samples for the diagnosis of leprosy.** J Med Microbiol. 1993. 39:298-304.

SANTOS, V.S.M DOS. **Pesquisa Documental sobre a história da hanseníase no Brasil.** Hist. Cienc. Saúde-manguinhos, vol. 10 supl. 10. Rio de Janeiro, 2003.

SANTOS,G.G DOS; MARCUCCI, G; JÚNIOR, J.G; MARGARIDO, L. C.; LOPES, L.H.C. **Pesquisa de *Mycobacterium leprae* em biópsias de mucosa oral por meio da reação em cadeia de polimerase.** Anais Brasileiros de Dermatologia. 2007. n. 82. p. 245-9.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Brasil: Prevalence and Detection of Leprosy 2006.** SINAN. 2007.

SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE DO ESTADO DO PARÁ (SESPA). **Relatório sobre a situação da hanseníase no Pará.** 2007.

SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE DO MUNICÍPIO DE BELÉM (SESMA).

Relatório sobre a situação da hanseníase em Belém. 2007.

SMITH, W.C.S; SMITH, C. M; CREE, L. A; JADHAV; R. S; MACDONALD, M; EDWARD, V. K; OSKAM, L; BEERS, S. V. KLATSER, P. **An approach to understanding the transmission of *M. leprae* using molecular and immunological methods: Results from the MILEP2 study.** International Journal of leprosy and other Mycobacterial diseases. v. 72, n.3. 2004.

World health Organization. **Global leprosy situation, 2005.** Geneva. Weekly Epidemiological Record. 2005.

World health Organization. **Global leprosy situation, 2006.** Geneva. Weekly Epidemiological Record. Geneva. 2006. N.32 p. 309-316.

WICHTTWECHKARN, J; KARNJAN, S; SHUNTAWUTTISEETEE, S; SORNPRASIT, C; KAMPIRAPAP, K; PEERAPAKORN, S. **Detection of *Mycobacterium leprae* Infection by PCR.** Journal of Clinical Microbiology. p. 45-49. v.33, n.1. 1995

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

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

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

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leprosy.** 2004. disponível em : < [http:// www.who.int/trd/diseases/leprosy.html](http://www.who.int/trd/diseases/leprosy.html) >.

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

YAMAMURA, M ; UYEMURA, K ; DEANS, R.J.; WEINBERG, K.; REA, T.H.; BLOOM, B.R.; MODLIN, R.L. **Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions.** Science. 1991, v. 254, p.277-279.

YOON, K H. **Evaluation of Polymerase Chain Reaction Amplification of *Mycobacterium leprae*-Specific Repetitive Sequence in Biopsy Specimens from Leprosy Patients.** Journal of Clinical Microbiology. 1993,p.895-899.

APÊNDICE A - FICHA EPIDEMIOLÓGICA

PROJETO: Detecção de *Mycobacterium leprae* por PCR em swab nasal e swab da linfa da região auricular de pacientes hansenianos.

UNIDADE: _____

I – IDENTIFICAÇÃO:

Nome _____ N^o

protocolo _____

Idade _____ **Data do nasc.** ____/____/____

Sexo: Masc. (____) Fem.(____) **Estado civil:** Solteiro (____) Casado(____) outro(____)

Atividade

ocupacional: _____ **Cor:** _____

Nacionalidade: _____ **Naturalidade:** _____

Renda familiar mensal: < 1 salário mínimo (____) 1 a 2 salários mínimos (____)

> 3 salários mínimos (____) sem renda (____)

Endereço

atual: _____

Estado _____ **Município:** _____ **Tempo de**

residência: _____

Endereço

anterior: _____

Estado _____ **Município:** _____ **Tempo de**

residência: _____

Escolaridade: Analfabeto (____) Fundamental incomp.(____) Fundamental

comp.(____)

Médio incomp.(____) Médio comp. (____) Superior incomp. (____) Superior comp.

(____)

II - CONDIÇÕES HABITACIONAIS:

Tipo de residência: madeira (____) alvenaria (____) enchimento (____) Outros:

Qual? _____

Número de pessoas que moram na casa: _____ **Quantos**

filhos? _____

Número de cômodos da casa: _____

Número de pessoas que dormem no mesmo cômodo: _____

Entre os residentes da casa: há outra pessoa doente? Sim(____) Não(____) Quantas?

(____)

Já faz tratamento? Sim (____) Não(____)

Água de consumo:

Retiradas de: Poço comum() Poço artesiano(____) Encanada() Rios/praias ou lagos

()

Outros Qual? _____

Tratada com: Filtrada(____) Com Hipoclorito(____) Fervida(____) fervida e filtrada ()

Não tratada()

Despejo dos dejetos: Fossa negra () Fossa sanitária() a céu aberto() Outros: Qual?_____

Descarte do lixo: Na rua() No canal() No quintal() Enterrado() Coleta pública () Outro: Qual?_____

III- DADOS DA ALIMENTAÇÃO:

Nº de refeições por dia: 1() 2() 3()

O que costuma comer em cada refeição:

Café da manhã: Sim() Não()

Café : Pão() Leite() Café() Mingau() Frutas() Outros: Quais?_____

Almoço: Sim () Não ()

Arroz() Feijão() Farinha() Carne De Boi() Peixe () Caça() Frango()

