

Universidade Federal de Uberlândia
Faculdade de Medicina
Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Érica de Melo Reis

**Novo marcador molecular para detecção e quantificação de *Mycobacterium leprae*
por meio de PCR em tempo real**

Uberlândia
2009

Érica de Melo Reis

**Novo marcador molecular para detecção e quantificação de *Mycobacterium leprae*
por meio de PCR em tempo real**

**Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde - Faculdade de Medicina -
Universidade Federal de Uberlândia,
como pré-requisito para obtenção do
título de mestre em Ciências da Saúde.**

Orientadora: Profa. Dra. Isabela Maria Bernardes Goulart

Co-Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart

Uberlândia – MG

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

R375d Reis, Érica de Melo, 1980-

Novo marcador molecular para detecção e quantificação de *Mycobacterium leprae* por meio de PCR em tempo real / Érica de Melo Reis. - 2008.
63 f. : il.

Orientadora: Isabela Maria Bernardes Goulart.

Co-orientador: Luiz Ricardo Goulart.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Inclui bibliografia.

1. Hanseníase - Teses. I. Goulart, Isabela Maria Bernardes. II. Goulart, Luiz Ricardo. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 616.982.21

*Dedico este trabalho ao meu avô
Benedito Romão de Melo (in memorian),
pela incessante luta em busca da
melhoria da saúde pública.*

Agradecimentos

- Em primeiro lugar, agradeço a Deus, por estar sempre ao meu lado me dando paciência, coragem e sabedoria para enfrentar as mais diversas situações.
- À minha orientadora, Dra. Isabela, agradeço pelas longas conversas que sempre me mostraram os caminhos da ética, do compromisso e da solidariedade, mas, sobretudo, agradeço por confiar em mim e me fazer acreditar que sou capaz.
- Ao meu co-orientador, Dr. Luiz Ricardo, agradeço pelas valiosas sugestões e pela atenção dispensada nas inúmeras vezes em que invadi sua sala em busca de uma luz para minhas dúvidas.
- À Janes, colega de trabalho que se tornou uma verdadeira amiga, muito obrigada pela cumplicidade, inestimáveis idéias e conselhos, e pelas palavras de carinho que me ajudaram a seguir em frente.
- À Márcia, agradeço imensamente pelo incentivo nas horas de desânimo e pela constante disposição em me ajudar.
- Ao Thiago, agradeço pela constante disposição em me auxiliar, preparando reagentes, separando, guardando e conferindo amostras, sempre alegrando o laboratório.
- À Mariana, agradeço pelas histórias fabulosas que tornavam o dia de trabalho mais divertido, pelas idéias criativas e pela amizade.
- À Bruna, agradeço pela boa vontade e pela disponibilidade em me ajudar.
- À Adriana Neves, Thaíse Araújo, Carolina Reis, Ana Paula Carneiro, Paula Cristina e Carlos Ueira muitíssimo obrigada pelo companheirismo, preciosas dicas e pelo acompanhamento durante as clonagens.

- Às minhas amigas Juliana e Giovana, e ao amigo Fausto, sempre presentes, agradeço pelo ombro amigo, desabafos, risadas e pelas palavras de incentivo.
- À Josi e Viviene, agradeço de coração todo o tempo dedicado em atender às minhas solicitações, devo muito a vocês.
- Agradeço à Dra. Cida, pela disponibilidade em sempre me atender, sanando várias e várias dúvidas, sempre com muita atenção e boa vontade.
- À Dulci e à equipe de enfermagem do CREDESH, muito obrigada pelo carinho com que sempre me receberam e pela disposição em colaborar com tudo que precisei.
- À Família CREDESH, a qual tenho imensa admiração, agradeço pelo acolhimento e pela doação de amor e sabedoria.
- Aos pacientes e contatos domiciliares, personagens fundamentais, agradeço a aceitação em participar deste trabalho.
- À Secretaria e Coordenação da Pós-Graduação em Ciências da Saúde, agradeço pelo apoio e atenção desde meu ingresso no Programa.
- Aos meus pais, Humberto e Sueli, irmãos, Bruno e Thaís, agradeço pelo exemplo de disciplina, respeito e bondade, pelas palavras confortantes e por serem tão compreensivos.
- Ao meu noivo Diego, agradeço pela paciência, pelo amor, apoio e confiança presentes em todos os momentos.

Resumo

O estudo epidemiológico da hanseníase tem sido restrito à detecção do DNA de *Mycobacterium leprae* em swab nasal e pele, com escassa literatura em sangue periférico, provavelmente pela dificuldade de se encontrar o bacilo nesta amostra. Este é o primeiro trabalho de epidemiologia molecular que utilizou a PCR em tempo real (qPCR) para detectar e quantificar o DNA de *M. leprae* em sangue periférico de 200 pacientes com hanseníase e 826 contatos domiciliares, associando-os com os outros parâmetros clínico-laboratoriais. A qPCR pelo sistema TaqMan® foi realizada com dois conjuntos de *primers* e sondas, tendo como alvos as regiões genômicas do antígeno 85B e ML0024 do bacilo. O marcador 85B não foi específico, pois amplificou DNA de outros parasitos, enquanto que o novo marcador ML0024, descrito neste trabalho, foi 100% específico ao DNA do bacilo, com uma positividade de 22% nos pacientes, porém variável nas diversas formas clínicas e com significativo aumento da quantificação da carga bacilar no sangue de pacientes V em relação aos T. Nos contatos a detecção foi de 1,2%. A presença do DNA de *M. leprae* em sangue de contatos que desenvolveram a doença revelou uma chance 17.22 vezes maior de adoecer em relação aos contatos saudáveis. Este trabalho descreveu o marcador ML0024 como o mais sensível e específico para o *M. leprae* e realizou um amplo estudo em sangue periférico na hanseníase, que pode ter implicações na epidemiologia da doença. A detecção de *M. leprae* no sangue de contatos, considerados portadores saudáveis, alerta para a transmissão sanguínea do bacilo e para a possibilidade desses indivíduos serem carreadores do bacilo para regiões onde a hanseníase já foi eliminada.

Palavras-chave: Hanseníase, *Mycobacterium leprae*, sangue, PCR em tempo real, pacientes, contatos domiciliares

Abstract

Leprosy epidemiologic studies have been restricted to *Mycobacterium leprae* DNA detection in nasal and bucal swabs with scarce literature on the peripheral blood, probably due to the difficulty in finding bacilli in this type of sample. We present the first molecular epidemiology study using real time PCR (qPCR) for *M. leprae* detection and quantification on peripheral blood of 200 leprosy patients and 826 household contacts, associating them with others clinical and laboratorial parameters. The TaqMan® qPCR system was performed with two groups of primers and probes, aiming the following *M. leprae* genomic regions: 85B antigen and ML0024. The marker 85B presented a low specificity, probably due to the unspecific DNA amplification from other microorganisms, while the new marker ML0024 described in this study, was 100% *M. leprae* specific, with a positivity of 22% in leprosy patients, but variable in the different clinical forms, and with significant increase in the bacillary load of lepromatous leprosy patients' blood in relation to the tuberculoid form. The detection in household contacts was 1.2%. The presence of *M. leprae* DNA in the blood of contacts that developed leprosy presented an odds ratio of 17.22-fold higher in favor of the disease occurrence in relation to the healthy contacts. The present study describes the ML0024 as the most sensitive and specific marker for *M. leprae* DNA detection, and it is the largest molecular epidemiologic study in the peripheral blood of leprosy patients and their contacts, with profound implications on the disease management. The *M. leprae* detection on the blood of contacts has imposed an alert for the possible bacilli transmission through the blood and the probability of these healthy carriers in transmitting the bacilli to populations of regions where leprosy has been eliminated.

Key words: Leprosy, *Mycobacterium leprae*, blood, real time PCR, patient, household contacts.

Lista de Figuras

Figura 1.	Esquema da infecção pelo <i>Mycobacterium leprae</i> , e formas clínicas da Hanseníase	14
Figura 2.	Espectro clínico da hanseníase: a imunidade celular (IC) X índice baciloscópico	15
Figura 3.	Amplificação do gene endógeno NRAMP1	32
Figura 4.	Positividade da qPCR ML0024 em sangue periférico, IB da biópsia de lesão de pele, IB do esfregaço dérmico, teste ELISA anti-PGL-1, teste de Mitsuda, PCR do esfregaço dérmico e da biópsia de lesão de pele de pacientes	34
Figura 5.	Regressão linear da curva padrão	35
Figura 6.	Curva padrão e teste de sensibilidade	36

Lista de Tabelas

Tabela 1.	Classificação Operacional, Forma Clínica e Sexo dos pacientes com hanseníase	22
Tabela 2.	Classificação Operacional e Sexo dos contatos domiciliares de pacientes com hanseníase	24
Tabela 3.	Teste de especificidade da qPCR com o conjunto de <i>primers</i> ML0024-1/ML0024-2 e sonda ML0024-3, e o conjunto de <i>primers</i> 85B-1/85B-2 com a sonda 85B-3 para detecção de <i>M. leprae</i>	31
Tabela 4.	Positividade da qPCR ML0024 em amostras de sangue periférico de pacientes com hanseníase	33
Tabela 5.	Média do número de cópias do DNA de <i>M. leprae</i> por ml de sangue periférico	37
Tabela 6.	Positividade da qPCR ML0024 em amostras de sangue de contatos domiciliares de pacientes com hanseníase	38
Tabela 7.	<i>Odds Ratio</i> (OR) para o desenvolvimento de hanseníase em contatos domiciliares	40

Lista de Abreviaturas e Siglas

aa - aminoácidos

BAAR – Bacilo álcool-ácido resistente

CO – Classificação Operacional

Ct – *Cycle Threshold*

DD – Dimorfo-Dimorfo

DNA – Ácido desoxirribonucléico

dNTP – Desoxirribonucleotídeo trifosfatado

DT – Dimorfo-Tuberculóide

DV – Dimorfo-Virchowiano

ELISA – Ensaio Imunoenzimático

ENH – Eritema Nodoso Hansênico

F – Feminio

FC – Forma clínica

g – Força Gravitacional

g – grama

HCl – Ácido clorídrico

I - Indeterminada

IB – Índice Baciloscópico

IE – Índice ELISA

IgM – Imunoglobulina M

kDa – Kilo Daltons

M – Masculino

M – Molar

MB – Multibacilar

ml – Mililitro

mm – Milímetro

Nº - Número

nM – Nanomolar

nm - Nanômetro

NRAMP1 - *Natural Resistance Associated Macrophage Protein 1*

OD – Densidade Ótica

OMS – Organização Mundial da Saúde

OR – *Odds Ratio*

PB – Par de base

PB – Paucibacilar

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PGL-1 – Glicolípídeo Fenólico 1

PQT – Poliquimioterapia

qPCR – PCR em Tempo Real

r – Coeficiente Linear de Pearson

RR – Reação Reversa

T – Tuberculóide

V – Virchowiano

°C – Graus Célsius

µl – Microlitro

Sumário

1. Introdução	12
1.1. Indicadores	12
1.2. Imunopatologia	14
1.3. Transmissão	16
1.4. Diagnóstico	17
2. Objetivos.....	21
2.1. Objetivo Geral	21
2.2. Objetivos Específicos	21
3. Material e Métodos	22
3.1. Amostras e sujeitos do estudo	22
3.2. PCR em tempo real (qPCR).....	24
3.2.1. Quantificação absoluta	26
3.2.2. Teste de especificidade	27
3.2.3. Teste de sensibilidade	28
3.3. Análise estatística	28
4. Resultados	30
4.1. Caracterização clínica e imunológica dos pacientes e contatos	30
4.2. Teste de especificidade	31
4.3. qPCR ML0024 - Pacientes	31
4.4. qPCR ML0024 – Contatos	37
5. Discussão	41
Referências	51
Anexo I	58
Anexo II.....	59

1. Introdução

1.1. Indicadores

A hanseníase é considerada um problema de saúde pública em muitos países em desenvolvimento. A incidência mundial da hanseníase vem diminuindo progressivamente desde 2001 (> 763.000 casos) até 2007 (254.525 casos), com prevalência de 212.802 casos no início de 2008, data em que países como Moçambique e República Democrática do Congo conseguiram eliminar a hanseníase. A eliminação da doença foi definida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como prevalência menor que um caso em cada 10.000 habitantes (WHO, 2008).

O “Plano Estratégico da Organização Mundial de Saúde para Eliminação da Hanseníase 2000-2005” e o plano complementar “Estratégia Global para Aliviar a Carga da Hanseníase e Manter as Atividades de Controle, 2006-2010”, que tiveram como estratégias assegurar as atividades de controle e morbidade da hanseníase por meio do diagnóstico precoce, tratamento com a poliquimioterapia (PQT), aconselhamento aos pacientes e familiares, educação da comunidade e prevenção de incapacidades e reabilitação, vem surtindo efeito lentamente, apesar da implementação destes planos não ser efetiva em muitos países endêmicos (WHO, 2005).

Em relação à incidência e prevalência da doença no Brasil, o país ocupa o segundo lugar no mundo, com incidência de 39.125 casos (20,45/100.000 habitantes) em 2007, e prevalência de 45.847 (2,4/10.000 habitantes) no início de 2008 (WHO, 2008). Uma análise comparativa entre os anos de 2001 e 2007 revelou redução da incidência (por 100.000 habitantes) em todas as regiões do país, registrando 54,25 casos na região Norte; 31,53 no Nordeste; 40,65 no Centro-Oeste; 6,45 no Sul e 9,75 no Sudeste. A hanseníase apresenta tendência de estabilização dos coeficientes de detecção no Brasil, mas ainda em patamares muito altos nas regiões Norte, Centro-Oeste e Nordeste (BRASIL, 2008).

