

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

**Diagnóstico molecular da hanseníase com biomarcadores *ML0024* e
85B pela PCR em tempo real**

Márcia Moura Nunes Rocha Figueira

Uberlândia - MG

2010

**Diagnóstico molecular da hanseníase com biomarcadores *ML0024* e
85B pela PCR em tempo real**

Márcia Moura Nunes Rocha Figueira

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

2010

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

Márcia Moura Nunes Rocha Figueira

**Diagnóstico molecular da hanseníase com biomarcadores *ML0024* e
85B pela PCR em tempo real**

Comissão examinadora

Presidente: Isabela Maria Bernardes Goulart (orientadora)

Examinadores: Adriana Freitas Neves

Carlos Ueira Vieira

Vivian Alonso Goulart

Uberlândia - MG

2010

EPIGRAFE

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito.”

Chico Xavier

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho...

Às minhas filhas, Clara e Luiza, por iluminarem meu caminho, por me darem inspiração e força e, principalmente, por terem me mostrado o que realmente vale a pena na vida...

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelas oportunidades de crescimento espiritual.

Às minhas filhas, minhas florzinhas, Clara e Luiza, e ao Thiago, por me darem inspiração e força para buscar sempre mais...

Aos meus pais, Marlene e Reginaldo, e ao meu irmão, Joel, por serem base da minha formação, pelo apoio incondicional, pelo exemplo de disciplina, respeito e amor...

À minha prima Tatiana, por me ajudar com as gêmeas para que eu pudesse terminar esta dissertação...obrigada pelo bom humor...

Às amigas Karina, Adriana, Thaíse e Talita, pelo companheirismo, pelos conselhos, pelas trocas de experiências pessoais e profissionais, pelas risadas e, principalmente, por me darem apoio quando achava que não iria conseguir terminar o mestrado estando grávida de gêmeas...muito obrigada!

Aos amigos do laboratório do CREDESH: Lorena, Érica, Thiago, Mariana, Bruna, Janaina, obrigada pela ajuda e companhia, pelas discussões científicas, pelo crescimento pessoal e profissional que me proporcionaram e, principalmente pelas boas risadas, pois sempre nos divertíamos, até mesmo nas situações mais adversas...

Aos amigos do laboratório de nanobiotecnologia: Juliana Franco, Fausto, Carol Siqueiroli, Fabiana, Luciana Bastos, Paula Cristina, Paula Souza, Rone, Ana Paula, Carol Reis, Rafael, Patrícia, Ângela, Tininha, Yara, Washington pelas inúmeras discussões científicas, pelas risadas, muitíssimo obrigada pela disponibilidade em me ajudar, pelo companheirismo e pelas preciosas dicas durante os experimentos.

À Profa. Dra. Isabela, pelo profissionalismo, pela orientação, pelo respeito aos doentes, pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal.

Prof. Dr. Luiz Ricardo, pela paciência e sabedoria na ciência de orientar seus alunos e pelas valiosas sugestões para os experimentos.

À equipe do Centro de Referência Nacional em Hanseníase, em especial à Josiela, pela eficiência e prontidão em atender todas as solicitações que fiz...muito obrigada.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, principalmente ao Prof. Carlos Henrique, sempre pronto a ajudar.

Aos pacientes de hanseníase e seus contatos domiciliares, que foram fundamentais para a realização deste trabalho...obrigada por aceitaram participar deste trabalho.

À CAPES, pela bolsa concedida.

À FAPEMIG, pela aprovação e financiamento do projeto que resultou nesta dissertação de mestrado.

A todos que momentaneamente não foram lembrados, mas que contribuíram para minha formação pessoal e profissional.

RESUMO

Hanseníase é uma doença espectral, causada pelo *Mycobacterium leprae*, cujo diagnóstico é clínico-laboratorial, realizado por meio de técnicas baciloscópicas de baixa sensibilidade e especificidade, que não detectam o bacilo nas formas paucibacilares (PB). No presente estudo foram testados marcadores moleculares por qPCR, com a finalidade de auxiliar o diagnóstico da doença, principalmente na forma PB. O DNA total de biópsia de lesão de pele foi extraído de 185 pacientes virgens de tratamento. A qPCR foi realizada utilizando pares de primers para amplificação da sequência *ML0024* e *85B* do genoma do bacilo. Ambos marcadores foram altamente específicos. A detecção do DNA do bacilo pela qPCR *ML0024* e qPCR *85B* foi 59,45% (110/185) e 57,29% (106/185), respectivamente, enquanto o Índice Baciloscópico (IB) de esfregaço dérmico e de lesão de pele detectaram, respectivamente, a presença do bacilo em 45,94% (85/185) e 44,86% (83/185) dos casos. Dentre todos os casos negativos para o IB de esfregaço dérmico, a qPCR *ML0024* e qPCR *85B* detectaram a presença do DNA do bacilo em 26,00% (26/100) e 23,00% (23/100), respectivamente. Entre aqueles negativos para o IB de lesão de pele, a qPCR *ML0024* foi positiva em 27,45% (28/102) e a qPCR *85B* em 23,52% (24/102). Observou-se diferença significativa entre a positividade dos testes moleculares e os dois testes baciloscópicos ($p < 0,0001$) para as formas clínicas T, DT- e DT+. A concordância entre os resultados da qPCR *ML0024* e qPCR *85B* foi superior a 90,00% e apresentou excelente replicabilidade. Entre os testes baciloscópicos e os testes moleculares as concordâncias observadas foram superiores a 80,00%. Quanto à análise quantitativa, observou-se correlação positiva entre as formas clínicas e a carga bacilar. Os marcadores moleculares avaliados neste estudo possuem

igualmente o mesmo número de cópias no genoma, são específicos, apresentam praticamente o mesmo tamanho de *amplicon* e possuem comportamentos semelhantes, embora não apresentando diferenças significativas na sensibilidade. Portanto, esse trabalho vem corroborar com a classificação de Ridley-Jopling (1966) mostrando a presença de DNA do *M. leprae* em amostras cujos testes baciloscópicos foram negativos; correlacionando-se diretamente com a carga bacilar de cada forma clínica do espectro da doença, ampliando o diagnóstico de certeza na hanseníase.

Palavra-chave: Hanseníase, *Mycobacterium leprae*, pele, PCR em tempo real, paciente.

ABSTRACT

Leprosy is a spectral disease caused by *Mycobacterium leprae*, whose clinical and laboratory diagnosis is performed by means of sputum smear techniques of low sensitivity and specificity, they do not detect the bacilli in paucibacillary (PB). In the present study were tested by qPCR molecular markers, in order to assist the diagnosis of disease, mainly in the form PB. The total DNA of skin lesion biopsy was taken from 185 treatment-naïve patients. The qPCR was performed using primer pairs for amplification of the sequence ML0024 and 85B of the genome of the bacillus. Both markers were highly specific. Detection of DNA of the bacillus by qPCR and qPCR ML0024 85B was 59.45% (110/185) and 57.29% (106/185), respectively, while the bacterial index (BI) smear and dermal skin lesion detected, respectively, the presence of the bacillus in 45.94% (85/185) and 44.86% (83/185) of cases. Among all cases negative for the IB dermal smear, the qPCR and qPCR ML0024 85B detected the presence of the bacillus DNA in 26.00% (26/100) and 23.00% (23/100), respectively. Among those negative for the IB skin lesions, the ML0024 qPCR was positive in 27.45% (28/102) and qPCR 85B in 23.52% (24/102). There was significant difference between positive molecular tests and two tests bacilloscopic ($p < 0.0001$) for the clinical forms of T, and DT-DT +. The agreement between the results of qPCR and qPCR ML0024 85B was more than 90.00% and showed excellent repeatability. Among the tests and molecular tests bacilloscopic the concordance observed were higher than 80.00%. As for the quantitative analysis, we observed a positive correlation between the clinical forms and bacillary load. Molecular markers evaluated in this study also have the same number of copies in the genome, are specific, have virtually the same amplicon size and have similar behavior, although with

significant differences in sensitivity. Therefore, this study corroborates with the Ridley-Jopling classification (1966) showing the presence of DNA of *M. leprae* in samples bacilloscopic whose tests were negative, correlating directly with the bacterial load of each clinical spectrum of disease, increasing certainty in the diagnosis of leprosy.

Key words: Leprosy, *Mycobacterium leprae*, skin, real time PCR, patient.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Formas clínicas da hanseníase.	19
Figura 2	Representação esquemática do <i>M. leprae</i> e Modelo esquemático do envelope celular do <i>M. leprae</i> .	24
Figura 3	Análise de correlação entre testes de Mitsuda, Elisa, IB de esfregaço dérmico e de biópsia de lesão de pele dos pacientes com hanseníase, conforme o espectro de Ridley e Jopling (1996).	41
Figura 4	Padronização da quantidade de DNA para realização da qPCR <i>NRAMP</i> .	42
Figura 5	Análise qualitativa do DNA total extraído das amostras de biópsia de lesão de pele pela PCR em tempo real para o gene humano <i>NRAMP</i> .	43
Figura 6	Limite inferior de detecção de DNA de <i>M. leprae</i> pela qPCR.	45
Figura 7	Curva padrão obtida pela PCR em tempo real.	46
Figura 8	Resultados dos testes baciloscópicos e moleculares dos pacientes com formas clínicas T, DT- e DT +.	50
Figura 9	Correlação entre o ciclo inicial de amplificação da qPCR <i>ML0024</i> e da qPCR 85B e os índices baciloscópicos (IB) de esfregaço dérmico e de biópsia de lesão de pele.	53
Figura 10	Correlação entre as médias dos números de cópias de DNA de <i>M. leprae</i> obtidos pela qPCR <i>ML0024</i> e qPCR 85B e os índices baciloscópicos (IB).	55

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

Tabela 1	Países mais endêmicos para hanseníase no mundo.	21
Tabela 2	Sequências dos marcadores moleculares, <i>primers</i> e sondas, utilizadas para testes de PCR em tempo-real.	35
Tabela 3	Especificidade dos marcadores moleculares testados pela qPCR <i>ML0024</i> e qPCR 85B.	47
Tabela 4	Distribuição dos pacientes por forma clínica segundo IB de esfregaço dérmico, IB de biópsia de lesão de pele, qPCR <i>ML0024</i> e qPCR 85B em biópsias de lesão de pele.	49
Tabela 5	Concordância entre qPCR <i>ML0024</i> e qPCR 85B com IB de esfregaço dérmico e IB de biópsia de lesão de pele.	51
Tabela 6	Quantificação do <i>M. leprae</i> pelo ciclo inicial de amplificação e por número de cópias por <i>punch</i> de 3mm ³ obtidos pela qPCR <i>ML0024</i> e pela qPCR 85B.	52
Tabela 7	Diferenças entre os valores teste <i>t</i> (p valor) realizado entre os valores médios dos ciclos iniciais de amplificação, entre as médias da quantificação do número de cópias de DNA de <i>M. leprae</i> pela qPCR <i>ML0024</i> e pela qPCR 85B, por forma clínica.	56

LISTA DE ABREVIATURAS

BAAR	Bacilo álcool-ácido resistente
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
C	Citosina
CREDESH/HC/UFU	Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária / Hanseníase, do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia
CL	Ciclo inicial de amplificação
DD	Dimorfo-dimorfo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dntp	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
DT	Dimorfo-tuberculóide
DT-	Dimorfo-tuberculóide com IB de lesão de pele negativo
DT+	Dimorfo-tuberculóide com IB de lesão de pele positivo
DV	Dimorfo-virchowiano
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
ENH	Eritema Nodoso Hansênico
g	Grama
IB	Índice baciloscópico
IL-2	Inter-leucina 2
IFN- γ	Interferon - gama
KDa	Quilo Dalton
LAM	Lipoarabinomanana

M	Molar
Min.	Minutos
MB	Multibacilar
mL	Mililitro
mm	Milímetro
<i>M. leprae</i>	<i>Mycobacterium leprae</i>
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Nº	Número
nM	Nanomolar
<i>NRAMP1</i>	<i>Natural Resistance Associated Macrophage Protein 1</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	Pares de base
PB	Paucibacilar
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PGL-1	Glicolípídeo Fenólico-1
PMBIO	Laboratório de Patologia Molecular e Biotecnologia do CREDESH/HC/UFU
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo-real
r	Coeficiente Linear de Pearson
RR	Reação Reversa
s	Segundos
T	Tuberculóide
TNF- α	Fator de necrose tumoral - alfa