Ovos() Verduras() Frutas() conservas () Outros: Quais?_____

Jantar: Sim () Não ()

Arroz() Feijão() Farinha() Carne De Boi() Peixe () Caça() Frango()

Ovos() Verduras() Frutas() conservas () Outros: Quais?_____

IV- HÁBITOS:

Bebe bebidas alcoólicas: Sim() Não()

Cerveja () Vinho() Cachaça () Outras: Quais?_____

Fuma : Sim () Não() Quanto tempo?_____

Até 10 cigarros p/dia () 11 a 20 cigarros p/dia () mais de 20 cigarros p/dia ()

Fumava : Parou há menos de 6m () parou de 7 a 12m () parou há mais de 1 ano ()

Drogas : Sim () Não () Quais?_____

III - SINAIS E SINTOMAS DERMATONEUROLÓGICOS

	SIM	NÃO
Manchas esbranquiçadas ou avermelhadas:	()	()
Pápulas:	()	()
Infiltrações:	()	()
Tuberculos:	()	()
Nódulos:	()	()
Hipoestesia:	()	()
Anestesia:	()	()
Hiperestesia:	()	()
Outros sintomas :	_____	

IV- SINAIS E SINTOMAS NEUROLÓGICOS

	SIM	NÃO
Dor e/ou espessamento dos nervos periféricos:	()	()
Diminuição e/ou perda de sensibilidade nas áreas destes nervos:	()	()
Diminuição e/ou perda da força muscular:	()	()
Paralisia e atrofia dos músculos:	()	()
Diminuição ou perda da sudorese e lubrificação da pele:	()	()

Número de lesões cutâneas: _____ **Número de troncos nervosos espessados:** _____

VI - OUTRAS DOENÇAS: Sim (___) Não(___) Quais? _____

VII – USO DE MEDICAMENTOS : SIM (___) NÃO (___) Quais ? _____

VIII- EXAMES REALIZADOS: Sim (___) Não (___) Quais? _____

IX- RESULTADOS DOS EXAMES ESPECÍFICOS:

Baciloscopia: Presença de BAAR (___) Nº de cruces: _____
Ausência de BAAR (___)

Histopatológico: _____

Mitsuda: Não reator (___) Reator (___)

Entrevistador(a): _____ Data: ___/___/2006.

APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Baseado na Resolução Nº.196 de 10/10/1996 do Conselho Nacional de Saúde)

Para obtenção do grau de mestre, os alunos do Curso de Patologia das Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical precisam elaborar um Projeto de Pesquisa. Assim, estamos propondo um projeto para estudar a presença da bactéria da hanseníase na secreção do nariz e da orelha onde foi retirado o material para exame de rotina no momento do diagnóstico.

Este projeto tem como título: **Detecção de *Mycobacterium leprae* por PCR em swab nasal e swab da linfa da região auricular de pacientes hansenianos.**

A hanseníase ou lepra é uma doença causada por micróbio, chamado *Mycobacterium leprae*. Pode apresentar uma ou mais lesões (feridas) ou manchas na pele e que pode deixar a pessoa com deformidades e sem condições para trabalhar.

Neste projeto de pesquisa, queremos estudar uma forma mais rápida de identificar o micróbio causador dessa doença.

Para participar precisamos da sua autorização após informações e esclarecimentos sobre a pesquisa que teremos por obrigação lhe apresentar. Você não é obrigado a participar, assim como, ao concordar você é livre para sair no momento que quiser. Entretanto, sua participação nesse projeto será de grande importância para ajudar a esclarecer e adotar meios mais eficazes para que no futuro esta doença possa ser controlada.

Para participar você deve responder algumas perguntas, autorizar copiar informações do seu prontuário, permitir a coleta de secreção do nariz e da orelha (linfa) com um cotonete e autorizar o registro de imagens das lesões.

O material da orelha (linfa) e da secreção do nariz será processado e analisado para identificação da bactéria da hanseníase.

Sua identidade não será revelada, seu rosto não aparecerá nas fotografias, bem como as informações serão sigilosas.

Os riscos são os comuns a quem vai se submeter para que o médico dê o diagnóstico. Todo o tipo de material usado para a coleta de material biológico (secreção do nariz e da orelha, pós-coleta de rotina) será estéril (limpo) e sem nenhum gasto financeiro. Os benefícios serão para você e para os futuros pacientes.

Caso concorde em participar do estudo, peço que assine este documento.

Declaro que tomei conhecimento do assunto do presente estudo e que concordo em participar do mesmo autorizando a coleta de informações, de fotografias e doando material biológico (secreção do nariz e da orelha pós-coleta de rotina) para o estudo e que este material será usado para análise científica e não pode ser vendido.

....., _____ / _____ / _____

Assinatura do sujeito da pesquisa ou do responsável

ou digitais

Ana Rosa Botelho Pontes (mestranda)
End. Tv. Mariz e Barros, 3066 Ap. 402 A , Marco, CEP. 66095-760
Fone (091) 2346-5350 ou 8148-8883
Edna Aoba Yassui Ishikawa (Orientadora do Projeto)
Endereço: Av. Generalíssimo Deodoro, 92 - CEP: 66.055-240 Belém-Pará
Tel/Fax: (091) 3241-0032