A endemicidade da doença depende de condições favoráveis à existência e sobrevivência do patógeno, além de outros fatores propícios à transmissão e evolução clínica da hanseníase. Em nível global e regional, observa-se que algumas das áreas de maior endemicidade coincidem com as áreas de maior pobreza e os grupos socialmente excluídos são os mais acometidos (BRASIL, 2008). Dados de 2005 revelaram que apenas as regiões Sul e Sudeste apresentam prevalência menor do que um caso por 10.000 habitantes, o que se tornou objetivo para todos os municípios no Plano Nacional para Eliminação da Hanseníase em nível municipal 2006-2010 (BRASIL, 2006).

Dados da Coordenação Estadual de Dermatologia Sanitária de Minas Gerais / SE – SINAN (2008) mostram que Minas Gerais apresentou, ao final de 2008, registro ativo de doentes de 3.100 casos, com taxa de prevalência de 1,56/10.000 habitantes. No mesmo ano, foram detectados 1.751 casos novos e a taxa de detecção foi 0,88/10.000. Em 2008, o município de Uberlândia registrou prevalência de 144 casos, sendo 61 casos novos, e as taxas de prevalência e detecção por 10.000 habitantes foram, 2,26 e 0,98 respectivamente.

Dois indicadores epidemiológicos têm sido propostos para avaliar a tendência da endemia hanseníase: coeficiente de detecção de casos novos em menores de 15 anos, e percentual de casos com grau de incapacidade 2 no diagnóstico. Em se tratando de uma doença de período de incubação longo, a redução de detecção de casos novos em menores de 15 anos é um dos primeiros resultados da desaceleração da transmissão da hanseníase, uma vez que menores de 15 anos indicam transmissão recente. Os casos com incapacidade no diagnóstico revelam o diagnóstico tardio e existência de prevalência oculta na população (BRASIL, 2008). No Brasil ainda são detectados 2.980 casos novos em menores de 15 anos e 9,5% de casos com incapacidade grau 2 (SINAN, 2008).

1.2. Imunopatologia

A hanseníase é uma doença complexa causada pelo *M. leprae*, um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR), que tem tropismo pelas células de Schwann dos nervos periféricos superficiais e células do sistema fagocítico mononuclear da pele, locais onde a temperatura varia de 30 a 35°C, favorecendo a reprodução do bacilo (HARBOE, 1985; REES, 1985). É uma doença espectral, com várias formas clínicas, dependendo do estado imunopatológico do paciente, sendo duas formas polares, tuberculóide (T) e virchowiana (V), e um grupo instável dimorfo, com três subgrupos: dimorfo-tuberculóide (DT), dimorfo-dimorfo (DD) e dimorfo-virchowiano (DV) (Figura 1).

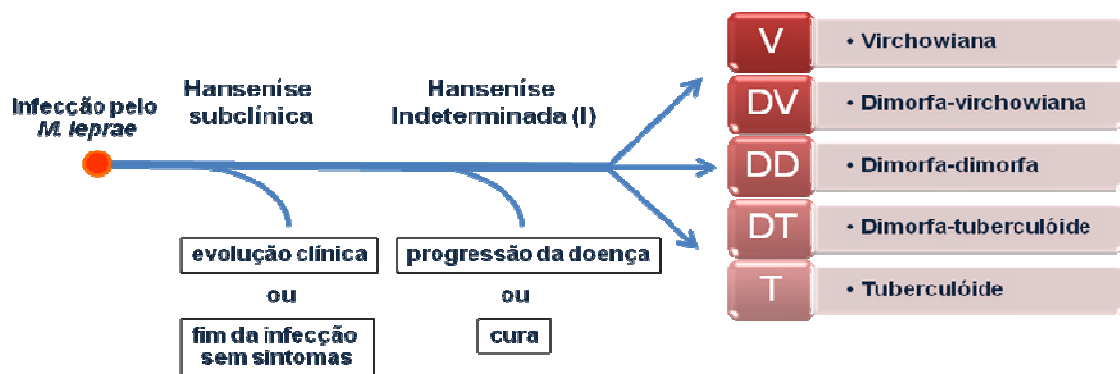


Figura 1. Infecção pelo *Mycobacterium leprae*, e formas clínicas da Hanseníase, de acordo com o espectro clínico definido por Ridley & Jopling (1966). (Adaptado de HARBOE, 1985).

Para fins de tratamento, as formas clínicas pertencentes ao pólo T (T e DT) foram designadas de paucibacilares (PB), pois apresentam poucos bacilos nas lesões, e as mais bacilíferas, da forma intermediária DD às formas pertencentes ao pólo V (DV e V), foram denominadas multibacilares (MB) (WHO, 1988). No pólo T ocorrem poucas lesões de pele e nervos, bem delimitadas, geralmente com perda de sensibilidade, predominando baixa resposta humoral e vigorosa resposta imune celular, a qual reduz progressivamente em

direção ao pólo V, associada com o aumento na carga bacilar, mais lesões na pele e nervos, e maiores titulações de anticorpos (RIDLEY & JOPLING, 1966) (Figura 2).

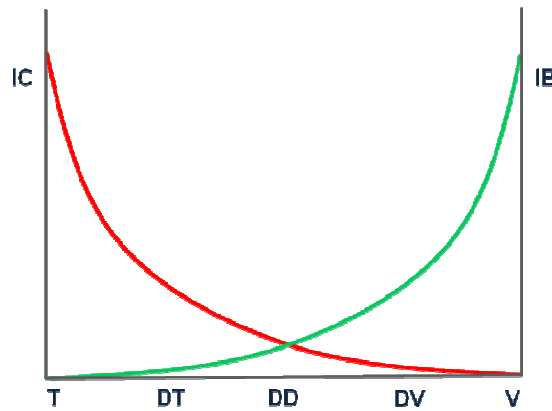


Figura 2. Espectro clínico da hanseníase: a imunidade celular (IC), avaliada pelo teste intradérmico de Mitsuda, é inversamente proporcional à carga bacilar, medida pelo índice baciloscópico (IB). (Adaptado de GOULART, 2002).

Alguns pacientes com hanseníase ainda sofrem complicações imunológicas que interrompem a evolução crônica da doença. São episódios reacionais conhecidos como reações hansênicas que podem ser do tipo 1 (Reação Reversa - RR) ou do tipo 2 (Eritema Nodoso Hansênico - ENH). A reação tipo 1 ocorre, principalmente, nas formas dimorfas instáveis da doença e é caracterizada por episódios agudos de aumento da atividade inflamatória na pele e nervos, provavelmente devido a alterações na imunidade mediada por células. As reações tipo 2 costumam ocorrer em pacientes DV e V e refletem complicações imunológicas mais graves, provavelmente devido à formação aumentada de imuno-complexos e sua deposição nos espaços teciduais, vasos sanguíneos e linfáticos (GOULART et al., 2002; FOSS, 2003; MOHANTY, 2004).

1.3. Transmissão

Os mecanismos de transmissão do bacilo ainda não são completamente esclarecidos. Sugere-se que as vias aéreas superiores (mucosa nasal e orofaringe) sejam as principais portas de entrada e saída do bacilo no organismo, visto que grande quantidade de *M. leprae* tem sido encontrada na mucosa nasal, comprovada pela detecção de DNA específico desta micobactéria, e pelo fato do parasito não ser encontrado na superfície da pele sem lesão (NOORDEEN, 1985; PATROCÍNIO et al., 2005). Alguns autores admitem a possibilidade de transmissão por contato com pele lesionada, por ingestão ou por picada de inseto (NOORDEEN, 1985).

Provavelmente, os pacientes multibacilares (MB) não tratados são a maior fonte de transmissão de *M. leprae*. No entanto, em muitas áreas, o número de pacientes MB é muito pequeno e poderia não representar a única fonte de infecção do bacilo (ILA, 2002a). Atualmente, discute-se a possibilidade de que não somente os doentes de hanseníase liberem bacilos, mas também seus contatos sadios portadores de *M. leprae* na mucosa nasal como encontrado em pesquisas com *swabs* nasais (CARDOSO, 2006, HATTA et al., 1995, RAMAPRASAD et al., 1997) e com biópsias de concha nasal de comunicantes (PATROCÍNIO et al., 2005).

A transmissão sanguínea do bacilo ainda não foi demonstrada na literatura. Entretanto, a colonização por *M. leprae* em células endoteliais, epineurais e endoneurais pelo *M. leprae* em biópsias de tecido de tatu infectado e de pacientes com hanseníase sugere a passagem do bacilo pelos vasos sanguíneos e linfáticos (SCOLLARD et al., 1999; RYAN et al., 2001). Além disso, tem sido relatado o desenvolvimento de hanseníase em pacientes submetidos a transfusões após receberem transplante de órgãos (SHIH et al., 2005).

1.4. Diagnóstico

Não existe padrão ouro para o diagnóstico da hanseníase. O diagnóstico é baseado na apresentação de um dos três principais sinais que são: manchas avermelhadas ou hipopigmentadas com perda de sensibilidade, troncos nervosos espessados e presença de *M. leprae*, que é um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR), em esfregaço dérmico ou em amostra de biópsia de lesão de pele (WHO, 2000).

O resultado da baciloscopia, realizada com coloração de Ziehl Neelsen, é importante para identificar os pacientes de maior carga bacilar e com maior risco de recidivas. No exame histopatológico, são necessários no mínimo 10.000 bacilos por grama de tecido para que a detecção pela coloração de BAAR seja confiável (SHEPARD & McRAE, 1968). Este exame apresenta baixa sensibilidade, principalmente em pacientes com características tuberculóides da doença, na qual os bacilos são raros ou ausentes (BHATIA, 1993; ILA, 2002b).

Testes imunológicos e moleculares são cada vez mais utilizados como métodos alternativos de diagnóstico e estudo da infecção. A imunidade humoral, avaliada pela titulação de anticorpos anti-glicolípido fenólico-1 (anti-PGL-1) de *M. leprae*, é diretamente proporcional ao índice baciloscópico (IB) encontrado na pele e no esfregaço dérmico; e a imunidade celular, avaliada pelo teste intradérmico de Mitsuda, é inversamente proporcional à carga bacilar (HARBOE, 1985).

Os exames sorológicos, ensaio imunoenzimático (ELISA) e teste do Fluxo Lateral (ML-Flow), ambos baseados na detecção de anticorpos IgM anti-PGL-1, demonstram que a presença desses anticorpos é diretamente proporcional à intensidade de exposição ao bacilo. Dessa forma, a titulação de anticorpos anti-PGL-1 é maior em pacientes multibacilares (MB) e menor entre os paucibacilares (PB) (BÜHRER-SÉKULA et al., 2003; DOUGLAS et al., 2004; PARKASH et al., 2007; LOBATO et al., 2009); porém não representa todas as infecções, pois pacientes PB podem não apresentar resposta humoral detectável. Além disso,

tem sido demonstrado que cerca de 10% dos contatos de pacientes com hanseníase apresentam anticorpos anti-PGL-1 no sangue e esta positividade representa um risco de aproximadamente 6 (seis) vezes para o desenvolvimento da doença (GOULART et al., 2008a).

O teste de Mitsuda baseia-se na reatividade do paciente à injeção intradérmica com lepromina, uma suspensão de bacilos *M. leprae* mortos pelo calor. A reação de hipersensibilidade tardia à presença do antígeno é medida em aproximadamente 4 (quatro) semanas e reflete a indução da resposta imune celular frente ao *M. leprae*, manifestada pela formação de um granuloma celular epitelial organizado (HARBOE, 1885). Geralmente, o teste de Mitsuda positivo é observado entre os pacientes do pólo T e é sempre negativo entre os V. A reatividade à lepromina possui quase nenhum valor de diagnóstico, mas estabelece o perfil imunológico do indivíduo frente ao *M. leprae*, e portanto, possui valor de prognóstico (HASTINGS et al., 1988), conferindo, entre os contatos positivos, uma proteção de mais de 6 (seis) vezes em relação àqueles que tem o teste negativo (GOULART et al., 2008a).

Em virtude da dificuldade de encontrar *M. leprae* por meio de métodos histopatológicos nas fases iniciais da doença, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tem sido utilizada com sucesso na detecção de bacilos presentes em pequenas quantidades nos tecidos (DONOGHUE et al., 2001) para diagnósticos e, também, para estudos epidemiológicos da hanseníase (KRAMME et al., 2004; CHAE et al., 2002; DONOGHUE et al., 2001; JAMIL et al., 1993; KLATSER et al., 1993; PATTYN et al., 1993; SANTOS et al., 2001; WILLIAMS et al., 1992).

Alguns trabalhos têm mostrado boas perspectivas com relação à detecção do DNA de *M. leprae* em várias amostras (sangue, swabs bucal e nasal, pele, concha nasal) de pacientes com hanseníase devido à maior sensibilidade e especificidade desta técnica comparada às técnicas convencionais de baciloscopia (DE WIT et al., 1991; FIALLO et al., 1992; DE WIT

et al., 1993; YOON et al., 1993; WICHITWECHKARN et al., 1995; SANTOS et al., 2001; ALMEIDA et al., 2004; PATROCÍNIO et al., 2005; GOULART et al., 2007).

Na tentativa de encontrar *primers* para a detecção de *M. leprae* por meio de PCR, que sejam referência para os serviços de saúde de todo o mundo, várias sequências de nucleotídeos tem sido utilizadas, tais como sequências de DNA que codificam os antígenos 18 kDa (WILLIAMS et al., 1990), 36 kDa (HARTSKEERL et al., 1989), 65 kDa (PLIKAYTIS et al., 1990), e as sequências repetitivas do *M. leprae* (WOODS & COLE, 1989) ou de RNA ribossômico (MISRA et al., 1995). Trabalhos recentes encontraram que *primers* cujos alvos são fragmentos pequenos da região repetitiva RLEP são mais sensíveis e específicos em relação aos fragmentos maiores desta mesma região (GOULART et al., 2007) e da região do antígeno de 18 kDa do genoma do *M. leprae* (KRAMME et al., 2004).