V	Virchowiano
°C	Graus Celsius
μL	Microlitro

SUMÁRIO

1. Revisão de Literatura.....	18
1.1. Considerações gerais.....	18
1.2. Epidemiologia.....	20
1.3. Transmissão.....	22
1.4. Microbiologia.....	23
1.5. Diagnóstico.....	26
1.6. Reação em Cadeia da Polimerase para a Hanseníase.....	27
2. Objetivos.....	31
3. Material e Métodos.....	32
3.1. Caracterização dos pacientes e seleção das amostras.....	32
3.2. Obtenção de DNA para o banco de amostras do CREDESH.....	33
3.3. Qualificação do DNA extraído das biópsias de lesão de pele.....	34
3.4. Desenho dos marcadores moleculares.....	34
3.5. PCR em tempo real.....	36
3.5.1. Clonagem e Restrição Enzimática	36
3.5.2. Condições das reações qPCR <i>ML0024</i> e qPCR 85B.....	37
3.5.3. Limite inferior de detecção da qPCR.....	37
3.5.4. Construção da Curva Padrão da PCR em tempo real.....	38
3.5.5. Especificidade marcadores moleculares.....	39
3.6. Análise estatística.....	39
4. Resultados.....	41
4.1. Caracterização dos pacientes.....	41
4.2. Qualificação do DNA extraído das biópsias de lesão de pele.....	42
4.3. PCR em tempo real.....	44
4.3.1. Limite inferior de detecção da qPCR.....	44
4.3.2. Construção da Curva Padrão da PCR em tempo real.....	46
4.3.3. Especificidade dos marcadores moleculares.....	47
4.4. qPCR <i>ML0024</i> e qPCR 85B.....	48
5. Discussão.....	57
6. Referências Bibliográficas.....	63
ANEXO I: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFU.....	79
ANEXO II: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	80

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Considerações gerais

A hanseníase é uma doença crônica causada pelo *Mycobacterium leprae*, um parasita intracelular obrigatório de células do sistema mononuclear fagocitário e células de Schwann e suas formas clínicas são definidas considerando-se padrões imunológicos, formando um amplo espectro intimamente proporcional à potencialidade de resposta do hospedeiro ao parasita (GOULART *et al.*, 2002).

Os pacientes de hanseníase são classificados clinicamente de acordo com a escala de Ridley & Jopling: no pólo tuberculóide (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 virchowiano (V), associada com o aumento na carga bacilar, mais lesões na pele e nervos, e maiores titulações de anticorpos (RIDLEY & JOPLING, 1966).

No meio deste espectro existem três formas intermediárias do grupo dimorfo, denominadas: dimorfa-tuberculóide (DT), dimorfa-dimorfo (DD), e dimorfa-virchowiano (DV), que são imunologicamente instáveis, correspondendo ao maior número de doentes em áreas endêmicas (HASTINGS, 1988). A Organização Mundial de Saúde (OMS) estabeleceu, ainda, a classificação operacional dos pacientes em Paucibacilares (PB) e Multibacilares (MB) de acordo com o índice baciloscópio (IB), o número de lesões cutâneas e nervos acometidos, para delimitar melhor os esquemas terapêuticos (WHO, 1982) (Figura 1).

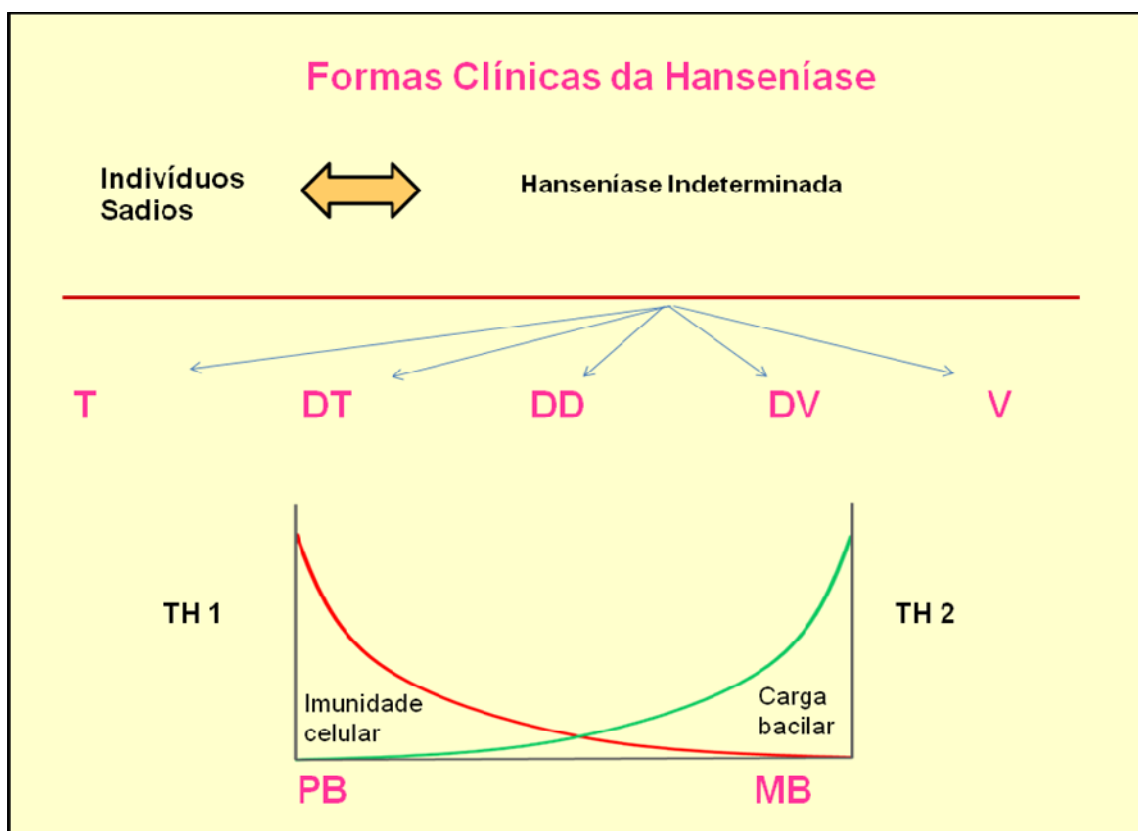


Figura 1. Formas clínicas da hanseníase: DD: dimorfa-dimorfa; DT: dimorfa-tuberculóide; DV: dimorfa-virchowiana; T: tuberculóide; V: virchowiana; PB: paucibacilar; MB: multibacilar; TH 1: linfócito T helper 1; TH 2: linfócito T helper 2. (Fonte: Adaptado de RODRIGUES (2005)).

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).

1.2. Epidemiologia

A hanseníase é considerada um problema de saúde pública em muitos países em desenvolvimento. Durante o ano de 2009, foram detectados 244.796 novos casos de hanseníase no mundo. No início de 2010 a prevalência registrada foi de 211.903 casos (WHO, 2010).

Apesar dos progressos significativos alcançados no controle da hanseníase, ainda há muito a ser feito para sustentar os ganhos obtidos e continuar a reduzir a incidência da doença, uma vez que a eliminação da doença foi definida pela OMS como prevalência menor que um caso em cada 10.000 habitantes (WHO, 2008).

Dentre os 16 países que notificaram mais de 1000 casos novos de hanseníase no ano de 2009, o Brasil ocupa o 2º lugar, ficando atrás apenas da Índia, que apresentou 133.717 novos casos neste ano (WHO, 2010) (Tabela 1).

Tabela 1: Países mais endêmicos para hanseníase no mundo. WHO, 2010.

Nº	País	Detecção de novos casos de Hanseníase						
		2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
1	Bangladesh	8 712	8 242	7 882	6 280	5 357	5 249	5 239
2	Brasil	49 206	49 384	38 410	44 436	39 125	38 914	37 610
3	China	1 404	1 499	1 658	1 506	1 526	1 614	1 579
4	Rep. Dem. Congo	7 165	11 781	10 369	8 257	8 820	6 114	5 062
5	India	367 143	260 063	169 709	139 252	137 685	134 184	133 717
6	Etiopia	5 193	4 787	4 698	4 092	4 187	4 170	4 417
7	Indonésia	14 641	16 549	19 695	17 682	17 723	17 441	17 260
8	Madagascar	5 104	3 710	2 709	1 536	1 644	1 763	1 572
9	Moçambique	5 907	4 266	5 371	3 637	2 510	1 313	1 191
10	Myanmar	3 808	3 748	3 571	3 721	3 637	3 365	3 147
11	Nepal	8 046	6 958	6 150	4 235	4 436	4 708	4 394
12	Nigeria	4 799	5 276	5 024	3 544	4 665	4 899	4 219
13	Pilipinas	2 397	2 254	3 130	2 517	2 514	2 373	1 795
14	Sri Lanka	1 925	1 995	1 924	1 993	2 024	1 979	1 875
15	Sudão	906	722	720	884	1 706	1 901	2 100
16	Rep. da Tanzania	5 279	5 190	4 237	3 450	3 105	3 276	2 654
Total		491 635	386 424	285 257	247 022	240 664	233 263	227 831
Total Global		514 718	407 791	299 036	265 661	258 133	249 007	244 796

Fonte: Adaptado de WHO (2010).

Em 2008, o Brasil apresentou coeficiente de detecção geral muito alto (20,56 / 100.000 habitantes); uma análise comparativa entre a detecção de casos novos nos anos de 2001 e 2008 observou-se um declínio de 45.874 para 38.992. A região Sudeste apresentou coeficiente igual a 8,81 / 100.000 em 2008. Neste mesmo ano, no estado de Minas Gerais, foram detectados 1.935 novos casos, e o coeficiente de detecção geral

observado foi de 9,75/100.000 habitantes, havendo um índice de redução quando comparado ao ano de 1990 (17,55 / 100.000 habitantes) (BRASIL, 2009).

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; PATROCINIO *et al.*, 2005). A mucosa nasal é a principal porta de saída de bacilos em pacientes com hanseníase multibacilar não tratados (DE WIT *et al.*, 1993; CARDOSO, 2006).

Os bacilos são raramente encontrados na pele intacta, sendo apenas as lesões ulceradas porta de saída de bacilos (YAWALKAR, 2009). Provavelmente, os pacientes multibacilares (MB) não tratados são a maior fonte de transmissão de *M. leprae*, uma vez que podem liberar até 100 milhões de bacilos de hanseníase de suas secreções nasais diariamente (WATERS, 1981). 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, 2002).

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).

É importante ressaltar que mesmo convivendo durante muito tempo na mesma casa com o doente não tratado, a maioria das pessoas não adoece. Cerca de 90% da população nunca contrairá a doença por possuir uma resistência natural ao bacilo (LOMBARDI & SUARÉZ, 1997).

1.4. Microbiologia

O *M. leprae* é um parasita intracelular obrigatório, com afinidade por células cutâneas e por células dos nervos periféricos, e se instala no organismo da pessoa infectada, podendo se multiplicar por divisão binária, em média, de 11 a 16 dias (BRASIL, 2002). O bacilo foi descoberto por Gerhard Henrik Armauer Hansen em 1873 como o primeiro agente causador de uma doença infecciosa (RODRIGUES, 2005).

O *M. leprae* é um bastonete reto ou ligeiramente encurvado, de 1 a 8 micra de comprimento por 0,2 a 0,5 micra de largura. Cora-se em vermelho pela Fucsina e não se descora pelo álcool e ácidos, o que o caracteriza como Bacilo Álcool-ácido Resistente (BAAR) (BRYCESON & PFALTZGRAFF, 1990; COLSTON, 1993).

Nos esfregaços de linfa e nos cortes histológicos, os bacilos podem ser bem visualizados pela técnica de Ziehl-Nielsen e Fite-Faraco modificado, respectivamente (JOPLING & McDOUGALL, 1991). Nos tecidos infectados, os bacilos são vistos isolados ou agrupados em arranjos denominados globias. As globias representam uma característica peculiar do *M. leprae*, nas quais as micobactérias estão unidas por uma

substância chamada gléia, que torna difícil a sua separação (BRENNAN,1986; BRYCESON & PFALTZGRAFF, 1990; JOPLING & McDOUGALL, 1991; REES, 1989).

Na microscopia eletrônica, o bacilo mostra uma estrutura comum ao gênero *Mycobacterium*: cápsula, parede celular, membrana e citoplasma (BRYCESON & PFALTZGRAFF, 1990); a cápsula é um material vesicular ou espumoso, eletrotransparente, próprio do *M. leprae* (Figura 2A). Compartilha com outras micobactérias características como a abundância de lipídios na forma de ácido micólicos (ácidos graxos saturados de elevados pesos moleculares) e lipoarabinomanana (LAM) em seu envelope celular; apresenta mais externamente, glicolipídios, com destaque para o glicolipídio fenólico 1 (PGL-1), presente exclusivamente no *M. leprae* (Figura 2B) (BRYCESON& PFALTZGRAFF, 1990).

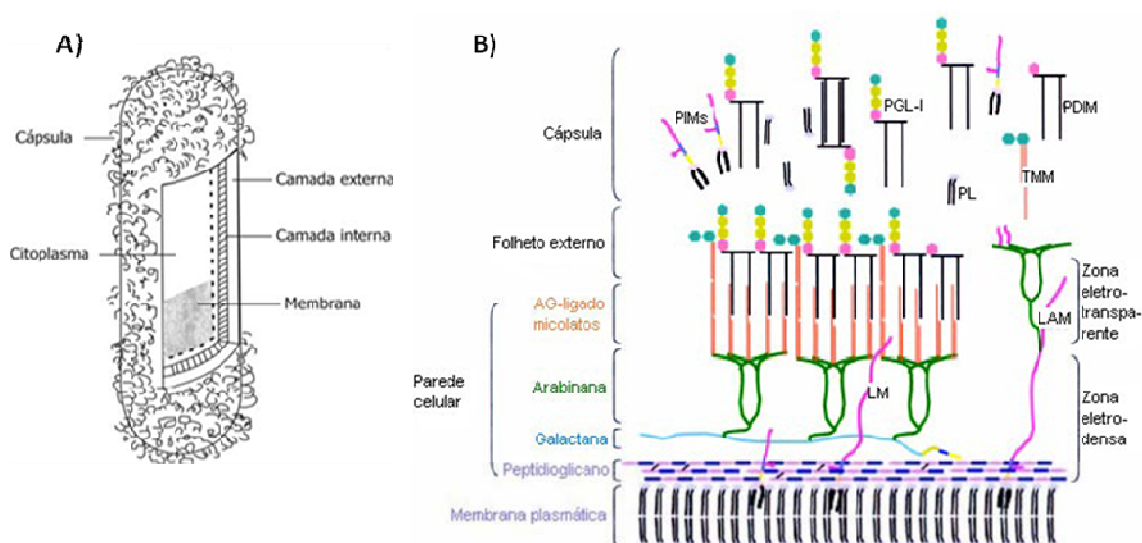


Figura 2 - (A) Representação esquemática do bacilo. B) Modelo esquemático do envelope celular do *M. leprae* (LM: lipomanana; LAM: lipoarabinomanana; TMM: trealose monomicolato; PIMs: fosfatidilinositol manosídeos; PDIM: ftiocerol dimicocerosato; PL: fosfolipídio), adaptado (Brycesson & Pfaltzgraff, 1990; Scollard *et al.*, 2006).

Os principais elementos químicos do *M. leprae*, em torno de 20, são antígenos de baixa potência possíveis de serem identificados no soro de pacientes com hanseníase. Brennan, em 1981, descreveu o glicolípido fenólico-1 (PGL-1) mostrando sua especificidade ao *M. leprae* através de uma pequena parte da molécula chamada epítipo (BRENNAN, 1986; SCOLLARD, 2006).

O recente seqüenciamento do genoma do *M. leprae* (COLE *et al.*, 2001) reavivou o interesse em investigações básicas de suas características bioquímicas, metabólicas e seu potencial patogênico. A comparação do genoma do bacilo com o genoma do *M. tuberculosis* sugere uma evolução redutiva, visto por sua menor constituição genética (3,3 Mb para *M. leprae* versus 4,4 Mb para *M. tuberculosis*) e por uma redução significativa no teor de G + C (58% para *M. leprae* versus 66% para *M. tuberculosis*).

Uma das características mais marcantes do genoma da *M. leprae* é que ele possui 1.133 genes inativados (genes perdidos através da mutação, ou pseudogenes), em comparação a seis pseudogenes em *Mycobacterium tuberculosis* (WILLIAMS, 1992). Além disso, um grande número de genes foram aparentemente excluídos, o que deixa o *M. leprae* com menos de 50% de seu genoma codificando genes funcionais (SCOLLARD *et al.*, 2006);

Análises do genoma do bacilo têm revelado defeitos em vias catabólicas, sua regulação e sistemas de transporte, justificando assim, o fato do *M. leprae* ser um patógeno intracelular obrigatório; isto poderia explicar o seu longo tempo de geração e sua incapacidade de se multiplicar *in vitro* (RODRIGUES, 2005).

1.5.Diagnóstico

Para a hanseníase, é realizado o diagnóstico clínico por meio de uma avaliação dermatoneurológica, buscando-se identificar sinais clínicos da doença. A avaliação dermatológica visa identificar as lesões de pele, pesquisando a sensibilidade nas mesmas, uma vez que a alteração de sensibilidade nas lesões é uma característica típica da doença. A avaliação neurológica é constituída pela inspeção dos olhos, nariz, mãos e pés, palpação dos troncos nervosos periféricos, avaliação da força muscular e avaliação de sensibilidade nos olhos, membros superiores e membros inferiores (BRASIL, 2002).

A baciloscopia fornece apoio para o diagnóstico clínico. É um exame microscópico que pesquisa a presença do bacilo diretamente nos esfregaços de raspados intradérmicos das lesões hansênicas ou de outros locais de coleta selecionados: lóbulos auriculares e/ou cotovelos e joelhos, e lesão quando houver (BRASIL, 2002). Porém, são necessários no mínimo 100.000 bacilos por grama de tecido para que a detecção pela coloração de BAAR (bacilo álcool-ácido resistente) seja confiável (SHEPARD & McRAE, 1968).

A confirmação do diagnóstico da hanseníase em casos duvidosos mostra-se como um importante motivo para a realização de exames histopatológicos. Como em qualquer outra doença, espera-se um resultado definitivo, entretanto, este resultado apresenta algumas limitações, pois nem sempre se detectam bacilos em pacientes com sintomatologia característica, já que existem controvérsias sobre a eficácia da microscopia para a identificação do bacilo da hanseníase em esfregaços e biópsias (HARDAS *et al.*, 1981).

Por nem sempre evidenciar o *M. leprae* nas lesões hansênicas ou em outros locais de coleta, resultados negativos da baciloscopia não afastam o diagnóstico da hanseníase (BRASIL, 2002). Vale ressaltar que este exame não detecta a presença do bacilo em pacientes do pólo tuberculóide.

Em virtude da dificuldade de encontrar bacilos álcool-ácido resistentes por meio de métodos histopatológicos nas fases iniciais da doença, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tem sido usada com sucesso na detecção de bacilos presentes em pequenas quantidades nos tecidos (DONOGHUE *et al.*, 2001). A maior vantagem da PCR sobre outros métodos diagnósticos assenta-se na sua rápida, específica e sensível identificação do microorganismo, que pode ser feita analisando amostras biológicas brutas. Isto é muito importante, quando tratamos de microorganismos, cuja cultura é difícil, como o *M. leprae* (KANG *et al.*, 2003).

1.6.Reação em cadeia da polimerase para hanseníase

A PCR é um método que vem revolucionando a prática da Biologia Molecular, e foi inicialmente descrito por Saiki, Mullis e cols., em 1985, na revista Science (SAIKI *et al.*, 1985). Esta técnica consiste em ampliar seletivamente uma única molécula de DNA ou RNA milhões de vezes em algumas horas, o que permite a detecção e a análise de seqüências de genes específicos na amostra de um paciente, animal ou organismo sem a clonagem e sem a necessidade de hibridizações (“*Southern ou northern blotting*”).

O método baseia-se na amplificação de regiões pré-selecionadas, por ação da enzima Taq polimerase, que aliada a iniciadores (*primers*), que são oligonucleotídeos curtos, se hibridizam com os filamentos opostos da seqüência-alvo e desencadeiam a

síntese da sequência de DNA-complementar. Portanto, partes de um gene (em geral os *exons*) do DNA podem ser amplificadas de maneira exponencial com o uso de *primers* específicos conhecidos para estudo da hanseníase (HACKEL, 1990; SANTOS *et al.*, 1993; SANTOS *et al.*, 1999; WILSON, 1993; WOODS & COLE, 1989).

Nos últimos anos, técnicas moleculares, como a PCR, foram desenvolvidas para identificar microorganismos como *M. leprae* (BRENNAN, 1994; JOB *et al.*, 1997; KURABACHEW *et al.*, 1998; SANTOS *et al.*, 1993; SANTOS *et al.*, 1995; SANTOS *et al.*, 1999; WICHITWECHKARN *et al.*, 1995; De WIT *et al.*, 1991; De WIT *et al.*, 1993; PULST, 2000; RAFI *et al.*, 1995).

A identificação definitiva deste bacilo é problemática, devido ao fato de o *M. leprae* não ser um organismo cultivável. Esse problema se confunde pelo aumento da prevalência de outras infecções da pele por micobactérias (SCOLLARD 2006). Ensaio moleculares têm sido desenvolvidos para a detecção de *M. leprae* diretamente a partir de amostras de pacientes, utilizando os dados genéticos disponíveis (GILLIS & WILLIAMS, 1991; KATOCH, 1999; SCOLLARD *et al.*, 2006; KRAMME *et al.*, 2003; 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).

Vários genes diferentes do *M. leprae* têm sido utilizados no desenvolvimento de ensaios de PCR para a detecção do mesmo em amostras clínicas, tais como sequências de DNA que codificam os antígenos 18-kDa, 36-kDa e 65-kDa, ou as que não codificam antígenos, como repetitivas do *M. leprae* ou de RNA ribossômico (MIRSA *et al.*, 1995).

Tem-se obtido resultados também com PCR tempo-real para *M. leprae* (KRAMME *et al.*, 2003; SHAMSI *et al.*, 2006; MARTINEZ *et al.*, 2006), além de outras técnicas como Nested-PCR, PCR in situ e RT-PCR (KRAMME *et al.*, 2003; PHETSUKSIRI *et al.*, 2006;

MARTINEZ *et al.*, 2006). Dayal e colaboradores (2005) relataram o uso de PCR *in situ* para detecção de *M. leprae* em 61,5% das amostras de biópsia de lesão de pele de pacientes DD e DV. Phetsuksiri e colaboradores (2006) relataram a RT-PCR (transcriptase reverse) como forma de avaliar a viabilidade do bacilo nas amostras analisadas para o diagnóstico de hanseníase. A PCR Tempo-real obteve 91,3% de sensibilidade usando *primers* que codificam genes para antígenos 85-B, e foi 17,7% superior a PCR Convencional (MARTINEZ *et al.*, 2006).

A PCR em tempo real utiliza uma curva padrão, que visa encontrar o melhor ajuste entre os pontos, construindo o gráfico de regressão linear e calculando o coeficiente de correlação R^2 , o *slope* (inclinação da curva) e o *y* (*intercept*). O R^2 mede o quão próximo é o ajuste entre as repetições e os valores individuais dos Ciclos Iniciais da Amplificação (CL) 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 CL para uma amostra com quantidade 1 (APPLIED BIOSYSTEMS, 2006).

A técnica de PCR torna possível detectar com alta sensibilidade e especificidade o bacilo de Hansen, quantificar e determinar a viabilidade do bacilo em sítios específicos, dando valiosas informações a respeito da infecção e transmissão do *M. leprae*, além de verificar a eficácia da poliquimioterapia (PQT), já que também detecta atividade de transcrição do bacilo, pela síntese de RNA (KURABACHEW, 1998; CHAE *et al.*, 2002). Ademais, a PCR se sobressai estatisticamente sobre os testes microscópicos de tecidos biopsiados, principalmente nas formas paucibacilares (SHI *et al.*, 2000; SUGITA, 2001).