A PCR em tempo real (qPCR), na qual a detecção do DNA é baseada na medida da fluorescência liberada por uma sonda específica, tem revelado melhores sensibilidades e especificidade no diagnóstico de vários parasitos, possibilitando a quantificação de DNA da carga bacteriana presente na amostra clínica (RONDINI et al., 2003, TAKAHASHI & NAKAYAMA, 2006). No entanto, poucos trabalhos tem utilizado esta técnica para detecção de *M. leprae* (KRAMME et al., 2004; SHAMSI et al., 2006; MARTINEZ et al., 2006; TRUMAN et al., 2008; RUDEEANEKSIN et al., 2008), principalmente na aplicação em estudos epidemiológicos.

Os trabalhos envolvendo a qPCR para detecção de *M. leprae* realizaram esta técnica em amostras de biópsia de lesão de pele, onde existe maior possibilidade de encontrar o bacilo devido ao seu tropismo por regiões mais frias (KRAMME et al., 2004, MARTINEZ et al., 2006, RUDEEANEKSIN et al., 2008, SHAMSI et al., 2006).

Não há trabalhos sobre a detecção do DNA de *M. leprae* por qPCR em sangue periférico, representando uma lacuna no conhecimento sobre o comportamento do bacilo após

a invasão da mucosa nasal de doente e de contatos. O método de migração do *M. leprae* até o sistema nervoso periférico ainda é desconhecido (RAMBUKKANA, 2000). Provavelmente, a presença de *M. leprae* em amostras de sangue periférico indicaria uma provável sequência da infecção após sua passagem pela concha nasal, como descrito em trabalho anterior (PATROCÍNIO, 2005).

Visto que o *M. leprae* é um parasito intracelular obrigatório de células de Schwann e do sistema fagocítico mononuclear, e considerando-se a meia-vida curta das células fagocíticas do sangue periférico, é provável que a amplificação e a quantificação do DNA de bacilos em amostra de sangue sejam correspondentes à quantidade de bacilos vivos circulantes. Dessa forma, a detecção do DNA nesse tipo de amostra demonstraria a real infecção com bacilos viáveis. Isso poderia levar a adoção de novas medidas complementares de intervenções para o controle da hanseníase, com a utilização da quimioprofilaxia de grupos de risco, como tem sido proposto na literatura (VIJAYAKUMARAN et al., 2000; GOULART et al., 2008a), além de evidenciar a possibilidade da transmissão sanguínea de *M. leprae*.

1. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo avaliar o uso de *primers* e sondas para quantificação de DNA de *Mycobacterium leprae* por PCR em tempo real (qPCR) pela detecção da presença do bacilo em amostras de sangue periférico de pacientes com hanseníase e de contatos domiciliares, atendidos no Centro de Referência Nacional em Hanseníase e Dermatologia Sanitária – Hospital das Clínicas – Universidade Federal de Uberlândia/MG, Brasil (CREDESH/HC/UFU).

2.2. Objetivos Específicos

- Padronizar a técnica da qPCR para detecção e quantificação do DNA de *M. leprae* em amostras de sangue de pacientes com hanseníase e de contatos domiciliares;
- Relacionar os resultados do teste intradérmico de Mitsuda, teste ELISA anti-PGL-1, índice baciloscópico (IB) de esfregaço dérmico e biópsia de lesão de pele, e PCR convencional de lesão de pele e esfregaço dérmico com a qPCR em sangue de pacientes com hanseníase;
- Relacionar os resultados do teste intradérmico de Mitsuda e teste ELISA anti-PGL-1 com a qPCR em sangue de contatos;
- Avaliar a viabilidade da qPCR em sangue periférico como método de definição de portador sadio e casos subclínicos entre os contatos de pacientes de hanseníase.

3. Material e Métodos

Este estudo foi realizado em amostra de sangue periférico de pacientes com hanseníase e de contatos domiciliares atendidos pelo CREDESH/HC/UFU. O protocolo foi aprovado sob o parecer 499/08 pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFU (Anexo I) e todos os participantes da pesquisa assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo II).

3.1. Amostras e sujeitos do estudo

Foram coletados 4 ml de sangue periférico de 200 pacientes com hanseníase, virgens de tratamento, e de 826 contatos de pacientes com hanseníase. Alíquotas de sangue periférico de 19 recém-nascidos, que foi coletado para realização de outros exames, foram utilizadas nos testes de especificidade.

Os pacientes foram diagnosticados e classificados em formas clínicas (FC) de acordo com a classificação de Ridley e Jopling (1966). A classificação operacional (CO) em paucibacilar (PB) e multibacilar (MB) foi feita para fins de tratamento (77) (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação Operacional, Forma Clínica e Gênero dos pacientes com hanseníase.

Classificação operacional e Forma clínica	Total	Gênero	
	Pacientes	F	M
	N (%)	N (%)	N (%)
paucibacilar	69 (34,5)	37 (18,5)	32 (16,0)
T	25	11	14
DT	44	26	18
multibacilar	131 (65,5)	46 (23,0)	85 (42,5)
DT	34	15	19
DD	34	13	21
DV	30	10	20
V	33	8	25
Total	200 (100,0)	83 (41,5)	117 (58,5)

O CREDESH/HC/UFU tem como critério realizar testes baciloscópicos, sorológicos e moleculares para a correta classificação e tratamento dos pacientes. Para tanto, foram realizados os testes de Mitsuda, índice baciloscópico (IB) de esfregaço dérmico e da biópsia de lesão de pele, além de ELISA anti-PGL-1 e PCR convencional do esfregaço dérmico e da biópsia lesão de pele.

Para o teste de Mitsuda, a reação foi descrita baseada na medida em milímetros (mm) do diâmetro da pápula: negativa - entre 0 a 3 mm; fracamente positiva - com 4 a 7 mm; positiva forte - com 8 a 10 mm; fortemente positiva - nódulo maior que 10 mm de diâmetro ou de qualquer tamanho, com ulceração (JOPLING & MCDUGALL, 1991). Os resultados do IB do esfregaço dérmico e da biópsia de lesão de pele foram registrados de acordo com a Escala Logarítmica de Ridley (1990), que varia de zero (0) a seis (6). Para o teste ELISA anti-PGL-1, foi realizado o método do ELISA indireto, utilizando-se protocolo padronizado por nosso grupo de pesquisa (LOBATO et al., 2008), sendo que o índice ELISA (IE) maior ou igual a 1.1 foi considerado positivo. A extração de DNA do esfregaço dérmico e da biópsia de lesão de pele foi realizada conforme Patrocínio et al. (2005). As reações de PCR convencional amplificaram um fragmento de 130 pares de bases (pb) da região RLEP3 do *M. leprae* utilizando-se *primers* descritos por Goulart et al. (2007).

Os contatos domiciliares foram divididos de acordo com a FC e CO do caso índice (Tabela 2). Todos os contatos apresentaram exame clínico dermatoneurológico normal e realizaram testes de Mitsuda e ELISA anti-PGL-1.

Tabela 2. Classificação Operacional e Gênero dos contatos domiciliares de pacientes com hanseníase.

Classificação operacional do caso índice dos contatos	Total	Gênero	
	Contatos	F	M
	N (%)	N (%)	N (%)
paucibacilar	182 (22,0)	88 (19,8)	94 (24,7)
multibacilar	644 (78,0)	357 (80,2)	287 (75,3)
Total	826 (100,0)	445 (53,7)	381 (46,3)

Para a extração do DNA de sangue periférico, uma alíquota de 500 µl de sangue total coletado em tubos *Vacutainer*® contendo EDTA foi colocada em tubo estéril de 2 ml. A este foi adicionado 250 µl de Tris-HCL (1 M, pH 8,0) e 500 µl de fenol (tamponado em Tris-HCL 1M, pH 8,0). Os tubos foram homogeneizados e deixados em repouso por 5 minutos. Centrifugaram-se as amostras a 7280 g por 10 minutos. A seguir, 700 µl do sobrenadante foram transferidos para tubos estéreis aos quais foram adicionados 700 µl de etanol absoluto gelado. Na sequência, as amostras foram centrifugados a 14270 g por 15 minutos e o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se 1 ml de etanol 75% e, novamente, os tubos foram centrifugados por mais 10 minutos à velocidade de 14270 g. Enfim, o sobrenadante foi descartado deixando o precipitado secar. Após a secagem, os precipitados foram diluídos em 50 µl de água ultra pura e armazenados à – 20°C.

3.2. PCR em tempo real (qPCR)

A qualidade do DNA é um dos determinantes mais importantes para a confiabilidade e reprodutibilidade da qPCR (BAR et al., 2003), portanto, para avaliar a qualidade do DNA extraído das amostras de sangue, foi selecionado um par de *primers* (*forward*: 5' - GACCTGACTCTGTGTGTGTGTACG- 3' e *reverse*: 5' - TTCTGTGCCTCCCAAGTTAGC- 3') que amplifica um fragmento de 122 bp do gene constitutivo humano NRAMP1 (*natural resistance associated macrophage protein 1*). Às reações de qPCR, com volume final de 12,5 µl, foram incluídos 2 µl do DNA extraído das amostras de sangue. Foi utilizado o reagente SYBR® *Green PCR Master Mix (2X)* (Applied

Biosystems), contendo *SYBR® Green Dye*, *AmpliTaq Gold® DNA Polymerase*, *dNTPs*, referência passiva *Rox*, tampão com componentes otimizados e 200 nM de cada *primer* (*forward* e *reverse*). As reações foram processadas no equipamento ABI7300 (*Applied Biosystems*) com o seguinte programa: 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, 40 ciclos a 95°C por 15 s e 60°C por 1 min. A fluorescência foi medida, ciclo a ciclo, resultando em uma curva sigmoidal, caso houvesse amplificação do gene constitutivo. As amostras que apresentaram amplificação adequada, analisando-se a curva de amplificação e a curva de dissociação, foram incluídas nas reações para detecção de *M. leprae*.

Para qualificar e quantificar as amostras quanto à presença do DNA de *M. leprae*, foram desenhados dois pares de *primers* (ML0024 e 85B) e duas sondas marcadas 5' TAMRA e 3' FAM. O primeiro par de *primers*, ML0024-1 (ACCGGAGCTTGGGAATACACT) e ML0024-2 (TCATCTCCTGCACCCCGA), amplifica um fragmento de 68 pb do gene ML0024 do *M. leprae* (Nº de acesso GeneBank: AL583917). Este gene consta de 252 pb (29775 – 30026) que codificam uma proteína de 83 aminoácidos (aa) cuja função é desconhecida. O segundo, 85B-1 (CGGTTCTCTCGGCCCTAATAC) e 85B-2 (CGACAACGAGCCAGCATAGA), amplifica uma região de 67 pb do gene 85B, componente do gene 85B (Nº de acesso GeneBank: X60934), que codifica um complexo antigênico presente na parede celular do *M. leprae*. Esses *primers* foram desenhados com base no trabalho com qPCR de Martinez et al. (2006), que amplificaram outro fragmento do gene 85B, encontrando alta especificidade e sensibilidade.

Os *primers* e as sondas fluorescentes (ML0024-3: CACATAGGGTCCAGTCGTGCCGC e 85B-3: GGCAGCTTATCACCCCGATCAGTTC) foram desenhados utilizando-se o *software Primer Express®* (*Applied Biosystems*). Às reações de qPCR, com volume final de 25,0 µl, foram incluídos 2 µl do DNA extraído das amostras de sangue. As reações foram realizadas em duplicata para cada amostra. Utilizou-se

o reagente *TaqMan® Universal PCR Master Mix (2X)* (*Applied Biosystems*), incluindo *AmpliTaQ Gold® DNA Polymerase*, *dNTPs*, referência passiva e tampão com componentes otimizados, 200 nM de cada primer (*forward* e *reverse*) e 100 nM de sonda. As reações foram processadas no mesmo equipamento e programa utilizado para amplificação do gene endógeno NRAMP1. A análise da fluorescência foi avaliada pelo software SDS System (*Applied Biosystems*). Caso houvesse presença do DNA de *M. leprae* na amostra, a sonda marcada seria clivada durante a amplificação, gerando um sinal fluorescente, representado por uma curva sigmoidal.

Foram consideradas positivas as amostras cujas duplicatas atingiram o *threshold*, limiar ajustado na região associada ao crescimento exponencial dos produtos da qPCR. Os resultados positivos foram obtidos de acordo com o primeiro ciclo de amplificação que produzisse um sinal de fluorescência detectável, ou seja, o *cicle threshold* (*Ct*), que é definido como o ciclo da qPCR no qual a fluorescência atinge o *threshold*.

3.2.1. Quantificação absoluta

Para quantificar os produtos da qPCR, foi construída uma curva padrão a partir da clonagem dos fragmentos amplificados de 68 pb (ML0024) e 67 pb (85B) do genoma do *M. leprae*, utilizando-se o kit *TA Cloning®* (*Invitrogen*, San Diego, CA). Após a extração plasmidial, os produtos obtidos foram sequenciados, para confirmar se as sequências clonadas eram realmente os fragmentos de 68 pb e 67 pb do genoma do *M. leprae*, e em seguida, os produtos foram linearizados utilizando-se a enzima *Apa I* (*Invitrogen*) e quantificados em espectrofotômetro a 260 nm. A partir desta quantificação inicial, foi possível obter o número de cópias por microlitro dos plasmídeos linearizados, utilizando-se a seguinte fórmula de Yin et al. (2001), na qual $C = 5 \times 10^{-5}$ g/ml e MW = peso molecular do produto de PCR (pares de base $\times 6,58 \times 10^2$ g):

$$\text{Cópias/mL} = \frac{6,023 \times 10^{23} \times C \times \text{OD}_{260}}{\text{MW}}$$

Foram realizadas diluições seriadas de razão 10 (10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 cópias do DNA de *M. leprae* por reação) para construção das curvas padrão referentes a cada par de *primers* utilizado. Essas diluições foram alíquotadas e armazenadas a -80°C para utilização em duplicata em todas as placas para detecção de DNA do bacilo. Para cada curva padrão, o *software* SDS 7300 (*Applied Biosystems*) procurou o melhor ajuste entre os pontos, calculou a regressão linear e forneceu o R^2 , o *slope* (inclinação da curva) e o *y intercept*. O R^2 mede o quão próximo é o ajuste entre a regressão linear da curva padrão e os valores individuais de C_t das amostras padrão (um valor de 1 indica um ajuste perfeito entre a regressão linear e os dados individuais). O *slope* indica a eficiência de amplificação para o ensaio (um valor de -3,32 representa eficiência de 100%), e o *y-intercept* indica o valor esperado de C_t para uma amostra com quantidade 1. Utilizando-se o *slope* pode-se calcular a eficiência de cada reação, por meio da fórmula: $E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$ (APPLIED BIOSYSTEMS, 2006).

A quantificação do número de cópias do DNA de *M. leprae* fornecida pelo *software* era referente a 2 μl de DNA extraído. Assim, para calcular o número de cópias de *M. leprae* por ml de sangue, o valor dado pelo *software* foi multiplicado por 50 (primeiro multiplicou-se por 25, pois os 2 μl do DNA colocado na reação são uma alíquota do DNA total extraído, que foi diluído em 50 μl de água; em seguida, multiplicou-se por 2 para ter a quantificação em 1 ml de sangue, visto que a extração do DNA foi realizada a partir de 500 μl de sangue).

Em cada placa, a curva padrão foi considerada o controle positivo da reação, e o controle negativo, feito em duplicata, foi o mix da reação sem a presença de DNA.

3.2.2. Teste de especificidade

Foi avaliada a especificidade de dois pares de *primers*, ML0024 e 85B, com suas respectivas sondas. A especificidade foi determinada testando-se DNA extraído de cultura de

6 (seis) parasitos (*Mycobacterium gordonae*, *M. fortuitum*, *M. avium*, *M. tuberculosis*, *Plasmodium falciparum*, *Paracoccidioides braziliensis*) e/ou de 5 (cinco) amostras positivas de pacientes (*M. leprae*, *Plasmodium vivax*, *Leishmania braziliensis*, *L. amazonensis*, *Trypanosoma cruzi*), além do DNA genômico humano, extraído de 19 amostras de sangue de recém-nascidos, considerando que o *M. leprae* não passa pela barreira placentária e que recém-nascidos ainda não foram expostos ao *M. leprae*. O DNA extraído das culturas e das amostras foi submetido à qPCR com os dois conjuntos de *primers* e sondas.

3.2.3. Teste de sensibilidade

Para se determinar a sensibilidade do teste, foram realizadas diluições seriadas na razão 4 a partir do ponto 10^3 cópias do DNA de *M. leprae* da curva padrão. A partir do ponto de 62,5 cópias, foram realizadas diluições seriadas na razão 2. Após a qPCR, realizada com duplicata para cada diluição, foi feita a análise das curvas de amplificação para se estabelecer o limite confiável de detecção, no qual a amplificação das duplicatas deveria ser semelhante.

3.3. Análise estatística

Os testes estatísticos foram realizados utilizando-se o *software* BioEstat (versão 5.0; [<http://www.mamiraua.org.br>]). Para todos os testes foi aceito um erro do tipo I de 5% ($p < 0,05$ foi considerada como estatisticamente significativa).

O teste Kappa foi aplicado para avaliar os resultados de concordância entre a qPCR ML0024 e os demais exames. Quanto aos valores de Kappa (κ), observou-se: $< 0,01$ -0,20 (sem concordância), 0,21-0,40 (concordância discreta), 0,41-0,60 (concordância regular), 0,61-0,80 (concordância boa), 0,81-0,92 (concordância muito boa), 0,93–1,0 (concordância excelente) (DAWSON et al., 2001).

Para comparar os resultados dos exames aplicados entre os grupos: pacientes e contatos, PB e MB, e entre as formas clínicas da hanseníase foi empregado o teste de Mann-Whitney.

O teste de Correlação Linear de Pearson foi utilizado para se verificar qual o nível de correlação entre a qPCR ML0024 e os demais exames realizados nos pacientes e nos contatos.

O *Odds-Ratio* foi aplicado com a finalidade de associar a positividade da qPCR ML0024 entre os contatos domiciliares inicialmente sadios e o desenvolvimento da hanseníase dentro deste grupo de comunicantes.

4. Resultados

4.1. Caracterização clínica e imunológica dos pacientes e contatos

Dentre os 200 pacientes selecionados, houve predomínio do gênero masculino (58,5% - 117/200) e a média de idade foi $48 \pm 15,9$ anos, variando de 4 a 83 anos. A maioria dos pacientes eram MB [65,5% (131/200)], sendo 34 (26,0%) da forma clínica DT, 34 (26,0%) DD, 30 (22,9%) DV e 33 (25,2%) V, e dentre os 69 pacientes com hanseníase PB (35%), 25 (36,2%) eram T e 44 (63,8%) DT.

A imunidade celular dos pacientes, avaliada pelo teste de Mitsuda, apresentou valores médios decrescentes do pólo T (10,4 mm) até o pólo V (0 mm), com média de 0,5 mm entre pacientes DD. A positividade do IB do esfregaço dérmico [49,0% (94/192)], IB da biópsia de lesão de pele [64,9% (126/194)], ELISA anti-PGL-1 [63,8% (125/196)], e das PCRs do esfregaço dérmico [57,1% (100/175)] e da biópsia de lesão de pele [59,8% (116/194)], apresentou o mesmo perfil por forma clínica, com valores progressivamente maiores do pólo T em direção ao pólo V.

Dentre os 826 contatos domiciliares, a média da idade foi $28 \pm 19,3$ anos, e predominou indivíduos do gênero feminino, 53,9% (445/826). A maioria eram contatos de pacientes MB [78,0% (644/826)] da forma clínica V [32,6% (210/644)].

A média dos valores do teste de Mitsuda foi $7,4 \pm 3,4$ mm, e a maioria dos contatos (90,4%) foram Mitsuda positivo (≥ 4 mm). A média do IE entre os contatos foi $0,83 \pm 0,78$, e 81,5% tiveram IE negativo. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas para ambos os testes entre contatos de pacientes PB e contatos de MB ($p > 0,05$).

4.2. Teste de especificidade

Não foi observada qualquer amplificação com o conjunto de *primers* e sonda ML0024 (qPCR ML0024), senão para amostra com DNA de *M. leprae*. Para o conjunto de *primers* e sonda 85B, foi observada amplificação para a reação com DNA de *M. leprae* e *M. fortuitum*, *Leishmania amazonensis*, *L. braziliensis*, *P. falciparum* e com 31% (6/19) das amostras de DNA extraído de sangue de recém-nascidos (Tabela 3).

Tabela 3. Teste de especificidade da qPCR com o conjunto de *primers* ML0024-1/ML0024-2 e sonda ML0024-3, e o conjunto de *primers* 85B-1/85B-2 com a sonda 85B-3 para detecção de *M. leprae*.

Amostras de DNA	Origem	qPCR ML0024	qPCR 85B
<i>M. leprae</i>	lesão de pele	+	+
<i>M. gordonae</i>	Cultura	-	-
<i>M. tuberculosis</i>	Cultura	-	-
<i>M. fortuitum</i>	Cultura	-	+
<i>M. avium</i>	Cultura	-	-
<i>Plasmodium falciparum</i>	Cultura	-	+
<i>P. vivax</i>	sangue de paciente	-	-
<i>Leishmania braziliensis</i>	sangue de paciente	-	+
<i>L. amazonensis</i>	sangue de paciente	-	+
<i>Trypanosoma cruzi</i>	sangue de paciente	-	-
<i>Paracoccidioides braziliensis</i>	Cultura	-	-
DNA humano	sangue de recém-nascidos	-	+

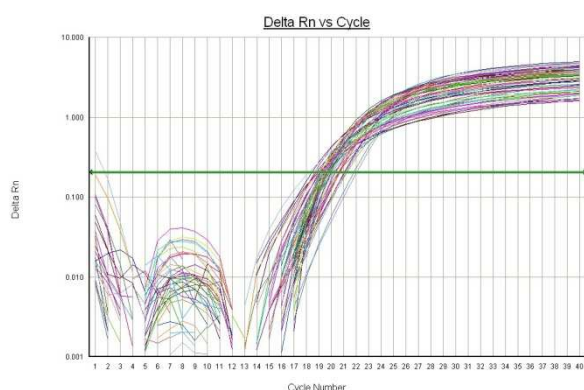
Diante deste resultado, o conjunto ML0024 foi selecionado para desenvolver este trabalho de pesquisa de DNA em sangue periférico de pacientes com hanseníase e de contatos domiciliares.

4.3. qPCR ML0024 - Pacientes

Quanto à avaliação da qualidade do DNA por meio da amplificação do gene constitutivo humano NRAMP1, verificou-se que todas as amostras de sangue dos pacientes,

contatos e recém-nascidos, foram positivas para o gene em questão, apresentando um mesmo perfil das curvas de amplificação e de dissociação (Figura 1 A e B).

A-



B-

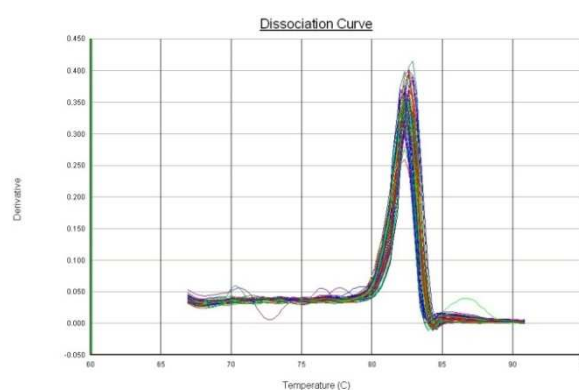


Figura 3. Amplificação do gene endógeno NRAMP1. A- Curva de amplificação, representando perfil semelhante para a amplificação do DNA de sangue de pacientes com hanseníase, contatos domiciliares e recém-nascidos; B- curva de dissociação dos produtos amplificados em A.

A qPCR com os *primers* ML0024 foi capaz de detectar a presença de DNA do bacilo em 22,0% (44/200) das amostras de sangue periférico dos pacientes com hanseníase, sendo 23,2% (16/69) em pacientes PB e 21,4% (28/131) em MB ($p>0,05$). Notou-se maior positividade entre pacientes com idade superior a 60 anos [29,3% (12/41)] e entre pacientes do gênero masculino [23,1% (27/117)], sem diferença estatística significativa entre os grupos etários bem como entre homens e mulheres ($p>0,05$).

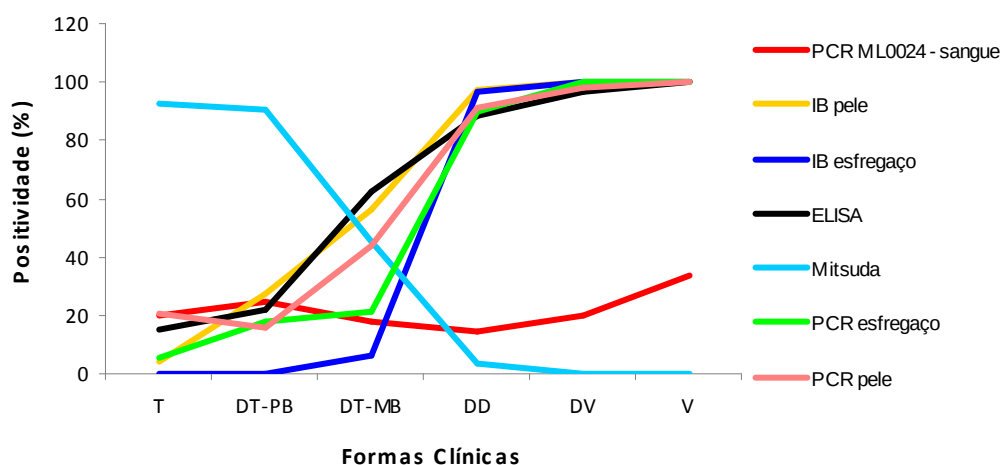
A positividade da qPCR ML0024 por forma clínica da hanseníase revelou 20% (5/25) entre os pacientes T, alcançando 33,3 (11/33) nos pacientes V (Tabela 4). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as positivities das formas clínicas ($p>0,05$).

Tabela 4. Positividade da qPCR ML0024 em amostras de sangue periférico de pacientes com hanseníase, de acordo com a classificação operacional e as formas clínicas de Ridley-Jopling.

Forma clínica	Nº (%) de pacientes positivos		Nº total de pacientes
	PB	MB	
T	5 (20,0)	0 (0,0)	25
DT	11 (25,0)	6 (17,6)	78
DD	0 (0,0)	5 (14,7)	34
DV	0 (0,0)	6 (20,0)	30
V	0 (0,0)	11 (33,3)	33
Total	16 (8,0)	28 (14,0)	200

Apesar de 59% dos pacientes com qPCR ML0024 positiva também apresentarem IE positivo e teste de Mitsuda negativo, a diferença destes testes entre os grupos de pacientes positivos e negativos para a qPCR ML0024 não foi estatisticamente significativa.