Compreender a epidemiologia da hanseníase é um pré-requisito para o controle efetivo da doença. Pelo fato de o *M. leprae* não poder ser cultivado *in vitro*, torna-se

praticamente impossível avaliar a exposição, o início da infecção, e vários aspectos da progressão da doença. Como consequência, a sequência de eventos que devem ocorrer para a transmissão da hanseníase é mal compreendida. Portanto, marcadores moleculares podem ser de grande valia para o conhecimento da espécie bem como marcadores linhagem-específicos na avaliação da exposição ao *M. leprae* e detecção dos diferentes padrões de transmissão da doença. Assim, a PCR apresenta potencial para ser uma ferramenta de apoio ao diagnóstico clínico e histopatológico da hanseníase.

2 - OBJETIVOS

Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi desenvolver marcadores moleculares, compostos por *primers* e sondas específicas dos genes *ML0024* e *85B* do genoma de *M. leprae* que pudessem auxiliar no diagnóstico da hanseníase, por meio da PCR em tempo real para detecção e quantificação de DNA do bacilo em amostras de biópsia de lesão de pele de pacientes com hanseníase, atendidos no Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária e Hanseníase, Hospital de Clínicas, Universidade Federal de Uberlândia (CREDESH/HC/UFU)

Objetivos específicos

- Detectar a presença do bacilo pela PCR em tempo real, principalmente nas formas paucibacilares da doença;
- Realizar a quantificação da carga de DNA de *M. leprae* encontrada pela PCR em tempo real nas amostras de biópsia de lesão de pele;
- Correlacionar os resultados encontrados pela PCR em tempo real com os resultados dos exames baciloscópicos de esfregaço dérmico e de biópsia de lesão de pele, bem como com as formas clínicas da doença.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Caracterização dos pacientes e seleção das amostras

Os pacientes com hanseníase atendidos no Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária e Hanseníase, Hospital de Clínicas, Universidade Federal de Uberlândia (CREDESH/HC/UFU), são classificados de acordo com o espectro de Ridley e Jopling (1966), em: tuberculóide (T), dimorfo-tuberculóide (DT), dimorfo-dimorfo (DD), dimorfo-virchowiano (DV) e virchowiano (V). Para fins de tratamento, os pacientes receberam uma classificação operacional de paucibacilares (PB) ou multibacilares (MB) (BRASIL, 2002). Os PB apresentam IB de esfregaço dérmico negativo e cinco lesões de pele ou menos, enquanto que os multibacilares apresentam seis ou mais lesões e o IB de esfregaço dérmico pode ser positivo e/ou negativo. Para a forma DT, os pacientes foram definidos em DT- ou DT+, sendo que pacientes DT+ apresentam IB de esfregaço dérmico entre 0 e 2 (ILA, 2002).

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.

A imunidade celular específica ao *M. leprae* foi avaliada pelo teste intradérmico de Mitsuda, sendo considerado positivo um valor $\geq 4\text{mm}$ (JOPLING & McDOUGALL, 1991). Para avaliação da resposta humoral, o teste sorológico ELISA contra o antígeno PGL-1, específico ao bacilo foi realizado, considerando-se positivo um resultado $\geq 1,1$.

A extração de DNA das diversas amostras recebidas pelo Laboratório de Patologia Molecular e Biotecnologia (PMBIO) do CREDESH/HC/UFU, dentre elas as biópsias de lesão de pele dos pacientes, são realizadas e o material genético é armazenado e identificado, constituindo assim, o banco de DNA do CREDESH.

Para o presente estudo, foram selecionadas 185 amostras deste banco de amostras, oriundas de pacientes virgens de tratamento no momento da coleta da biópsia de lesão de pele. Foram selecionados materiais genéticos mais recentes.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFU sob o parecer nº 499/08 (Anexo I). Todos os pacientes que concordam em participar das pesquisas realizadas no CREDESH assinam um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo II).

3.2.Obtenção de DNA para o banco de amostras do CREDESH

A biópsia de lesão de pele é realizada pela equipe médica do CREDESH/HC/UFU utilizando um *punch* de 3mm³. Após a coleta, as amostras são encaminhadas ao PMBIO, onde são identificadas, pesadas em balança de precisão e acondicionadas a uma temperatura de 80°C negativos para posterior obtenção de DNA.

Neste estudo, foram realizados testes para diminuir o tempo gasto para a realização da extração do material genético. Anteriormente, eram gastos três dias para que este procedimento fosse concluído.

Após vários testes, realizados com amostras de hansenoma, foi possível isolar o material genético das amostras de biópsias de pele, pelo método Proteinase K, seguido

de extração por fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (24:24:1) descrito por Sambrook (1989), reduzindo o tempo para 8 horas.

Após isolamento, o DNA extraído foi diluído em água ultrapura e acondicionado a -20°C negativos, no banco de amostras de DNA do CREDESH/HC/UFU.

3.3. Qualificação do DNA extraído das biópsia de lesão de pele

A quantidade de DNA a ser utilizado na PCR foi determinada a partir de uma diluição em série nas concentrações de 580ng. A reação foi realizada utilizando-se 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 300 nM de cada *primer (forward e reverse)* do gene *NRAMP*. 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.

Todas as 185 amostras selecionadas para este estudo foram qualificadas a partir das curvas de amplificação da qPCR *NRAMP*.

3.4.Desenho de marcadores moleculares

Os marcadores moleculares, *primers* e as sondas fluorescentes, foram desenhados utilizando-se o *software Primer Express® (Applied Biosystems)*. Para avaliar a qualidade do DNA extraído das amostras de biópsia de lesão de pele, foi selecionado

um par de *primers* que amplifica parte do gene humano *NRAMP1* (*natural resistance associated macrophage protein 1*), que foi utilizado como controle de amplificação.

Para detectar a presença do DNA de *M. leprae*, foram desenhados dois pares de *primers* e duas sondas marcadas 5' TAMRA e 3' FAM. O primeiro par de *primers* amplifica região do gene, que consta de 252 pb (29775 – 30026) e codifica uma proteína de 83 aminoácidos (aa) cuja função é desconhecida enquanto o segundo par amplifica parte do gene *fpbB*, que codifica um complexo antigênico presente na parede celular do *M. leprae* (Nº de acesso GeneBank: 60934). Esta região foi escolhida uma vez que é conhecida por sua alta especificidade e sensibilidade, como relatado em estudo anterior (MARTINEZ *et al.* 2006) (Tabela 2).

Tabela 2: Sequências dos marcadores moleculares, *primers* e sondas, utilizadas para testes de PCR em tempo-real.

PCR em tempo-real (Gene)	Nº de acesso ao Gene Bank	Oligonucleotídeos 5' -- 3'	Fragmento amplificado
NRAMP (NRAMP)	AY363243.1	<i>forward:</i> GACCTGACTCTGTGTGTGTGTACG <i>reverse:</i> TTCTGTGCCTCCCAAGTTAGC <i>probe:</i> TGACATGAATACGCAAGGGGCAGGA	122 pb
ML0024 (ML0024)	AL583917.1	<i>forward:</i> ACCGGAGCTTGGAATACACT <i>reverse:</i> TCATCTCCTGCACCCCGA <i>probe:</i> CACATAGGGTCCAGTCGTGCCGC	69pb
85-B (fpbB)	X60934.1	<i>forward:</i> CGGTTCTCGGCCCTAATAC <i>reverse:</i> CGACAACGAGCCAGCATAGA <i>probe:</i> GGCAGCTTATCACCCCGATCAGTTC	67 pb

3.5.PCR em tempo real

3.5.1. Clonagem e Restrição Enzimática

Para a clonagem dos fragmentos amplificados de 68 pb (ML0024) e 67 pb (85B) do genoma do *M. leprae*, utilizou-se inicialmente produtos amplificados a partir de PCR convencional. Posteriormente, foi utilizado o kit *TA Cloning®* (Invitrogen, San Diego, CA) para inserir estes fragmentos amplificados em plasmídeos que foram replicados em bactérias competentes XL-1 *Blue* (Invitrogen, San Diego, CA). Após extração do DNA plasmidial, os produtos obtidos foram sequenciados, e as sequências obtidas pela clonagem foram alinhadas e confirmadas pelo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), no Banco de Dados do NCBI (*National Center of Biotechnology Information*).

Posteriormente, os plasmídeos contendo os insertos foram linearizados com a enzima de restrição Xho1 (Invitrogen, San Diego, CA), após análise de sítios de restrição específicos pelo programa *Online Analysis tools – Restriction Endonucleases, Webcutter 2.0*.

Após linearização, os plasmídeos foram quantificados em espectrofotômetro.e Nanodrop 1000 (Uniscience), e a partir dessa quantificação inicial, foi possível obter a concentração (número de cópias por microlitro) dos plasmídeos linearizados, utilizando-se a fórmula descrita anteriormente por Yin *et al.* (2001), na qual $C = 5 \times 10^{-5}$ g/ml e MW = peso molecular do produto de PCR (pares de base x 6,58 x 10² g):

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

MW

3.5.2. Condições das reações qPCR *ML0024* e qPCR 85B

Às reações de qPCR, com volume final de 25,0 µl, foram incluídos 200ng (4 µL) do DNA extraído das amostras de biópsia de lesão de pele. 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 equipamento ABI 7300 (*Applied Biosystems*) com o seguinte programa: 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, 40º ciclos a 95°C por 15 s e 60°C por 1 min. A análise da fluorescência foi avaliada pelo software SDS System (*Applied Biosystems*). Foram consideradas positivas as amostras cujas duplicatas atingiram o *threshold*, limiar ajustado na região associada ao crescimento exponencial dos produtos da qPCR.

3.5.3 – Limite inferior de detecção da qPCR

O limite inferior de detecção foi determinado pela análise das diluições seriadas de base 10 realizadas com os plasmídeos clonados, partindo da concentração de 10⁵ cópias por microlitro até 0,048 cópias por microlitro, visando identificar a maior diluição que apresentava amplificação tanto pela qPCR *ML0024* quanto pela qPCR 85B.

3.5.4. Construção da Curva Padrão da PCR em tempo real

A partir das concentrações iniciais dos plasmídeos clonados, foram realizadas diluições seriadas de razão 10 (10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 cópias de DNA de *M. leprae* por reação) para construção das curvas padrão referentes a cada par de *primers* utilizado. Essas diluições foram aliquotadas e armazenadas a -80°C para utilização em duplicata em todas as placas para quantificação de DNA do bacilo.

Em cada placa, a curva padrão foi considerada controle positivo da reação e a mistura da reação sem a presença de DNA foi considerado o controle negativo. Todos os experimentos foram feitos em duplicata.

A curva padrão adicionada em cada placa foi formada pelos pontos 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 plasmídeos, referentes a cada par de *primers* utilizado (ML0024 e 85B). Para análise dos resultados da qPCR, foi considerado o *threshold* automático (estabelecido pelo equipamento) em todas as reações, para obter o melhor ajuste entre os pontos.

O *slope* foi calculado para 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 2uL de DNA extraído. Assim, para calcular o número de cópias de *M. leprae* por *punch* de 3mm^3 , o valor dado pelo *software* foi multiplicado pela quantidade de água ultra pura utilizada para diluir o *pellet* de DNA (considerando que todo o DNA presente no tubo era correspondente ao DNA presente na biópsia do paciente).

3.5.5. Especificidade dos marcadores moleculares

Os *primers* desenhados foram testados quanto à especificidade utilizando-se material genético isolado hansenoma; de seis espécies do gênero *Mycobacterium* (*Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium lepraemurium*); de seis microrganismos intracelulares (*Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi* e *Paracoccidioides brazilienses*).

Foram utilizadas dezenove amostras de sangue de recém-nascidos, visando verificar a ocorrência de reações cruzadas pela qPCR *NRAMP* e o genoma humano, considerando-se que o *M. leprae* não passa pela barreira placentária e que recém-nascidos ainda não foram expostos ao bacilo.