A figura 2 mostra a correlação da positividade da qPCR ML0024 por forma clínica de Ridley-Jopling (56) com os demais testes dos mesmos pacientes: Mitsuda, IB do esfregaço dérmico, IB da biópsia de lesão de pele, ELISA anti-PGL-1 e PCR convencional do esfregaço dérmico e da biópsia de lesão de pele. Os valores de Kappa obtidos entre a qPCR ML0024 e os testes citados, foram menores que 0,04, significando ausência de concordância. O coeficiente de Pearson (r) mostra que não existe correlação significativa entre a qPCR e os outros testes (Figura 2).



PCR ML0024 sangue	IB pele	IB esfregaço dérmico	ELISA anti-PGL-1	Mitsuda	PCR pele	PCR esfregaço dérmico
Kappa (k)	-0,028	-0,009	-0,0377	0,0429	-0,1043	0,0066
Coefficiente de correlação de Pearson (r)	0,1013	0,1512	0,1148	-0,0587	0,1311	0,2017

Figura 4. Positividade da qPCR ML0024 em sangue periférico, IB da biópsia de lesão de pele, IB do esfregaço dérmico, teste ELISA anti-PGL-1, teste de Mitsuda, PCR do esfregaço dérmico e da biópsia de lesão de pele de pacientes, segundo as formas clínicas da hanseníase. Os valores apresentados no quadro indicam a concordância (Kappa) e a Correlação Linear de Pearson entre a qPCR ML0024 e os demais testes.

O sequenciamento dos plasmídeos com os insertos ML0024 (68 pb) e 85B (67 pb) confirmou que as sequências clonadas eram, realmente, do genoma do *M. leprae*. As curvas padrão utilizadas para quantificação das amostras, apresentaram coeficientes de determinação (R^2) em torno de 0,99 e *slope* de -3,42, revelando uma eficiência de amplificação da reação de aproximadamente 96,0% em todas as placas (Figura 3).

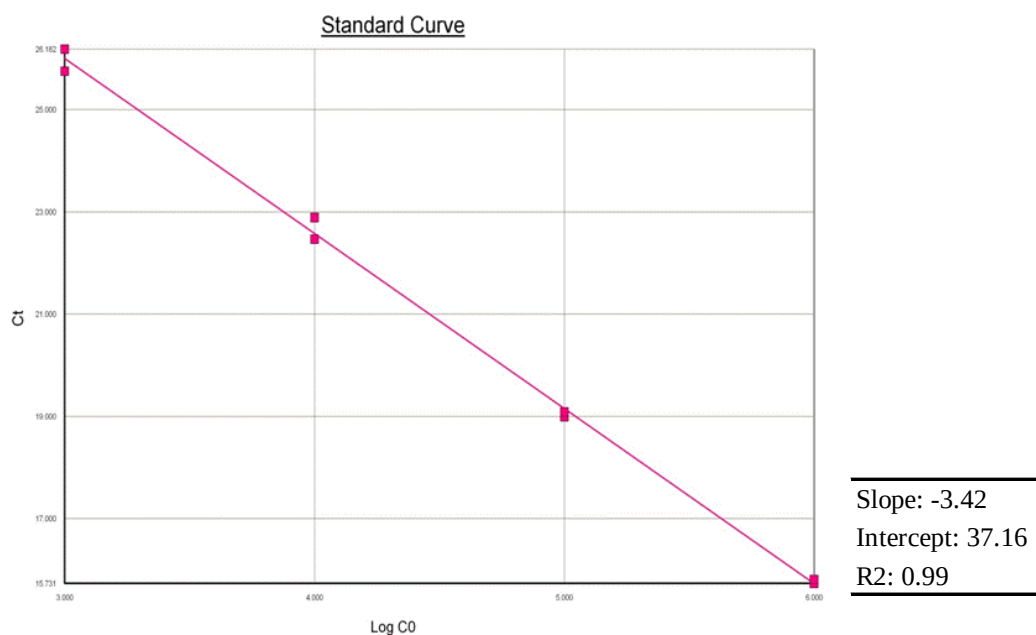
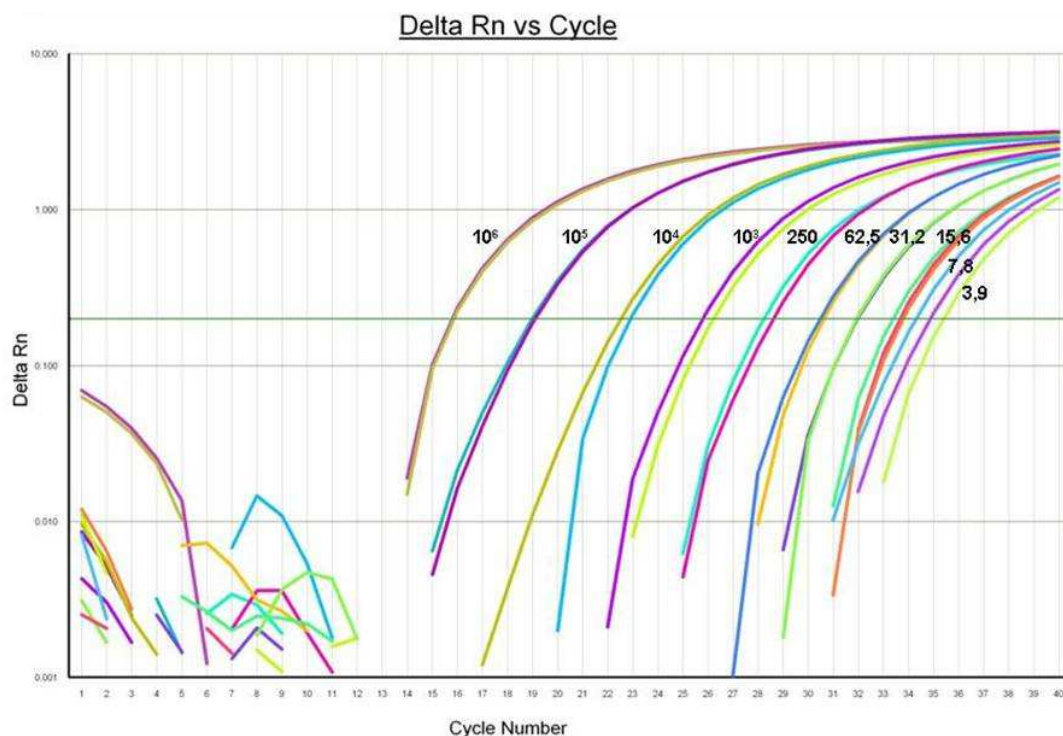


Figura 5. Regressão linear da curva padrão proveniente da amplificação de plasmídeos linearizados, contendo o inserto de 68 pb do DNA de *M. leprae*, em diluições seriadas de razão 10, de 10^6 a 10^3 cópias de DNA.

O limite de detecção da técnica foi 15,6 cópias do DNA de *M. leprae* por reação (2 μ l de DNA). A partir deste ponto as curvas de amplificação para as próximas diluições não seguiram um padrão constante entre os intervalos dos *Cts*, gerando, portanto, uma amplificação inespecífica (Figura 4).



Nº de cópias de DNA por reação	10^6	10^5	10^4	10^3	250	62,5	31,2	15,6	7,8	3,9
Ct	15,8	19,0	22,6	26,0	28,4	30,5	31,9	33,4	33,9	35,1

Figura 6. Curva padrão e teste de sensibilidade. Amplificação da diluição seriada de razão de ordem 10 a partir de 10^6 cópias do DNA de *M. leprae*; razão de ordem 4 a partir do ponto 10^3 , e de ordem 2 a partir de 62,5 cópias, para determinação do limite de detecção da qPCR ML0024.

Foi realizada análise quantitativa do número de cópias do DNA de *M. leprae* por ml de sangue de 21 das 44 amostras positivas dos pacientes. As demais 23 amostras não tiveram o mesmo padrão de diluição que as outras 21 após a extração do DNA, portanto, sua quantificação não foi realizada, pois poderia comprometer o valor real do número de cópias da amostra. Assim, estas amostras fizeram parte somente da análise qualitativa. A quantificação da carga bacilar das 21 amostras revelou valores que vão de 780 a 5.94×10^5

cópias de DNA do bacilo por ml de sangue. A média de número de cópias de DNA por ml de sangue para cada forma clínica da hanseníase foi representado pela tabela 5. Para esta análise não houve separação entre o grupo de pacientes DT em DT-PB e DT-MB, visto que dentre o último grupo havia apenas um paciente positivo cuja amostra foi quantificada. A média do número de cópias do DNA de *M. leprae* dentre os pacientes V foi 22 vezes maior que entre os pacientes T, relevando diferença estatística significativa entre a quantificação da carga bacilar sanguínea entre as formas clínicas polares ($p = 0,02$).

Tabela 5. Média do número de cópias do DNA de *M. leprae* por ml de sangue periférico de pacientes com hanseníase de acordo com as formas clínicas de Ridley-Jopling.

Forma Clínica e Classificação Operacional	Média nº cópias/ml $\pm$ desvio padrão
T - PB	870 $\pm$ 0.9
DT - PB/MB	2,9 x 10 ⁴ $\pm$ 15498
DD - MB	8,0 x 10 ³ $\pm$ 7518
DV - MB	3,2 x 10 ³ $\pm$ 2057
V - MB	1,9 x 10 ⁴ $\pm$ 32006

Em relação à análise quantitativa, não foi observada correlação significativa entre o número de cópias do DNA de *M. leprae* detectado no sangue dos pacientes e o IB do esfregaço dérmico ($r = 0,0917$), o IB da biópsia de lesão de pele ($r = 0,0269$), o IE ($r = 0,1105$) e as medidas do teste de Mitsuda ($r = -0,1573$).

4.4. qPCR ML0024 – Contatos

Dentre os contatos domiciliares, 1,2% (10/826) foram positivos para a qPCR ML0024 em sangue periférico, sendo 1,1% (2/182) contatos de pacientes PB e 1,2% (8/644) contatos de MB (Tabela 6), sem diferença estatística significativa entre os grupos operacionais e entre

as formas clínicas dos casos índice dos contatos ($p>0,05$). Entretanto, houve diferença estatística altamente significativa ($p<0,0001$) entre o resultado da qPCR ML0024 em sangue de pacientes [22,0% (44/200)] e de contatos domiciliares [1,2% (10/826)]. A detecção do DNA do bacilo foi de 1,6% (6/381) entre os contatos do sexo masculino e de 0,9% (4/445) entre os do sexo feminino, e quanto à idade, a maior positividade da qPCR ML0024 foi entre contatos domiciliares menores que 15 anos [1,9% (5/262)]. No entanto, não foi observada diferença estatística significativa entre a positividade em contatos do gênero feminino e masculino, nem entre as faixas etárias ($p>0,05$).

Tabela 6. Positividade da qPCR ML0024 em amostras de sangue de contatos domiciliares de pacientes com hanseníase, de acordo com a classificação operacional e forma clínica do caso índice.

Forma clínica dos casos índice dos contatos	Nº (%) de contatos positivos		Nº total de contatos
	PB	MB	
I	0 (0,0)	0 (0,0)	4
T	1 (1,8)	0 (0,0)	56
DT	1 (0,4)	0 (0,0)	282
DD	0 (0,0)	1 (0,7)	144
DV	0 (0,0)	2 (1,5)	130
V	0 (0,0)	5 (2,4)	210
Total	2 (0,2)	8 (1,0)	826

O teste de Mitsuda foi negativo em 30,0% (3/10) e fracamente positivo em 70,0% (7/10) dos contatos domiciliares com qPCR ML0024 positiva. Dentre os contatos com qPCR ML0024 positiva, nenhum apresentou Mitsuda positivo forte ou fortemente positivo (≥ 8), mostrando uma diferença estatisticamente significativa entre os resultados do Mitsuda de contatos com qPCR ML0024 positiva e aqueles com qPCR ML0024 negativa ($p<0,05$).

Dos contatos domiciliares com qPCR ML0024 positiva em sangue, os valores do IE variaram de 0,42 a 11,6, com média de $2,42\pm 3,5$, não sendo observado diferença estatística

significativa entre o IE dos contatos com qPCR ML0024 positiva e daqueles com qPCR ML0024 negativa ($p > 0,05$).

Do total de contatos, houve dois casos de co-prevalência e 3,1% (26/826) desenvolveram hanseníase no período de seguimento de sete (7) anos. Todos eram contatos de pacientes MB e destes, 61,5% (16/26) eram contatos de caso índice V. A qPCR ML0024 detectou DNA de *M. leprae* em 11,5% (3/26) dos contatos que adoeceram, o teste ELISA foi positivo em 57,7% (15/26) e o teste de Mitsuda foi negativo ou fracamente positivo em 84,6% (22/26).

A qPCR ML0024 positiva entre os contatos representou 17,22 maior chance de desenvolver a hanseníase ($p < 0.0001$), a positividade do teste ELISA aumentou em 7,35 vezes a chance de adoecer ($p < 0.0001$) e o teste de Mitsuda positivo (≥ 4 mm) conferiu uma proteção de 5.6 vezes ($p = 0.0007$) (Tabela 7).

Tabela 7. *Odds Ratio* (OR) para o desenvolvimento de hanseníase em contatos domiciliares baseado na qPCR ML0024 com amostras de sangue periférico, no teste ELISA anti-PGL-1 e no teste de Mitsuda.

Teste e tipo de contato	Nº de resultados positivos	Nº de resultados negativos	OR (IC95%)
qPCR ML0024			
doente	3	23	17,22 (4,05 - 73,15)
não doente	6	792	
Teste ELISA ^a			
doente	15	11	7,35 (3,29 - 16,46)
não doente	106	572	
Teste de Mitsuda ^b			
doente	17	9	0,18 (0,08 - 0,43)
não doente	667	65	

^a Para o teste ELISA anti-PGL-1, foi considerado resultado positivo, índice ELISA $\geq 1,1$. ^b Para o teste de Mitsuda, o resultado positivo foi ≥ 4 mm.