3.6. Análise Estatística

Os testes estatísticos foram realizados utilizando-se o *software* BioEstat (versão 5.0). As curvas padrão para cada qPCR utilizando os valores dos ciclos iniciais de amplificação contra o quantidade de número de cópias de DNA foram calculadas pelo equipamento. Para as comparações entre as médias dos números de cópias de DNA do *M. leprae* e as médias dos ciclos iniciais de amplificação obtidos pelas qPCR *ML0024* e qPCR 85B, utilizou-se o Teste t de Student. O teste Qui-quadrado foi utilizado para avaliar se houve diferença entre as positivities encontradas pelos dois marcadores moleculares. O teste Kappa foi aplicado para avaliar a concordância entre a qPCR

ML0024 e a qPCR 85B e os exames utilizados para a classificação clínica dos pacientes. O teste de correlação linear de Pearson (r) foi utilizado para avaliar a correlação existente entre os testes moleculares e os testes baciloscópicos bem como as formas clínicas. Um valor de alfa de 0,05 foi usado para todas as análises.

4.RESULTADOS

4.1.Caracterização dos pacientes

Na classificação das formas clínicas, observou-se que as médias das leituras do teste de Mitsuda apresentaram-se de forma inversamente proporcional à carga bacilar, avaliada pelas médias dos índices baciloscópicos de esfregaço dérmico e de biópsia de lesão de pele, enquanto que o teste sorológico ELISA foi proporcional à carga bacilar, aumentando em direção ao pólo V da doença, concordando com o espectro de Ridley e Jopling (1966) (Figura 3).

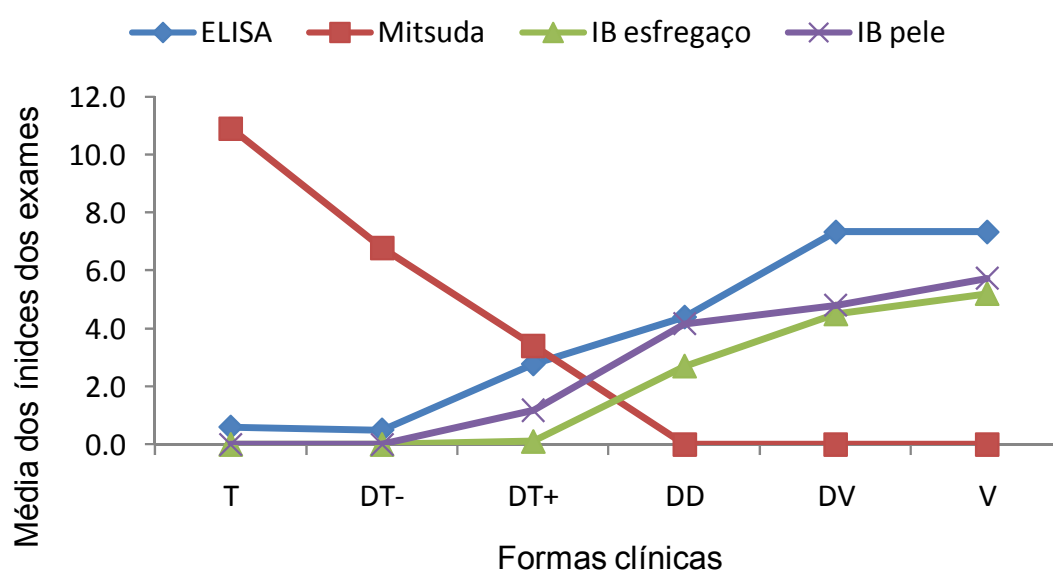


Figura 3: Análise de correlação entre testes de Mitsuda, Elisa, IB de esfregaço dérmico e de biópsia de lesão de pele dos pacientes com hanseníase, conforme o espectro de Ridley e Jopling (1996).

4.2. Qualificação do DNA extraído das amostras de biópsia de lesão de pele

Foi observado que excesso de material genético inibia a PCR em tempo real qualitativa do gene *NRAMP*, uma vez que a reação contendo 580ng de material genético não mostrou amplificação. Foi observada amplificação para todas as outras concentrações estudadas, o que permitiu definir que a melhor curva de amplificação ocorreu com concentrações próximas a 40ng (Figura 4).

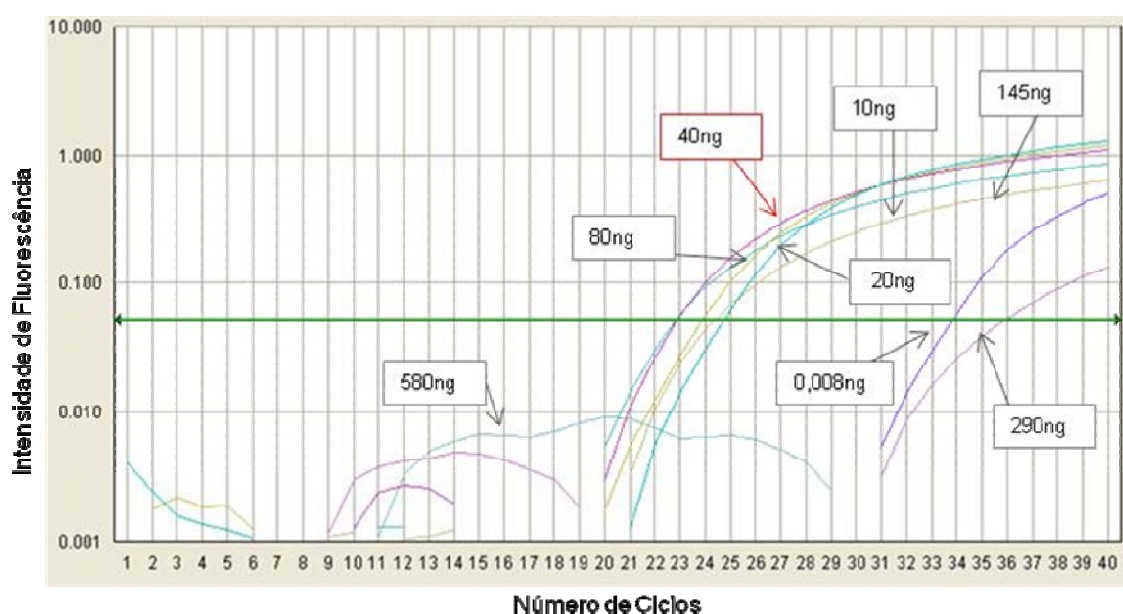


Figura 4: Padronização da quantidade de DNA para realização da qPCR *NRAMP*.

Ao realizar a qPCR *NRAMP* observou-se amplificação do material genético entre os ciclos iniciais de amplificação 24 e 28, indicando que o DNA extraído era de boa qualidade (Figura 5). Após esta qualificação, o material genético estava apto a ser analisando pela qPCR *ML0024* e qPCR *85B*.

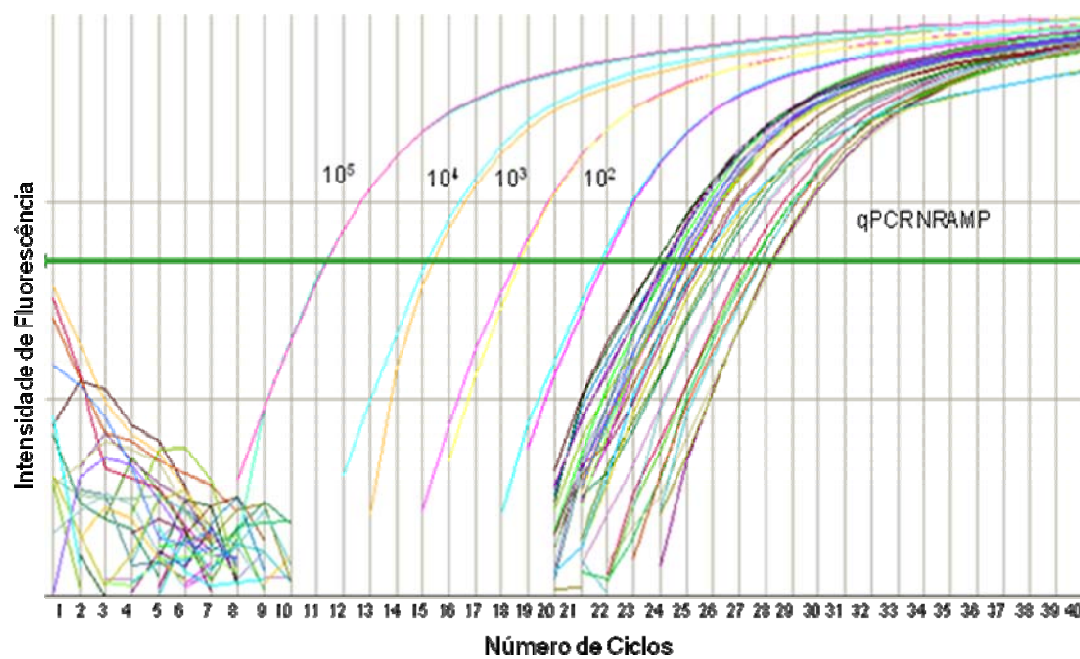


Figura 5: Análise qualitativa do DNA total extraído das amostras de biópsia de lesão de pele pela PCR em tempo real para o gene humano *NRAMP*.

4.3.PCR em tempo real

4.3.1. Limite inferior de detecção da qPCR

Foram observadas amplificações das duplicatas até 0,05 e de 0,09 bacilos por microlitro de água ultra-pura para a qPCR *ML0024* (Figura 6A) e para a qPCR 85B (Figura 6B), respectivamente.

O limite confiável de detecção estabelecido foi de 3 cópias do genoma do bacilo tanto para a qPCR *ML0024* quanto para a qPCR 85B, e foram consideradas positivas, amplificações iniciadas anteriores ao ciclo 37. Amplificações a partir deste ponto foram consideradas negativas nesta pesquisa. A qPCR foi realizada em duplicata para cada diluição.

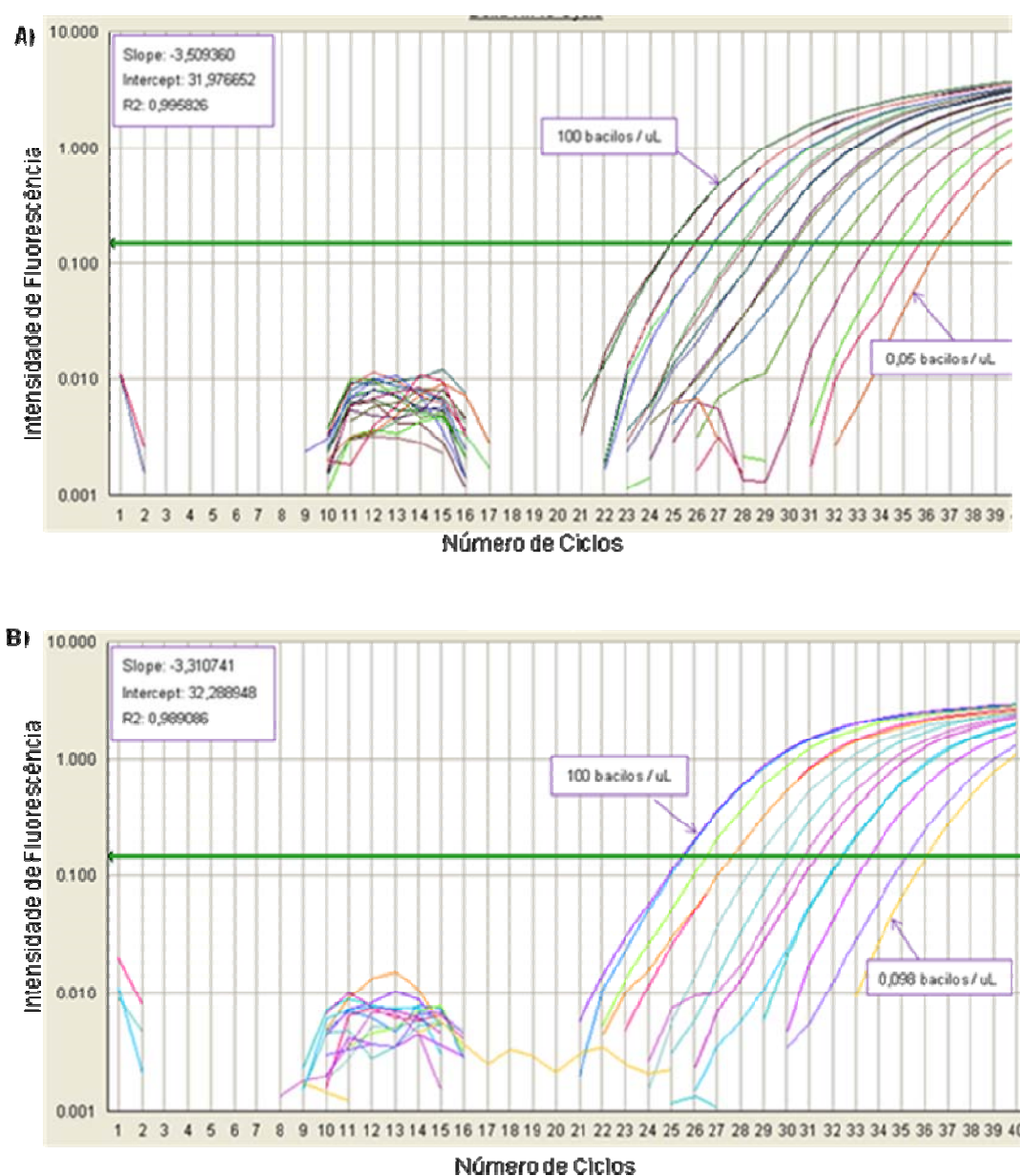


Figura 6: Limite inferior de detecção de DNA de *M. leprae* pela qPCR: A) Limite inferior de detecção de DNA de *M. leprae* pela qPCR ML0024; B) Limite inferior de detecção de DNA de *M. leprae* pela qPCR 85B.

4.3.2. Construção da Curva Padrão para PCR em tempo real

A curva padrão obtida na qPCR *ML0024* e na qPCR 85B foram satisfatórias com as condições descritas na metodologia, e apresentaram coeficientes de correlação acima de 0,99 e eficiência acima de 90,0%, em ambas (Figura 7).

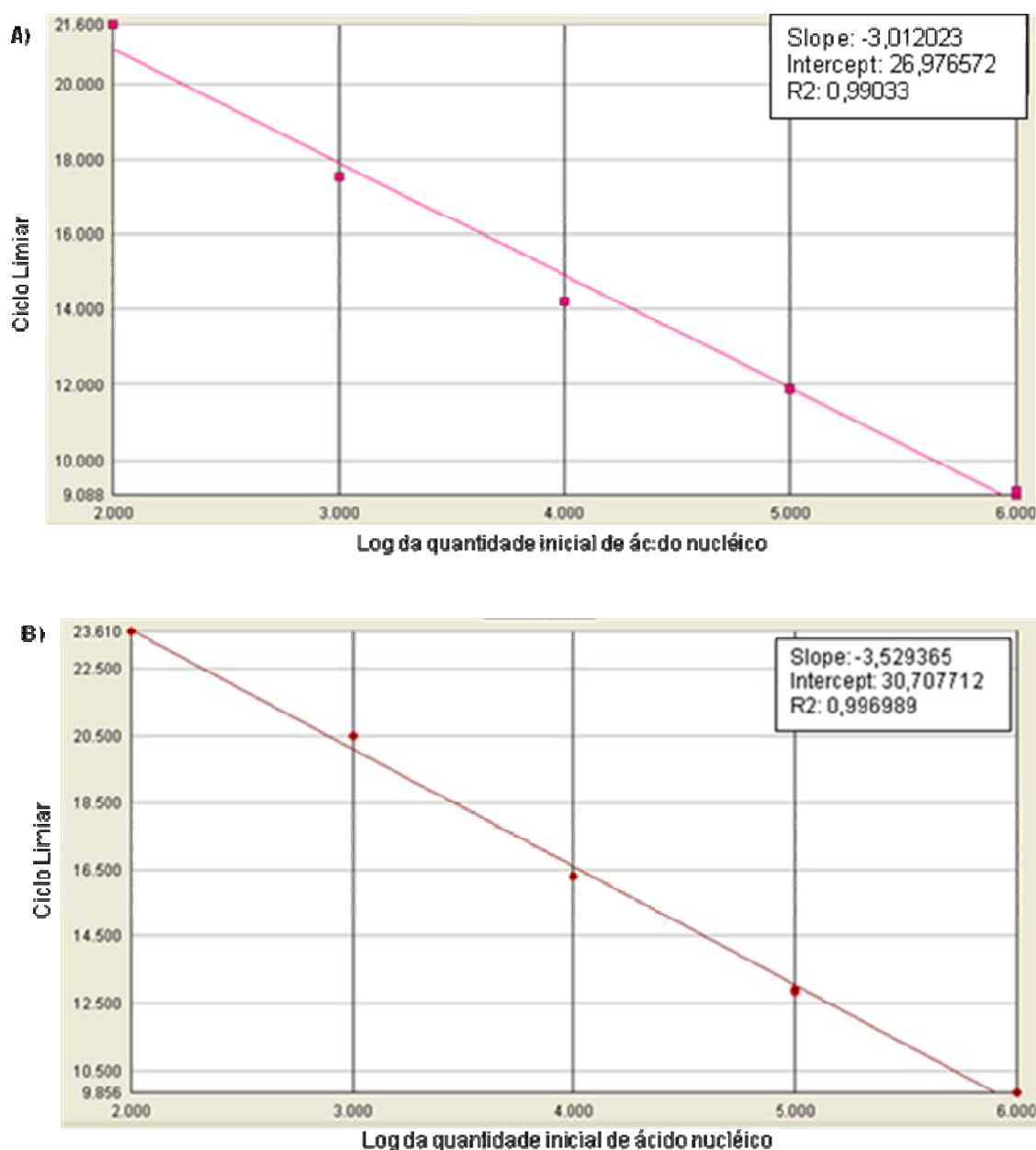


Figura 7: Curva padrão obtida pela PCR em tempo real. A) Curva padrão obtida na qPCR *ML0024*;

B) Curva padrão obtida na qPCR 85B.

4.3.3. Especificidade dos marcadores moleculares

Observou-se que os marcadores moleculares desenhados para o presente estudo foram altamente específicos, uma vez que apenas foram observadas amplificações para as amostras contendo *M. leprae* (Tabela 3), considerando-se 37 ciclos de amplificação.

Tabela 3: Especificidade dos marcadores moleculares testados pela qPCR ML0024 e qPCR 85B.

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

4.4. - qPCR *ML0024* e qPCR 85B

A qPCR *ML0024* detectou a presença do DNA do *M. leprae* em 59,45% (110/185) e a qPCR 85B em 57,29% (106/185) dos casos, não havendo diferença estatística entre elas ($p=0,9897$). O IB de esfregaço dérmico e o IB de lesão de pele detectaram, respectivamente, a presença do bacilo em 45,94% (85/185) e 44,86% (93/185) dos casos, sem significância estatística entre os métodos ($p=0,9909$) (Tabela 4). Associando a positividade dos dois testes moleculares, a detecção do DNA do bacilo alcançou 62,16% (115/185) dos casos analisados; esta detecção foi superior em 16,22% ao IB de esfregaço dérmico ($p=0,0309$) e 17,30% ao IB de biópsia de lesão de pele ($p=0,0209$).

Foi observada diferença estatística entre a detecção do bacilo pelo método convencional avaliada pelo IB de lesão de pele e a qPCR *ML0024* ($p=0,0449$) e qPCR 85B ($p=0,0453$). Apesar da positividade dos testes moleculares terem sido superiores em 14,06% para a qPCR *ML0024* e 12,97% para a qPCR 85B, com relação ao IB de esfregaço dérmico, não houve diferença estatística [qPCR *ML0024* ($p=0,0643$); qPCR 85B ($p=0,0901$)] (Tabela 4).

A qPCR *ML0024* e qPCR 85B detectaram o DNA de *M. leprae* em todas as amostras de pacientes das formas clínicas DD, DV e V, assim como o IB de esfregaço dérmico e IB de lesão de pele (Tabela 4).

Tabela 4: Distribuição dos pacientes por forma clínica segundo IB de esfregaço dérmico, IB de biópsia de lesão de pele, qPCR *ML0024* e qPCR 85B em biópsias de lesão de pele.

F.C.	IB esfregaço dérmico		IB biópsia de pele		qPCR <i>ML 0024</i>		qPCR 85B		TOTAL	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
T	(0/33)	0,00	(0/33)	0,00	(14/33)	42,42	(11/33)	33,33	33	17,84
DT-	(0/37)	0,00	(0/37)	0,00	(7/37)	18,91	(6/37)	16,21	37	20,00
DT+	(3/33)	9,09	(1/33)	3,03	(7/33)	21,21	(7/33)	21,21	33	17,84
DD	(30/30)	100,00	(30/30)	100,00	(30/30)	100,00	(30/30)	100,00	30	16,22
DV	(22/22)	100,00	(22/22)	100,00	(22/22)	100,00	(22/22)	100,00	22	11,89
V	(30/30)	100,00	(30/30)	100,00	(30/30)	100,00	(30/30)	100,00	30	16,22
	(85/185)	45,94	(83/185)	44,86	(110/185)	59,45	(106/185)	57,29	185	100,00

Nota: F.C. (Forma Clínica); T (Tuberculóide); DT- (Dimorfo-tuberculóide com IB de esfregaço dérmico negativo); DT+ (Dimorfo-tuberculóide com IB de esfregaço dérmico entre 0 e 2); DD (Dimorfo-dimorfo); DV (Dimorfo-virchowiano); V (Virchowiano); IB esfregaço

Dentre todos os casos negativos para o IB de esfregaço dérmico, a qPCR *ML0024* e qPCR 85B detectaram a presença do DNA do bacilo em 26,00% (26/100) e 23,00% (23/100), respectivamente. Entre aqueles negativos para o IB de lesão de pele, a qPCR *ML0024* foi positiva em 27,45% (28/102) e a qPCR 85B em 23,52% (24/102) (Figura 8).

Observou-se diferença significativa entre a positividade dos testes moleculares e os dois testes baciloscópicos ($p < 0,0001$) para as formas clínicas T, DT- e DT+.

A qPCR *ML0024* foi mais sensível que a qPCR 85B na detecção de 9,09% (3/33) dos casos T, contudo, esta diferença não foi significativa ($p = 0,2715$) (Figura 8).

Para as amostras da forma clínica DT-, observou-se maior detecção do bacilo pela qPCR *ML0024* e cinco amostras foram coincidentes na positividade para a esta e a qPCR 85B (Figura 8).

Nos casos da forma clínica DT+, a sensibilidade da qPCR *ML0024* e da qPCR 85B para detecção do bacilo foi significativamente (18,18%) superior à observada no IB de lesão de pele ($p = 0,0002$). Comparando com o IB de esfregaço dérmico, ambos os testes

moleculares foram 12,12% mais sensíveis para a detecção do *M. leprae* ($p=0,0283$) (Figura 8).

Quando associadas, a qPCR *ML0024* e a qPCR 85B detectaram 30,30% (10/33) de todos os casos DT+, enquanto que o do IB de esfregaço dérmico e de lesão de pele detectou em associação apenas 12,12% (4/33) dos casos com esta forma clínica ($p=0,0030$) (Figura 8).

Dentre as amostras negativas para qPCR *ML0024*, 2,16% (4/185) foram positivas para qPCR 85B, sendo um paciente da forma clínica DT- e três da forma DT+; 4,32% (8/185) foram positivas para qPCR *ML0024* e negativas para qPCR 85B, sendo que três eram da forma clínica DT+; dois DT- e três eram da forma T (Figura 8).