A média do IE entre os contatos que adoeceram foi $1,9 \pm 2,7$, e o valor médio do teste de Mitsuda foi $4,0 \pm 3,3$, revelando que a maioria destes [84,6% (22/26)] eram Mitsuda negativo ou fracamente positivo.

5. Discussão

Este é o primeiro trabalho que utilizou a PCR em tempo real para a detecção do DNA de *M. leprae* em sangue periférico de pacientes com hanseníase e de contatos domiciliares. A PCR em tempo real é uma técnica rápida, com alta especificidade proporcionada pelo uso de sonda e não oferece riscos de contaminação com produtos amplificados, visto que esta técnica dispensa procedimentos pós-PCR. Por isso, sua utilização tem se tornado crescente no auxílio do diagnóstico da hanseníase e de outras micobacterioses (KRAMME et al., 2004, MARTINEZ et al., 2006, PARASHAR et al., 2006, RONDINI et al., 2003, RUDEEANEKSIN et al., 2008, WILLIAMS et al., 2007). Esses trabalhos tem utilizado a qPCR em amostras de biópsia de lesão de pele, por ser mais fácil encontrar o bacilo nesta amostra, visto que a hanseníase acomete nervos periféricos e pele.

No presente trabalho, os resultados dos testes de Mitsuda, ELISA anti-PGL-1, IB e PCR convencional do esfregaço dérmico e da biópsia de lesão de pele contribuíram para a adequada classificação operacional e clínica dos pacientes. Em relação à qPCR ML0024 em sangue periférico, houve detecção do bacilo em todas as formas clínicas dentre o grupo de pacientes estudados, e a positividade predominou entre pacientes do gênero masculino e com idade superior a 60 anos. Na Índia, bem como em outros locais endêmicos, a hanseníase prevalece entre indivíduos de 35 a 65 anos e afeta com maior frequência os homens do que as mulheres, frequentemente em uma razão de 2:1 (NOORDEEN, 1985). Isto poderia ser explicado pelo estilo de vida dos homens, que geralmente são mais expostos a ambientes diversos por questões de trabalho, aumentando a chance de se contaminar, quando comparado às mulheres.

A detecção do DNA de *M. leprae* em amostras de sangue periférico indicaria provável sequência da infecção após a passagem do bacilo pela mucosa e concha nasal (PATTYN et

al., 1993, HATTA et al., 1995, ALMEIDA et al., 2004, PATROCÍNIO et al., 2005), conforme foi demonstrado com a detecção do DNA nesses sítios, indicando uma possível porta inicial de entrada e saída do bacilo e a rota de migração do *M. leprae* até o sistema nervoso, que até então é desconhecida (RAMBUKKANA, 2000). Acredita-se que os numerosos capilares linfáticos da mucosa nasal drenem a linfa contendo o bacilo livre ou englobado pelas células fagocíticas mononucleares com posterior passagem pelos linfonodos regionais, onde os antígenos são apresentados aos linfócitos T, seguido pela passagem pelo ducto torácico, que por sua vez despeja a linfa dentro da veia cava superior (ABBAS et al., 2008).

A positividade da qPCR ML0024 entre os pacientes virgens de tratamento das diversas formas clínicas foi de 22%. Provavelmente, o transporte dos bacilos até os macrófagos teciduais e/ou às células de Schwann, seja feito pelas células mononucleares da corrente sanguínea, independente do estado imunológico do paciente, haja vista que o acometimento neural ocorre em todas as formas clínicas da hanseníase (RAMBUKKANA, 2000). Scollard et al. (1999, 2000) observaram por meio de microscopia eletrônica, grande presença de *M. leprae* colonizando capilares linfáticos e células endoteliais epineurais e endoneurais, corroborando com outros trabalhos descritos na literatura (JOB, 1970; DASTUR et al., 1973; HARBOE, 1985; CHIMELLI et al., 1997) e, dessa forma tem evidenciado a disseminação hematogênica do bacilo (SABIN et al., 1993, TAKAHASHI & NAKAYAMA, 2006).

Apenas dois trabalhos na literatura abordam a detecção do DNA de *M. leprae* em sangue periférico, utilizando a PCR convencional. Em uma dessas investigações (SANTOS et al., 2001), não foram analisados pacientes virgens de tratamento e a positividade em sangue de pacientes de forma indeterminada, oito anos após a alta da poliquimioterapia (PQT), foi de 70,6% (12/17). Por ter sido realizado em área endêmica, os autores não excluíram a hipótese de re-infecção e, além disso, não se poderia afastar a possibilidade de contaminação da reação e da inespecificidade dos *primers* utilizados.

Diferenças de positividade podem ocorrer tanto pelo tamanho reduzido das amostras, quanto pela diferença na padronização da coleta de amostras, método de extração e otimização da PCR (GOULART et al., 2007, GOULART et al., 2008b , GOULART et al., 2008c).

Na presente investigação, foi comparada a especificidade de dois conjuntos de *primers* e sondas (ML0024 e 85B). Os *primers* e sonda ML0024 (qPCR ML0024) que amplificam uma região genômica do *M. leprae* de 68 pb mostraram-se específicos para detecção de DNA do bacilo. A região 85B do genoma do bacilo foi recentemente estudada para detecção de *M. leprae* por meio de qPCR com SybrGreen® em amostras de pele de pacientes, encontrando alta especificidade e sensibilidade na detecção do DNA do bacilo tanto pacientes PB quanto MB (MARTINEZ et al., 2006). No entanto, sabe-se que o complexo do antígeno 85 está sempre presente na superfície da membrana de micobactérias (ABOU-ZEID et al., 1988, THOLE et al., 1992), e suas três frações 85A, 85B e 85C já foram caracterizadas em *M. tuberculosis* e *M. bovis* (WIKER et al., 1990), desenvolvendo reações cruzadas com várias micobactérias (HARBOE et al., 1979, WIKER et al., 1986). Esses trabalhos sustentam os resultados encontrados nesta investigação, no qual os *primers* e sonda 85B apresentaram reações cruzadas com vários tipos de parasitos intracelulares e com amostras de DNA genômico humano. Dessa maneira, por sua especificidade, a qPCR ML0024 foi selecionada para detecção do DNA de *M. leprae* nas amostras de sangue periférico de pacientes e contatos, buscando um maior entendimento do comportamento do bacilo no hospedeiro.

Os fatores imunológicos são determinantes no espectro clínico e histopatológico da hanseníase (RIDLEY & JOPLING, 1966), isto é, a imunidade celular avaliada pelo teste de Mitsuda é inversamente proporcional ao índice baciloscópico (IB) encontrado na pele e no esfregaço dérmico; e a imunidade humoral, avaliada pelo ELISA anti-PGL-1, é diretamente proporcional ao IB (HARBOE, 1985). A positividade da qPCR ML0024 não mostrou

correlação significativa positiva com o índice ELISA (IE), IB e PCR convencional de pele e esfregaço dérmico, e nem correlação inversa com o teste Mitsuda.

Diferentemente do observado na detecção de *M. leprae* em sangue periférico, a maioria dos trabalhos envolvendo detecção do DNA de *M. leprae* em biópsia de lesão de pele por PCR convencional e/ou em tempo real encontrou boa correlação dos resultados com as formas clínicas da hanseníase, com a classificação operacional e com o índice baciloscópico de esfregaço dérmico (WICHTWECHKARN et al., 1995, KAMPIRAPAP et al., 1998, MARTINEZ et al., 2006, GOULART et al., 2007, GOULART et al., 2008c, RUDEEANEKSIN et al., 2008). Isso poderia ser explicado pelo fato do *M. leprae* ter tropismo pelas células de Schwann no nervo periférico e sistema fagocítico mononuclear, especialmente na pele, locais onde a temperatura varia de 30 a 35°C, favorecendo a sua reprodução (REES, 1985). Por este motivo, a baixa detecção da presença do bacilo no sangue periférico, cuja temperatura é em torno de 37°C, não segue o espectro baciloscópico da doença, conforme observado na PCR das lesões de pele e do esfregaço dérmico em locais mais frios da derme, tais como: lóbulos das orelhas, cotovelos e joelhos (GOULART et al., 2007, GOULART et al., 2008c). Por outro lado, a PCR em pele apresenta detecção de 100% nas formas MB (GOULART et al., 2007, GOULART et al., 2008c, HAILE & RYON, 2004, MARTINEZ et al., 2006), demonstrando que o acesso para o diagnóstico da hanseníase é a biópsia de lesão de pele e/ou o esfregaço dérmico.

A qPCR ML0024 detectou positividade nas formas PB (T e DT), bem como nas formas MB (DT, DD, DV e V), apesar de não apresentar diferença estatística significativa, a detecção do DNA de *M. leprae* na forma clínica V foi 1.7 vezes maior do que a encontrada na forma T. Isso mostra que a exacerbação da resposta imune celular nesta forma clínica deve ter um papel contra a proliferação e disseminação bacilar, confinando os bacilos em poucos

locais na pele e/ou nervos onde serão destruídos pela intensa resposta imune celular específica encontrada neste pólo da doença.

A porcentagem de positividade para a qPCR ML0024 encontrada no sangue periférico de pacientes T e DT também poderia indicar constante combate e dano ao *M. leprae*, resultando na liberação de vários componentes bacterianos, incluindo DNA, na corrente sanguínea (PARKASH et al., 2004), corroborando com a hipótese de que o *clearance* do bacilo seja realizado pela via sanguínea, juntamente com os capilares linfáticos (RYAN et al., 2002). Contudo, no outro lado do espectro, na forma V, apesar da detecção qualitativa de *M. leprae* pela qPCR ML0024 ter sido em apenas 33% dos pacientes, a carga bacilar média no sangue mostrou-se 22 vezes superior à encontrada entre os pacientes da forma T, o que poderia ser explicado pela ausência da resposta imune celular específica (anergia) contra a micobactéria nestes pacientes, ocorrendo proliferação de *M. leprae*, com a presença de muitas lesões e infiltrações extensas na pele e nos nervos (BRITTON & LOCKWOOD, 2004).

No presente estudo, o limite de detecção da qPCR ML0024, de 15,6 cópias de DNA do bacilo por reação, partindo de plasmídeos contendo o fragmento de 68 pb do DNA, assemelhou-se aos demais trabalhos descritos na literatura (MARTINEZ et al., 2006, TRUMAN et al., 2008), que detectaram aproximadamente cinco bacilos a partir do DNA purificado de *M. leprae*. Essa diferença poderia ser explicada pelas sequências de *primers* e sondas, descritos acima, e pelo sistema de amplificação utilizado. O sistema SyBR Green®, utilizado por Martinez et al. (2006) favorece o aparecimento de falsos positivos devido à sua característica de molécula fluorescente intercalante de fita dupla, o que pode provocar a fluorescência de produtos que não sejam derivados de *M. leprae*, caso não haja especificidade dos *primers* utilizados na reação. Portanto, uma reação bem otimizada é essencial para resultados precisos (VAN DER VELDEN et al., 2003, APPLIED BIOSYSTEMS, 2008).

Para as reações desenvolvidas com o sistema TaqMan, nas quais são utilizadas as sondas fluorescentes, existem relatos de emissão de fluorescência da sonda nos controles de reação, que contém todos os reagentes mas sem a presença de DNA, sugerindo que a sonda pode emitir sinal na presença de dímeros de *primers* (JOSEFSSON et al., 1999). Na presente investigação, observou-se que a partir do ponto considerado limite de detecção da qPCR ML0024, 15,6 cópias por reação, ainda existiam sinais de amplificação de DNA para as diluições seguintes (7,8 e 3,9 cópias). No entanto, o intervalo esperado de 1 *Ct* (*Cycle threshold*) entre as curvas das amostras com diluição de razão 2 não se manteve constante a partir do ponto com 15,6 cópias, e que os *Cts* destas replicatas não foram coincidentes. Isso implica que existem duas sensibilidades: uma, que é reprodutível, indicando qual é o limite preciso de detecção, e a outra que indica qual o nível máximo de detecção, embora sem reprodutibilidade (VAN DER VELDEN et al., 2003). Com isso, foi possível afirmar com segurança que o limite de detecção reprodutível da qPCR ML0024 é de 15,6 cópias do DNA de *M. leprae* por reação, ou seja, 780 cópias/ml de sangue.

Entre os pacientes com qPCR ML0024 positiva no sangue periférico, mais da metade tiveram o teste ELISA positivo e Mitsuda negativo; no entanto, não foi encontrada correlação entre número de cópias do DNA de *M. leprae* no sangue e o IE, nem com a média do teste de Mitsuda, e IB de esfregaço dérmico e de pele. Por razões não entendidas, a imunidade celular não protege os indivíduos que desenvolvem a forma tuberculóide, como também é exacerbada e está diretamente envolvida em causar a patologia do nervo e pele (OTTENHOFF, 1994a e 1994b). Do mesmo modo, a resposta imune humoral, que exibe altos títulos de anticorpos específicos de *M. leprae*, embora sempre presente nos pacientes do pólo V do espectro não confere proteção significativa frente à alta carga bacilar (HARBOE, 1985; CHIN-A-LIEN et al., 1992; SIELING & MODLIN, 1992). Estes fatores favorecem a disseminação do bacilo pelo organismo e, por consequência, a sua presença no sangue. No entanto, como o sangue

periférico não constitui um ambiente adequado ao desenvolvimento e sobrevivência do *M. leprae* devido à alta temperatura (HASTINGS et al., 1988), é provável que o bacilo somente seja detectado no sangue em um breve período, no qual células infectadas migram para os sítios ideais para o desenvolvimento desta micobactéria (RIDLEY & JOB, 1985).

Dentre os contatos domiciliares, a presença de *M. leprae* no sangue periférico (1,2%) foi 18 vezes menor do que a detecção em pacientes. A detecção do DNA de *M. leprae* foi quase duas vezes maior entre os contatos do gênero masculino do que entre os do gênero feminino, concordando com o encontrado no grupo de pacientes deste estudo. Quanto à idade, a maior positividade da qPCR ML0024 foi entre contatos com idade inferior a 15 anos, o que poderia ser explicado pela exposição prolongada à descarga nasal do doente, sendo que indivíduos nessa faixa etária são geralmente filhos e dependentes que coabitam o mesmo domicílio que o doente há vários anos (VAN BEERS et al., 1999).

Almeida et al. (2004) utilizaram a PCR convencional com *primers* que amplificam uma região repetitiva do genoma do bacilo, encontrando 1.7% de positividade em sangue periférico de contatos. O par de *primers* utilizado no referido trabalho foi o mesmo empregado por Santos et al. (2001), no qual 70.6% dos pacientes pós-PQT foram positivos para a PCR em sangue periférico. No entanto, após a PCR convencional, Almeida et al. (2004) realizaram hibridização do produto amplificado com uma sonda marcada com P³², e encontraram que três amostras de sangue foram falsos positivos, pois mostraram amplificação com a PCR, mas não hibridaram com a sonda. Este fato corrobora que a utilização de sonda, mesmo que não seja na qPCR, favorece a especificidade da reação.

Com referência ao teste de Mitsuda, todos os contatos que tinham *M. leprae* no sangue periférico apresentaram Mitsuda negativo ou fracamente positivo, indicando que além de ser um teste prognóstico, a resposta imune celular auxilia na resistência à invasão do bacilo na mucosa nasal. Dos contatos que tiveram qPCR ML0024 positiva no sangue, a maioria teve

ELISA negativo, mas não houve diferença estatisticamente significativa com aqueles cujo ELISA foi positivo. Como o *M. leprae* é um parasito intracelular obrigatório, a passagem do mesmo pela corrente sanguínea deve ocorrer dentro das células mononucleares do sangue periférico, de forma fugaz, uma vez que essas células tem uma meia vida curta. A presença de *M. leprae* no sangue dos contatos domiciliares indica que o bacilo escapou dos mecanismos de resistência da mucosa nasal, e que no sangue, ele poderia ser eliminado ou mesmo alcançar um sítio adequado para seu desenvolvimento, com estabelecimento da doença.

Embora o presente trabalho tenha revelado baixa detecção do bacilo em sangue periférico, mesmo entre o grupo de pacientes mais bacilíferos, a associação da presença de *M. leprae* no sangue de contatos domiciliares com o desenvolvimento da hanseníase nesse grupo, mostrou que contatos com qPCR ML0024 positiva apresentaram 17,22 vezes maior chance de desenvolver hanseníase do que aqueles contatos cuja qPCR ML0024 foi negativa. Além disso, todos os contatos que adoeceram tinham como caso índice pacientes MB.

Tem sido estimado que os contatos domiciliares de pacientes MB apresentam risco de 5 a 10 vezes maior de desenvolver hanseníase do que a população em geral (DOULL et al., 1942, FINE et al., 1997, VAN BEERS et al., 1999, GOULART et al., 2007). É calculado que mais de 200 indivíduos são infectados pelo *M. leprae* para cada indivíduo que desenvolve a doença e é detectado (ABE et al., 1980). Por este motivo, o Ministério da Saúde preconiza a vigilância dos contatos domiciliares que residam ou tenham residido com o doente nos últimos cinco anos (BRASIL, 2002).

A análise do teste ELISA anti-PGL-1 revelou positividade 2,7 vezes maior no grupo de contatos que adoeceram, e quanto ao teste de Mitsuda, a média mostrou-se quase 2 vezes menor entre contatos que desenvolveram hanseníase, conferindo proteção de 5,6 vezes para aqueles cujo Mitsuda foi positivo.

Os contatos domiciliares são o grupo com maior risco de desenvolver a hanseníase, devido à proximidade com os pacientes com hanseníase; entretanto, os fatores de risco não são bem estabelecidos nos programas de monitoramento. No entanto, trabalho anterior (GOULART et al., 2008a) demonstrou que contatos com ausência de cicatriz de BCG, com Mitsuda negativo e positividade de anticorpos IgM anti-PGL-1 tem risco 24,47 vezes maior de desenvolver hanseníase, corroborando com os resultados deste estudo.

A qPCR, com *primers* específicos para o *M. leprae*, associada ao teste ELISA anti-PGL-1 e ao teste de Mitsuda, é sugerida como mais uma ferramenta sensível e confiável para a identificação de grupos de risco dentre a população de comunicantes. A presença do DNA do bacilo no sangue de contatos domiciliares vem corroborar com a proposta da quimioprevenção nos contatos domiciliares identificados como grupo de risco (GOULART et al., 2008a).

A escassez de publicações que abordam a detecção do DNA de *M. leprae* em sangue periférico de pacientes com hanseníase e de contatos domiciliares evidencia a dificuldade de se encontrar o bacilo nessa amostra. O presente trabalho de caráter epidemiológico detectou positividade em 22% dos pacientes com hanseníase, e em 1,2% dos contatos domiciliares analisados, além de verificar que a presença do DNA de *M. leprae* em sangue de contatos que desenvolveram a doença revelou uma chance 17,22 vezes maior de adoecer em relação aos contatos saudáveis. Este trabalho descreveu o marcador ML0024 como o mais sensível e específico para o *M. leprae* e realizou um amplo estudo em sangue periférico na hanseníase, que pode ter implicações na epidemiologia da doença.

Considerando os últimos índices da incidência mundial da hanseníase, 254.525 casos (WHO, 2008), e a média de 4 (quatro) contatos domiciliares para cada paciente (GOULART et al., 2008a), o número aproximado de casos da população mundial de contatos é 1.018.100. Dessa maneira, admitindo-se a porcentagem de positividade da qPCR ML0024 em sangue

periférico neste grupo de indivíduos, obtém-se que cerca de 12.200 contatos domiciliares tem DNA de *M. leprae* na corrente sanguínea.

A presença do bacilo em sangue de contatos, considerados saudáveis, é uma ameaça aos planos de eliminação da hanseníase. Tem sido relatado o desenvolvimento da hanseníase em indivíduos que foram submetidos a transplantes de órgãos (SHIH et al., 2005). A confirmação da viabilidade do bacilo em sangue periférico implica na possibilidade da transmissão do parasito por meio de transfusões, além de que estes indivíduos podem carregar o bacilo para várias localidades, incluindo regiões onde a hanseníase já foi eliminada como problema de saúde pública.

Os resultados encontrados neste trabalho revelaram que a qPCR ML0024 é uma ferramenta de importante valor prognóstico e sua aplicabilidade torna-se imperativa quando se trata de identificação de grupos de risco para o desenvolvimento de uma doença estigmatizante de tamanha magnitude, e com grande potencial incapacitante como acontece com a hanseníase.

Referências

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. Tradução de Cláudia Reali e outros. 6ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 564 p. Título original: Cellular and Molecular Immunology.
- ABE, M. et al. Fluorescent leprosy antibody absorption (FLAABS) test for detecting subclinical infection with *Mycobacterium leprae*. **International Journal of Leprosy**, v. 48, p. 109-119, 1980.
- ABOU-ZEID, C. et al. Characterization of fibronectin-binding antigens released by *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG. **Infection Immunity**, v. 56, p. 3046-3051, 1988.
- ALMEIDA, E. C. et al. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA by polymerase Chain Reaction in the blood and nasal secretion of Brazilian household contacts. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 5, p. 509-5012, 2004.
- APPLIED BIOSYSTEMS. Quantifiler kits. São Paulo, 2006. Disponível em: <<http://www.appliedbiosystems.com.br/site/material/7j2orxf7.pdf>> Acesso em dezembro de 2008.
- APPLIED BIOSYSTEMS. Princípios da PCR em tempo real. Disponível em: <<http://www.appliedbiosystems.com.br/site/material/d1jg4lmm.pdf>> Acesso em dezembro de 2008.
- BAR, T. et al. Kinetic Outlier Detection (KOD) in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 17, p. 105, 2003.
- BHATIA, A. S. et al. Clinical and histopathological correlation in the classification of leprosy. **International Journal of Leprosy**, v. 61, n. 3, p. 433-438, 1993.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Guia para o Controle da Hanseníase. **Cadernos de Atenção Básica**, v. 10, p. 89, 2002.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Programa Nacional de Eliminação da Hanseníase. Plano Nacional de Eliminação da Hanseníase em Nível Municipal. Brasília, 2006.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Programa Nacional de Controle da Hanseníase. Relatório Executivo do PNCH. Brasília, 2008.
- BRITTON, W. J.; LOCKWOOD, D. N. Leprosy. **Lancet**, v. 363, p.1209-1219. 2004.
- CARDOSO, A. M. **Epidemiologia molecular do *Mycobacterium leprae***: detecção qualitativa e quantitativa de DNA do bacilo em swab nasal de pacientes com hanseníase e seus contatos domiciliares. 2006. dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Brasil, 2006.

CHIMELLI, L.; M. FREITAS; O. NASCIMENTO. Value of nerve biopsy in the diagnosis and follow-up of leprosy: the role of vascular lesions and usefulness of nerve studies in the detection of persistent bacilli. **Journal of Neurology**, v. 244, p. 318–323, 1997.

CHIN-A-LIEN, R. A. M. et al. Follow-up of multibacillary leprosy patients using a phenolic glycolipid-I based ELISA. Do increasing ELISA-values after discontinuation of treatment indicate relapse? **Leprosy Review**, v. 63, p. 21-27, 1992.

COORDENAÇÃO Estadual de Dermatologia Sanitária de Minas Gerais / Superintendência de Epidemiologia – SINAN. 2008.

DASTUR, D. K.; RAMAMOHAN, Y.; SHAH, J. S. Ultrastructure of lepromatous nerves. **International Journal of Leprosy**, v. 41, p. 47–80, 1973.

DAWSON, J. B.; TRAPP, R. G.; MCGRAW, A. Bioestatística Básica e Clínica. 3ª ed. Hill Interamericana do Brasil Ltda, Rio de Janeiro, 2001.

DE WIT, M. Y. L. et al. Application of a polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae* in skin tissues. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 5, p. 906-910, 1991.

DE WIT, M. Y. L. et al. Polimerase chain reaction for detection of *Mycobacterium leprae* in nasal swab specimes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 3, p. 502-506, 1993.

DOULL, J. A. et al. The incidence of leprosy in Cordova and Talisay, Cebu, Philippines. **International Journal of Leprosy**, v. 10, p. 107–131, 1942.

FIALLO, P. et al. Effect of fixation on polymerase chain reaction detection of *Mycobacterium leprae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 12, p. 3095-3098, 1992.

FINE, P. E. et al. Household and dwelling contact as risk factors for leprosy in northern Malawi. **American Journal of Epidemiology**, v. 146, p. 91–102, 1997.

FOSS, N. T. et al. Hanseníase: Episódios Reacionais. **Projeto Diretrizes**, 19 p., 2003.

GOULART, I. M. B.; PENA, G. O.; CUNHA, G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos de resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 4, p. 365-375, 2002.

GOULART, I. M. B. et al. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin lesions of leprosy patients by PCR may be affected by amplicon size. **Archives of Dermatological Research**, v. 299, n. 5, p. 267-271, 2007.

GOULART, I. M. B. et al. Risk and Protective Factors for Leprosy Development Determined by Epidemiological Surveillance of Household Contacts. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, n. 1, p. 101-110, 2008a.

GOULART, I. M. B.; GOULART, L. R. Leprosy: diagnostic and control challenges for a worldwide disease. **Archives of Dermatological Research**, v. 300, n. 6, p. 269-290, 2008b.

GOULART, I. M. B. et al. Sorologia e PCR quantitativa na classificação clínica de Ridley-Jopling da hanseníase, p. 529-553. In: J. Seixas; J. Cerasoli, (Ed.). **UFU, Ano 30 - Tropeçando Universos (artes, humanidades, ciências)**, 1ª ed., vol. 1. EDUFU - Editora da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil. 2008c.

HAILE Y.; RYON, J. J. Colorimetric microtitre plate hybridization assay for the detection of *Mycobacterium leprae* 16S rRNA in clinical specimens . **Leprosy Review**, v. 75, p. 40-49, 2004.

HANSEN G. A.; LOOFT, C. Leprosy: in its Clinical and Pathological Aspects, John Wright & Co., Bristol, 1895.

HARBOE, M. et al. Crossreactions between mycobacteria. II. Crossed immunoelectrophoretic analysis of soluble antigens of BCG and comparison with other mycobacteria. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 91, p. 115-124, 1979.

HARBOE, M. The immunology of leprosy. p. 53-87. In: HASTINGS, R. C. **Leprosy**. Churchill Livingstone, Edinburgh, United Kingdom. 1985.

HARTSKEERL, R. A.; DE WIT, M. Y.; KLATSER, P. R. Polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae*. **Journal of General Microbiology**, v. 135, n. 9, p. 2357-2364, 1989.

HASTINGS, R. C. et al. Leprosy. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 1, n. 3, p. 330-348. 1988.

HATTA, M. et al. Distribution and persistence of *Mycobacterium leprae* nasal carriage among a population in which leprosy is endemic in Indonesia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 89, n. 4, p. 381-385, 1995.

ILA. Summary of the Report of the International Leprosy Association Technical Forum. **Leprosy Review**, v. 70, p. 3-5, 2002a.

ILA. The diagnosis and classification of leprosy. Report of the International Leprosy Association Technical Forum. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v. 70, p. 23-31, 2002b.

JOB C. K. *M. leprae* in nerve lesions in lepromatous leprosy. **Archives of Pathology**, v. 89, p. 195-207, 1970.

JOPLING, W. H.; MCDUGALL, A. C. **Manual de hanseníase**. 4ª Ed. Livraria Atheneu. Rio de Janeiro, 1991.