Paciente DT+	IB esfregaço dérmico	IB biópsia de pele	qPCR ML0024	qPCR 85B	Paciente DT-	IB esfregaço dérmico	IB biópsia de pele	qPCR ML0024	qPCR 85B	Paciente T	IB esfregaço dérmico	IB biópsia de pele	qPCR ML0024	qPCR 85B
1	-	-	-	-	1	-	-	+	+	1	-	-	-	-
2	-	-	-	-	2	-	-	-	-	2	-	-	+	+
3	-	+	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-
4	-	-	-	-	4	-	-	-	-	4	-	-	-	-
5	-	-	-	-	5	-	-	+	-	5	-	-	-	-
6	+	-	-	-	6	-	-	-	-	6	-	-	-	-
7	-	-	-	-	7	-	-	-	-	7	-	-	+	+
8	-	-	+	+	8	-	-	-	-	8	-	-	-	-
9	-	-	-	-	9	-	-	-	-	9	-	-	-	-
10	-	-	-	+	10	-	-	+	+	10	-	-	+	+
11	-	-	-	+	11	-	-	-	-	11	-	-	-	-
12	-	-	+	-	12	-	-	-	-	12	-	-	-	-
13	-	-	+	+	13	-	-	-	-	13	-	-	+	+
14	-	-	-	+	14	-	-	-	-	14	-	-	+	+
15	-	-	-	-	15	-	-	-	-	15	-	-	-	-
16	-	-	-	-	16	-	-	-	-	16	-	-	-	-
17	-	-	-	-	17	-	-	-	-	17	-	-	-	-
18	-	-	-	-	18	-	-	-	-	18	-	-	-	-
19	-	-	-	-	19	-	-	-	-	19	-	-	-	-
20	-	-	-	-	20	-	-	+	+	20	-	-	-	-
21	-	-	-	-	21	-	-	-	-	21	-	-	+	+
22	-	-	-	-	22	-	-	-	+	22	-	-	-	-
23	-	-	-	-	23	-	-	+	+	23	-	-	+	+
24	-	-	-	-	24	-	-	-	-	24	-	-	+	-
25	-	-	+	+	25	-	-	-	-	25	-	-	+	-
26	-	-	-	-	26	-	-	-	-	26	-	-	+	+
27	+	-	+	+	27	-	-	-	-	27	-	-	+	+
28	+	-	+	-	28	-	-	-	-	28	-	-	-	-
29	-	-	+	-	29	-	-	-	-	29	-	-	+	-
30	-	-	-	-	30	-	-	-	-	30	-	-	-	-
31	-	-	-	-	31	-	-	+	-	31	-	-	-	-
32	-	-	-	-	32	-	-	-	-	32	-	-	+	+
33	-	-	-	-	33	-	-	-	-	33	-	-	+	+
					34	-	-	+	+					
					35	-	-	-	-					
					36	-	-	-	-					
					37	-	-	-	-					

Figura 8: Resultados dos testes baciloscópicos e moleculares dos pacientes com formas clínicas T, DT- e DT +.

A concordância entre os resultados da qPCR ML0024 e qPCR 85B foi superior a 90,00% e apresentou excelente replicabilidade. Entre os testes baciloscópicos e os testes moleculares as concordâncias observadas foram superiores a 80,00%. As qPCR ML0024 e 85B apresentaram dois e três resultados falso-negativos (Tabela 5).

Tabela 5: Concordância entre qPCR ML0024 e qPCR 85B com IB de esfregaço dérmico e IB de biópsia de lesão de pele.

		qPCR ML 0024				qPCR 85B			
		Positivo	Negativo	Concordância	Kappa	Positivo	Negativo	Concordância	Kappa
IB esfregaço dérmico	Positivo (%)	84	1	85,41	0,77125*	83	2	86,49	0,77329*
	Negativo (%)	26	74			23	77		
IB biópsia de pele	Positivo (%)	82	1	84,32	0,6925*	82	1	86,49	0,7337*
	Negativo (%)	28	74			24	78		
qPCR 85B	Positivo (%)	102	4	93,51	0,8666*	-			
	Negativo (%)	8	71						

*p<0,0001

Nota: IB (Índice baciloscópio)

Para a qPCR ML0024 a detecção do DNA do *M. leprae* ocorreu, em média, no CL 24,80 para a forma clínica virchowiana, atingindo o CL 33,36 para a forma clínica tuberculóide. Para a qPCR 85B a detecção do DNA do bacilo ocorreu, em média, no CL 25,42 e 33,71 para as formas clínicas virchowiana e tuberculóide, respectivamente (Tabela 6). Observou-se correlação positiva entre as formas clínicas e as médias dos ciclos iniciais de amplificação para a qPCR ML0024 ($r=0,8693$; $p=0,0245$) e para qPCR 85B ($r=0,9364$; $p=0,0059$).

Quanto à quantificação do número de cópias do DNA do bacilo nas amostras positivas para a qPCR ML0024 e qPCR 85B, observou-se maiores valores no pólo virchowiano, tanto para a qPCR ML0024 quanto para a qPCR 85B (Tabela 6). Nenhuma

correlação significativa foi encontrada entre as formas clínicas e as médias do número de cópias do DNA do bacilo obtidos por qPCR *ML0024* ($r=0,6693$; $p=0,1459$); para a qPCR 85B estes valores apresentaram-se próximos à significância ($r=0,8857$; $p=0,0584$).

Tabela 6: Quantificação do *M. leprae* pelo ciclo inicial de amplificação e por número de cópias por *punch* de 3mm³ obtidos pela qPCR *ML0024* e pela qPCR 85B.

F.C.	qPCR ML 0024				qPCR 85B			
	CL		Nº cópias por punch 3mm ³		CL		Nº cópias por punch 3mm ³	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
T	33,36 ±	4.18	41,40 ±	58,32	33.71 ±	2.17	40,11 ±	63,88
DT-	32,72 ±	4.29	88,65 ±	135,57	33.41 ±	3.29	376,04 ±	717,64
DT+	33,40 ±	6.71	21,57 ±	49,70	32.85 ±	2.97	210,20 ±	317,33
DD	30,81 ±	9.43	379,72 ±	934,92	28.79 ±	3.06	2038,83 ±	5004,34
DV	30,13 ±	15.66	646,12 ±	1794,64	28.44 ±	3.25	11205,58 ±	36614,43
V	24.80 ±	8.07	26699,57 ±	125618,40	25.42 ±	3.11	15954,73 ±	27377,47

Nota: F.C. (Formas Clínicas); CL (Ciclo inicial de amplificação); T (Tuberculóide); DT- (Dimorfo-tuberculóide com IB de esfregaço dérmico negativo); DT+ (Dimorfo-tuberculóide com IB de esfregaço dérmico entre 0 e 2); DD (Dimorfo-dimorfo); DV (Dimorfo-virchowiano); V (Virchowiano).

Observou-se correlação inversamente proporcional e significativa entre o IB de esfregaço dérmico e as médias dos *Cts* para a qPCR *ML0024* ($r=0,-9515$; $p=0,0035$) e para qPCR 85B ($r=0,-9657$; $p=0,0017$), bem como entre o IB de lesão de pele e os testes moleculares [qPCR *ML0024* ($r=0,-9092$; $p=0,0018$); qPCR 85B ($r=0,-9247$; $p=0,0029$)], isto é, quanto maior o IB menor o *Ct* para detecção do *M. leprae* (Figura 9).

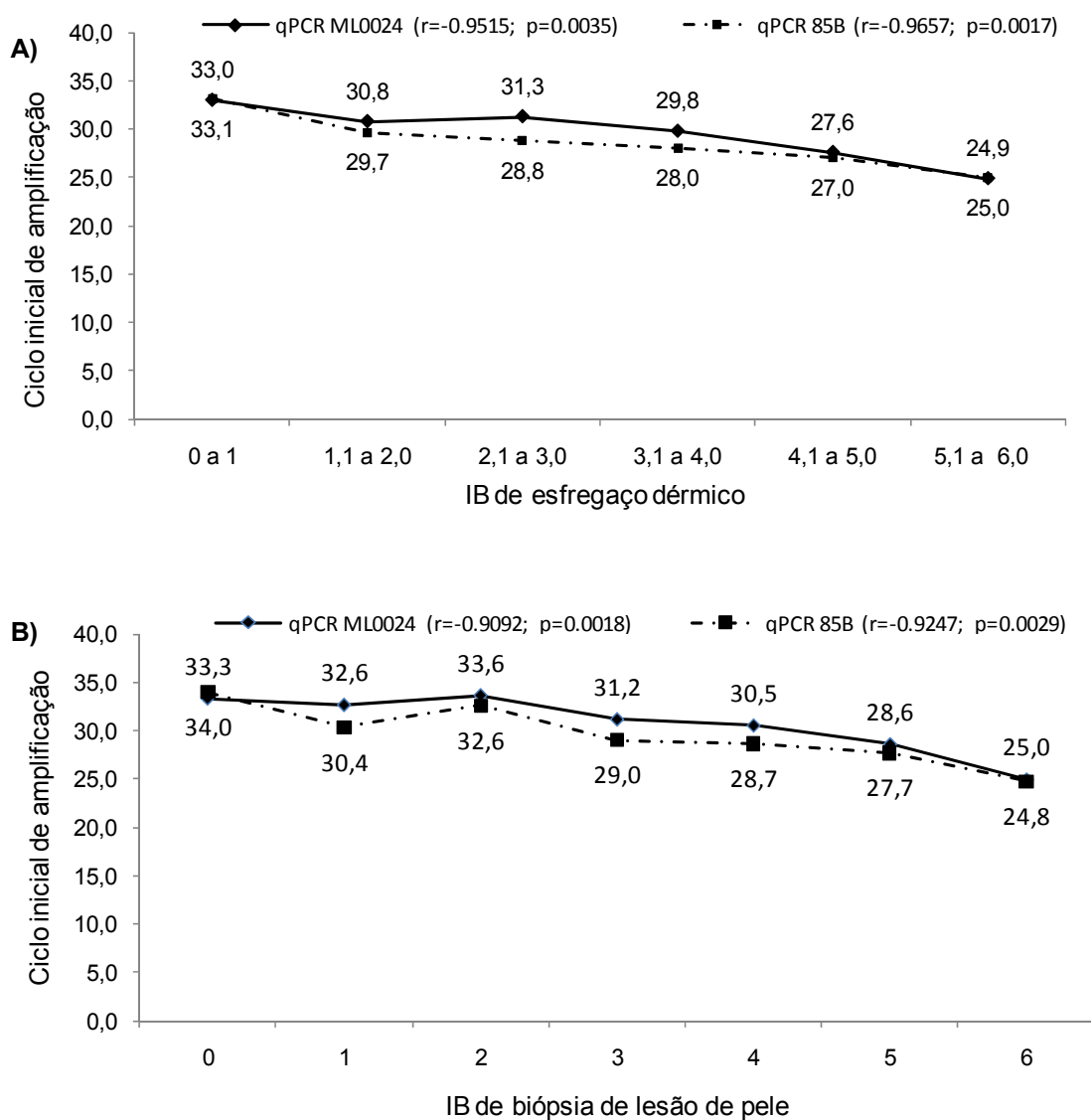


Figura 9: Correlação entre o ciclo inicial de amplificação da qPCR *ML0024* e da qPCR 85B e os índices baciloscópicos (IB) de esfregaço dérmico e de biópsia de lesão de pele. A) Correlação entre as médias dos *Cts* obtidos pela amplificação da qPCR *ML0024* e da qPCR 85B e o IB de esfregaço dérmico. B) Correlação entre as médias dos obtidos pela amplificação da qPCR *ML0024* e da qPCR 85B e o IB de biópsia de lesão de pele.

Foi observada correlação positiva entre IB de esfregaço dérmico e as médias do número de cópias de DNA obtidos pela qPCR *ML0024* ($r=0,9213$; $p=0,0090$) e pela qPCR 85B ($r=0,9098$; $p=0,0090$). Quanto ao IB de lesão de pele, uma correlação positiva e significativa foi observada com a qPCR 85B ($r=0,7556$; $p=0,0494$); no entanto com a qPCR *ML0024* houve correlação positiva, mas não significativa ($r=0,7263$; $p=0,0645$) (Figura 10).