JOSEFSSON, A.; LIVAK, K.; GYLLENSTEN, U. Detection and quantitation of human papillomavirus by using the fluorescent 5' exonuclease assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 490-496, 1999.

KAMPIRAPAP, K. et al. DNA Amplification for Detection of Leprosy and Assessment of Efficacy of Leprosy Chemotherapy. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v. 66, n. 1, p. 16-21, 1998.

KANG, T. J. et al. Comparison of two different amplification products (the 18 k-Da protein gene vs. RLEP repetitive sequence) in the diagnosis of *Mycobacterium leprae*. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 28, p. 420-424, 2003.

KRAMME, S. et al. Detection and quantification of *Mycobacterium leprae* in tissue samples by real-time PCR. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 193, n. 4, p.189-193, 2004.

LOBATO, J. et al. Detecção de infecção subclínica e diagnóstico sorológico em hanseníase. In: Brazilian Leprosy Congress, 11., 2008, Porto Alegre. **Hansenologia Internationalis**, v. 33, p. 66-67, 2008.

MARTINEZ, A. N. et al. Evaluation of real-time and conventional PCR targeting complex 85 genes for detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin biopsy samples from patients diagnosed with leprosy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 9, p. 3154-3159, 2006.

MISRA, N. et al. Clinical Utility of LSR/A15 Gene for *Mycobacterium leprae* Detection in Leprosy Tissues Using the Polymerase Chain Reaction. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v. 63, n. 1, p. 35:41, 1995.

MOHANTY, K. K. et al. Leprosy Reactions: Humoral and Cellular Immune Responses to *M. leprae*, 65kDa, 28kDa, and 18 kDa Antigens. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v. 72, n. 2, 149-158, 2004.

NOORDEEN, S. K. The epidemiology of leprosy, p. 15-30. In: HASTINGS, R. C. **Leprosy**. Churchill Livingstone, Edinburgh, United Kingdom. 1985.

OTTENHOFF, T. H. M. Immunology of leprosy. **Tropical and Geographical Medicine**, v. 46, p, 72-80, 1994a.

OTTENHOFF, T. H. M. Immunology of leprosy: lessons from and for leprosy. **International Journal of Leprosy**, v. 62, p.108-121, 1994b.

PARASHAR, D. et al. Applications of Real-Time PCR Technology to Mycobacterial Research. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 124, n. 4, p. 385-398, 2006.

PARKASH, O. et al. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA for 36kDa protein in urine from leprosy patients: a preliminary report. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, n. 5, p. 275-257, 2004.

PATROCÍNIO, L. G. et al. Detection of *Mycobacterium leprae* in nasal mucosa biopsies by the polymerase chain reaction. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 311-316, 2005.

PATTYN, S. R. et al. Detection of *Mycobacterium leprae* by the polymerase chain reaction in nasal swabs of leprosy patients and their contacts. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v. 61, p. 389-393, 1993.

PLIKAYTIS, B. B.; GELBER, R. H.; SHINNICK, T. M. Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium leprae* using a nested-primer gene amplification assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 9, p. 1913-1917, 1990.

RAMAPRASAD, P. et al. Transmission and protection in leprosy: indications of the role of mucosal immunity. **Leprosy Review**, v. 68, n. 4, p. 301-315, 1997.

RAMBUKKANA, A. How does *Mycobacterium leprae* target the peripheral nervous system? **Trends in Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 23-28, 2000.

REES, R. F. W. The microbiology of leprosy. p. 31-52. In: HASTINGS, R. C. **Leprosy**. Churchill Livingstone, Edinburgh, United Kingdom. 1985.

RYAN, T. J. et al. Lymphatics in leprosy: relationship to elastic fibres and observations following intra-lesional injections of colloidal carbon. **Leprosy Review**, v. 73, p. 52-63, 2002.

RIDLEY, D. S. **Skin biopsy in leprosy**. Documenta Geigy, 3ª edição. CIBA-GEIGY Limited. Basle, Switzerland, 1990.

RIDLEY, D. S.; JOB, C. K. The pathology of leprosy, p. 100–133. In: HASTINGS, R. C. **Leprosy**. Churchill Livingstone, Edinburgh, United Kingdom. 1985.

RIDLEY, D. S.; JOPLING W. H. Classification of leprosy according to immunity: a five group system. **International Journal of Leprosy**, v. 34, p. 255-273, 1966.

RONDINI, S. et al. Development and application of real-time PCR assay for quantification of *Mycobacterium ulcerans* DNA. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 9, p. 4231-4237, 2003.

RUDEEANEKSIN, J. et al. LightCycler™ real-time PCR for rapid detection and quantitation of *Mycobacterium leprae* in skin specimens. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 263-270, 2008.

SABIN, T. D.; SWIFT, T. R.; JACOBSON, R. R. Leprosy, p. 1354–1379. In: DYCK, P. J.; THOMAS, P. K. **Peripheral neuropathy**. W. B. Saunders, Philadelphia, PA. 1993.

SANTOS, A. R. et al. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA by polymerase chain reaction in the blood of individuals, eight years completion of anti-leprosy therapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 1129-1133, 2001.

SCOLLARD, M. D.; MCCORMICK, G.; ALLEN, J. L. Animal Model: Localization of *Mycobacterium leprae* to Endothelial Cells of Epineurial and Perineurial Blood Vessels and Lymphatics. **American Journal of Pathology**, v. 154, n. 5, p. 1611-1620, 1999.

SCOLLARD, M. D. Endothelial cells and the pathogenesis of lepromatous neuritis: insights from the armadillo model. **Microbes and Infection**, v. 2, p. 1835-1843, 2000.

SHAMSI, F. A. et al. Detection of *Mycobacterium leprae* in ocular tissues by histopathology and real-time polymerase chain reaction. **Ophthalmic Research**, v. 39, n. 2, p. 63-68, 2006.

SHIH, H. C. et al. Leprosy in a renal transplant recipient: a case report and literature review. **Journal of Dermatology**, v. 32, n. 8, p. 661-666, 2005.

SELING P. A.; MODLIN R. L. T cell and cytokine patterns in leprosy skin lesions. **Springer Seminars in Immunopathology**, v. 13, p. 413-426, 1992.

SINAN. Ministério da Saúde. Bloco de Dados/ hanseníase. Número de casos novos e coeficiente de incidência, classificação operacional, grau de incapacidade, regiões, Estados, Brasil. 2008.

SKINSNES, O. K. *M. leprae* and its “affinity” for nerves. **International Journal of Leprosy**, v. 39, p. 762–765, 1971.

TAKAHASHI, T.; NAKAYAMA, T. Novel technique of quantitative nested real-time PCR assay for *Mycobacterium tuberculosis* DNA. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 1029-1039, 2006.

THOLE, J. E. R. et al. Molecular and immunological analysis of a fibronectin-binding protein antigen secreted by *Mycobacterium leprae*. **Molecular Microbiology**, v. 6, p. 153-163, 1992.

TRUMAN, R. W. et al. Enumeration of *Mycobacterium leprae* Using Real-Time PCR. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 1, p. 328, 2008.

VAN BEERS, S.; HATTA, M.; KLATSER, P. R. Seroprevalence rates of antibodies to phenolic glycolipid-I among school children as an indicator of leprosy endemicity. **International Journal of Leprosy**, v. 67, p. 243–249, 1999.

VAN DER VELDEN, V. H. J. et al. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches and laboratory aspects. **Leukemia**, v. 17, p. 1013-1034, 2003.

WICHTWECHKARN, J. et al. Detection of *Mycobacterium leprae* Infection by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 45-49, 1995.

WIKER, H. G. et al. MPB59 a widely cross-reacting protein of *Mycobacterium bovis* BCG. **International Archives of Allergy and Applied Immunology**, v. 81, p. 307-314, 1986.

WIKER, H. G. et al. Evidence for three separate genes encoding the proteins of the mycobacterial antigen 85 complex. **Infection and Immunity**, v. 58, p. 272-274, 1990.

WILLIAMS, D. L. et al. The use of a specific DNA probe and polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 162, n. 1, p. 193-200, 1990.

WILLIAMS, K. J. et al. A paradigm for the molecular identification of *Mycobacterium* species in a routine diagnostic laboratory. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p. 598–602, 2007.

WHO. World Health Organization Expert Committee on Leprosy. **Sixth Technical Report Series**, 768p. 1988.

WHO. Guide to eliminate leprosy as a public health problem. **Leprosy elimination Group/World Health Organization**, Geneva. 2000.

WHO. Global strategy for further reducing the leprosy burden and sustaining leprosy control activities (plan period: 2006–2010). World Health Organization, Geneva. 2005.

WHO. Global Leprosy Situation. **Weekly Epidemiological Record**. World Health Organization, Geneva. 33:293-300. 2008.

WOODS, S. A.; COLE, S. T. A rapid method for the detection of potentially viable *Mycobacterium leprae* in human biopsies: a novel application of PCR. **FEMS Microbiology Letters**, v. 65, p. 305-310, 1989.

YIN, J. L. et al. Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for measurement of cytokine and growth factor mRNA expression with fluorogenic probes or SYBR Green I. **Immunology and Cell Biology**, v. 79, p. 213-221, 2001.

YOON, K. H. et al. Evaluation of polymerase chain reaction amplification of *Mycobacterium leprae*: specific repetitive sequence in biopsy specimens from leprosy patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 895-899, 1993.

Anexo I



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP

Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG –
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4531/4173; e-mail: cep@propp.ufu.br; www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº. 499/08 DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEP/UFU 138/08

Projeto Pesquisa: "Caracterização imunológica e molecular de pacientes com hanseníase e seus comunicantes para identificação do grupo de risco".

Pesquisador Responsável: Isabela Maria Bernardes Goulart

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

O CEP/UFU lembra que:

a- segundo a Resolução 196/96, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.

b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.

c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução 196/96/CNS, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Data para entrega dos relatórios parciais: Dezembro de 2008.

Dezembro de 2009.

Dezembro de 2010.

Dezembro de 2011.

Data para entrega do relatório final: março de 2012.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 10 de outubro de 2008.

Profa. Dra. Sandra Terezinha de Farias Furtado
Coordenadora do CEP/UFU

Anexo II

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido **Projeto de Pesquisa: Caracterização Imunológica e Molecular dos Pacientes com Hanseníase e seus Comunicantes para Identificação de Grupos de Risco.**

A hanseníase é uma doença que afeta a pele e os nervos. No início os sintomas são dificilmente notados e por ser transmitida principalmente pelo nariz, este local pode ser precocemente afetado. Durante o desenvolvimento da doença as lesões de pele são mais aparentes e os nervos podem ser irreversivelmente danificados resultando em graves seqüelas. Quanto mais demora para que a doença seja diagnosticada e o tratamento iniciado, maior será o dano. O diagnóstico pode ser dificultado porque os exames atuais não conseguem detectar o bacilo quando eles estão em pequena quantidade no organismo.

Atualmente a hanseníase tem cura e muitos são os esforços para que ela deixe de ser um problema de saúde pública no Brasil. Mas, como não há uma vacina específica contra a hanseníase, é muito importante que se possa identificar os portadores sadios do bacilo que causa a doença, bem como os contatos de pacientes que estejam no estágio inicial da infecção, ainda subclínico, para que se possa definir os grupos que tenham maior risco de desenvolver a hanseníase.

Para isso, a equipe de saúde do Centro de Referência Nacional em Hanseníase e Dermatologia Sanitária - UFU (CREDESH/UFU) está propondo uma pesquisa onde deverão ser realizados os exames de rotina para o diagnóstico da doença nos pacientes, tais como baciloscopia, teste de Mitsuda e biópsia de lesão de pele e, nos contatos domiciliares, serão realizados exames dermatoneurológico, teste de Mitsuda (uma injeção de 0,1 ml intradérmica no antebraço para avaliar a imunidade celular/resistência) e testes ML-Flow e ELISA (para detectar anticorpos contra a bactéria que causa a hanseníase no sangue da pessoa testada, coletando uma gota de sangue com uma picada na ponta do dedo e 1 tubo de 8 ml, respectivamente, para avaliar se ela está ou foi infectada indicando que a pessoa corre um risco maior de desenvolver a hanseníase). Nos pacientes e seus contatos serão realizados ainda coleta sangue (1 tubo de 4 ml) e de swabs das cavidades nasal/ bucal com escovinha própria e biópsia de pequeno fragmento de corneto nasal com pinça de nariz, ambos procedimentos para identificar DNA do bacilo de Hansen. Cabe ressaltar que todo material utilizado será estéril e descartável, e no caso das biópsias, serão realizadas com anestésico local. O material coletado será enviado ao Laboratório de Patologia Molecular e Biotecnologia do CREDESH/UFU, onde serão realizados os exames pela técnica de DNA e os resultados serão mantidos em sigilo.

Espera-se que com este estudo seja possível detectar em que estágio de desenvolvimento se encontra a doença no paciente, bem como definir os possíveis portadores sadios e aqueles que já estejam infectados com o bacilo entre os comunicantes, para seguimento periódico pela equipe do CREDESH/UFU, subsidiando uma proposta de tratamento precoce deste grupo de risco, a fim de prevenir o aparecimento da doença nos familiares, diminuir o risco de contágio da população e dessa forma, interromper a cadeia de transmissão da hanseníase.

É direito do paciente e seus contatos pedirem esclarecimentos a respeito da finalidade da pesquisa, destino do material coletado e resultados dos exames realizados e, se concordarem em participar da pesquisa, poderão desistir de fazê-lo a qualquer momento, sem que haja nenhum prejuízo próprio.

Pelos presentes termos apresentados por este documento, eu, em
 colaborar com a pesquisa, declarando estar ciente dos riscos, benefícios e direitos.
 Assinatura _____
 Uberlândia, ____ de _____ de 20 ____.