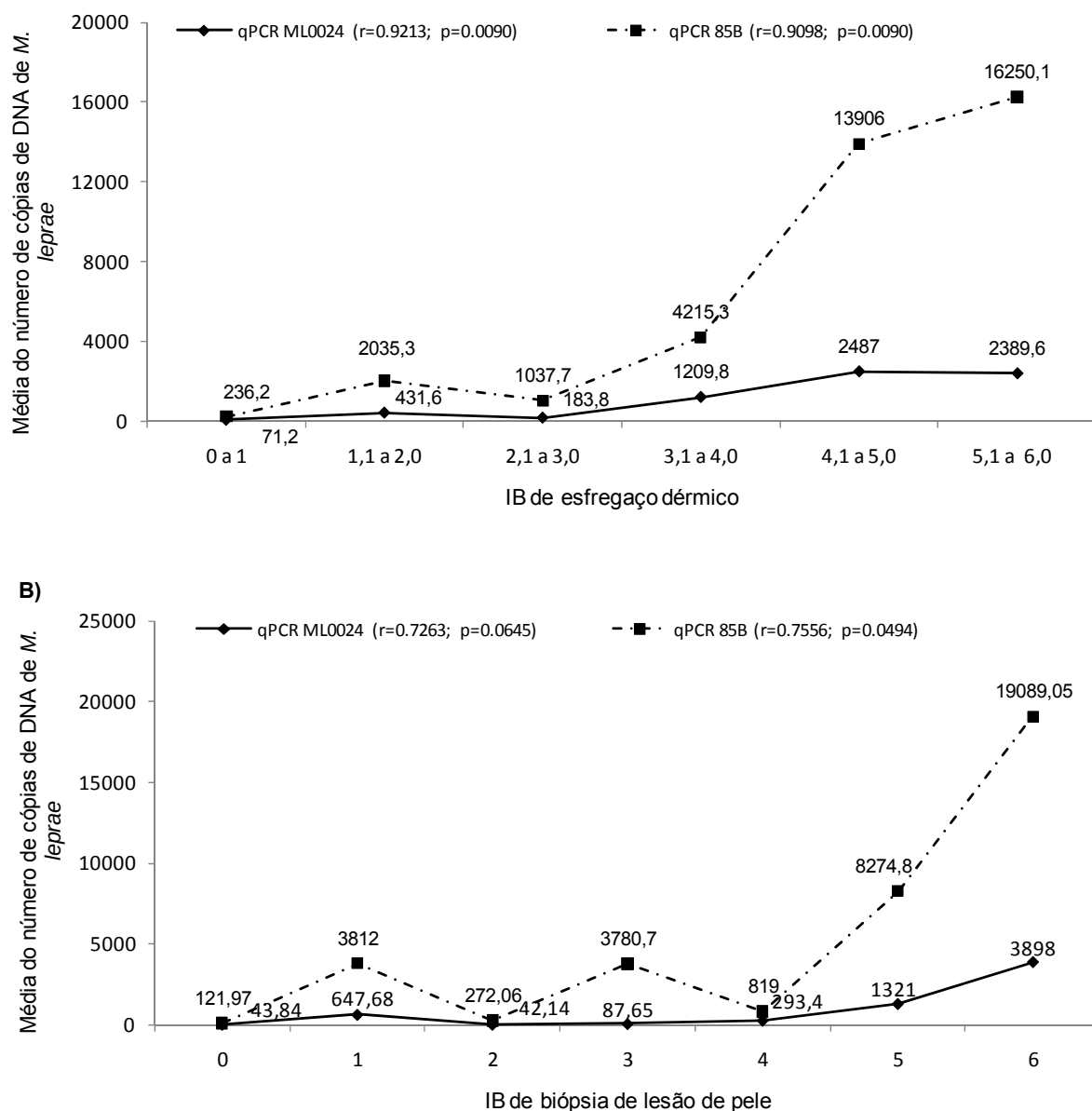


Figura 10: Correlação entre as médias dos números de cópias de DNA de *M. leprae* obtidos pela qPCR ML0024 e qPCR 85B e os índices baciloscópicos (IB). A) Correlação entre as médias dos números de cópias de DNA de *M. leprae* obtidos pela qPCR ML0024 e qPCR 85B e o IB de esfregaço dérmico B) Correlação entre as médias dos números de cópias de DNA de *M. leprae* obtidos pela qPCR ML0024 e qPCR 85B e o IB biópsia de pele.

Os resultados da aplicação do teste *t* para avaliação das diferenças entre os valores médios de *Cts* e a quantificação do número de cópias de DNA do bacilo obtidos pela qPCR *ML0024* e pela qPCR 85B por forma clínica, podem ser observados na Tabela 7.

Tabela 7: Diferenças entre os valores teste *t* (p valor) realizado entre os valores médios dos ciclos iniciais de amplificação, entre as médias da quantificação do número de cópias de DNA de *M. leprae* pela qPCR *ML0024* e pela qPCR 85B, por forma clínica.

			Valores médios de <i>Cts</i>		Quantificação em cópias de DNA	
			qPCR <i>ML0024</i>	qPCR 85B	qPCR <i>ML0024</i>	qPCR 85B
			(p valor)	(p valor)	(p valor)	(p valor)
T	x	DT-	<0.0001*	0.0008*	0,1324	0,451
T	x	DT+	<0.0001*	<0.0001*	0,1304	0.0053*
T	x	DD	<0.0001*	<0.0001*	0,1271	0.0019*
T	x	DV	<0.0001*	<0.0001*	0,1279	0.0021*
T	x	V	<0.0001*	<0.0001*	0,1272	0.0017*
DT-	x	DT+	0,2098	0,3091	0,3025	0.0222*
DT-	x	DD	0.0161*	0.0005*	0,0647	0.0117*
DT-	x	DV	0,0929	0.0013*	0,0973	0.0126*
DT-	x	V	0.0012*	<0.0001*	0,0688	0.0111*
DT+	x	DD	0.0252*	0.0009*	0.0255*	0.0305*
DT+	x	DV	0,1483	0.0019*	0,0713	0,0534
DT+	x	V	0.0055*	<0.0001*	0.0296*	0.021*
DD	x	DV	0,2419	0,4774	0,1238	0,2388
DD	x	V	0,4856	0,1754	0,2817	0,0642
DV	x	V	0,1692	0,2181	0,1589	0,1101

* p valor estatisticamente significante

Nota: *Cts* (Cycle threshold); T (Tuberculóide); DT- (Dimorfo-tuberculóide com IB de esfregaço dérmico negativo); DT+ (Dimorfo-tuberculóide com IB de esfregaço dérmico entre 0 e 2); DD (Dimorfo-dimorfo); DV (Dimorfo-virchowiano); V (Virchowiano)

Discussão

As limitações ao se usar um sistema puramente clínico na classificação de pacientes com hanseníase, sem considerar exames laboratoriais, podem levar a condutas inadequadas no tratamento destes, de modo que alguns podem usar drogas potencialmente tóxicas desnecessariamente e outros adotarem esquemas terapêuticos ineficazes, expondo a comunidade a uma fonte de infecção e mantendo a transmissão da doença (CRIPA *et al.*, 2004; CROFT *et al.*, 1998).

A classificação correta dos casos de hanseníase constitui uma ferramenta indispensável para o entendimento da doença e de sua evolução nos pacientes. As constantes dificuldades e controvérsias envolvendo o diagnóstico mostram a importância de buscar critérios mais precisos para este procedimento.

O presente trabalho propôs o desenvolvimento de marcadores moleculares que foram utilizados para a detecção de *M. leprae* em amostras de biópsia de lesão de pele de pacientes com hanseníase, de maneira rápida, sensível e específica, uma vez que confirmaram a presença do bacilo não só nas formas multibacilares como também naquelas paucibacilares, cujos exames baciloscópicos apresentam-se negativos.

Observou-se também que o limite confiável de detecção concordou com a literatura que descreve trabalhos que amplificaram até uma bactéria pela PCR (BANG *et al.*, 2009). A sensibilidade da qPCR ML0024 e qPCR 85B está dentro da faixa de outros testes de detecção do DNA de *M. leprae* pela PCR. A literatura mostra estudos que detectaram a presença do bacilo em diferentes amostras, embora com o uso de outras regiões do genoma do bacilo (KRAMME *et al.*, 2003; RONDINI *et al.*, 2003, YOON *et al.*, 1993).

Os valores obtidos neste estudo para a detecção do bacilo em amostras de pacientes paucibacilares são semelhantes ao descrito por Kramme e colaboradores (2003), que relataram 33,3% de positividade utilizando marcadores moleculares que amplificavam parte do gene de um antígeno rico em prolina. No entanto, a amostra utilizada por estes autores foi 2,2 vezes menor que aquela utilizada no presente estudo.

Ao avaliar a positividade dos marcadores propostos neste estudo relacionada às formas clínicas, observou-se maior sensibilidade para a detecção do bacilo pelos testes moleculares em relação aos testes baciloscópicos nas formas T, DT- e DT+. Além disto, a qPCR ML0024 e a qPCR 85B detectaram todos os casos DD, DV e V, mostrando-se fiel à classificação clínica dos pacientes.

No presente estudo foi realizada a divisão forma clínica DT, conforme descrito por Ridley e Jopling (1966) e citado por Goulart e colaboradores (2008), que enfatizam que alguns destes casos devem ser classificados como MB, uma vez que podem apresentar resultados baciloscópicos de esfregaço dérmico com valores que variam de 0 a 2.

Martinez e cols (2006) realizaram um estudo utilizando PCR em tempo real com *primers* que amplificam região do gene que codifica o antígeno 85B, no qual obtiveram 79,2% de positividade para os casos paucibacilares. No entanto, os autores consideraram todos os pacientes DT como paucibacilares, desconsiderando que alguns apresentam exames baciloscópicos positivos e, além disto, excluíram das análises todos os pacientes da forma clínica T, o que pode ter contribuído para a alta detecção de DNA do bacilo no grupo paucibacilar.

Além disso, a maioria dos relatos da literatura relaciona os resultados qualitativos da PCR à classificação operacional proposta pela OMS, em grupos paucibacilares e multibacilares (KRAMME *et al.*, 2003; RUDEEANEKSIN *et al.*, 2008; RONDINI *et al.*,

2003; GOULART *et al.*, 2008; VAN DER VLIET *et al.*, 1996; WICHTWECHKARN *et al.*, 1995; YOON *et al.*, 1993).

As qPCR ML0024 e 85B deixaram de detectar a presença do DNA de *M. leprae* em dois e três pacientes, respectivamente, gerando resultados falso-negativos. Isto provavelmente ocorreu dada à dificuldade em encontrar o DNA do bacilo nas formas dimorfa-tuberculóide pode ocorrer pelo fato de que, nesta forma clínica, ocorre intensa produção IL-2 e IFN- γ , além da produção de TNF- α , que contribuem para a manutenção do granuloma imune, com grande poder bactericida (GOULART *et al.*, 1995; BRONTE *et al.*, 1993).

A presença destas citocinas provavelmente leva à ativação da via do óxido nítrico, com destruição bacilar (GOULART *et al.*, 2002) e, conseqüentemente, à degradação do DNA (IBUKI *et al.*, 2003; DE WIT *et al.*, 1993). Isto também explica o fato de que nem todas as amostras das formas clínicas T e DT- foram positivas.

Outro motivo para a não detecção do DNA do bacilo em todas as amostras das formas clínicas T e DT seria que, como estas apresentam menor quantidade de bacilo, ocorre uma razão mais elevada de DNA genômico humano para DNA de *M. leprae*, que provavelmente inibe a amplificação do DNA do bacilo. Por outro lado, para garantir o processo de padronização desse sistema, o DNA total extraído de amostras humanas foi quantificado e diluído antes da amplificação do DNA de *M. leprae*.

A baixa positividade observada para os exames baciloscópicos, principalmente nas formas menos bacilíferas, pode ter ocorrido por esta técnica apresentar algumas limitações, uma vez que as amostras nem sempre indicam a presença do bacilo em pacientes com sintomatologia característica, levando a controvérsias acerca da eficácia da microscopia na identificação do bacilo em esfregaços dérmicos e em biópsias de

lesão de pele (HARDAS, 1981). Além disto, há relatos na literatura de variações inter observadores, o que mostra a necessidade de estudos que avaliem e proponham sugestões para minimizá-las (FINE *et al*, 1993).

Em estudo para avaliar a concordância de testes clínicos e laboratoriais, Goulart e cols (2008) sugerem a existência de possíveis deficiências nos procedimentos de obtenção de cortes pela coloração de Ziehl-Neelsen e da análise destes. Outros problemas observados pelos patologistas envolvidos no diagnóstico da doença são a subjetividade inerente ao método, o treinamento a que são submetidos, sua experiência e o contexto particular de cada investigação (FINE *et al*, 1993).

Quanto às análises quantitativas, os menores ciclos iniciais de amplificação foram obtidos para amostras do pólo virchowiano, o que representa amplificação nos ciclos iniciais de amplificação da qPCR, traduzindo maiores concentrações de DNA de *M. leprae*, enquanto que os maiores ciclos iniciais de amplificação foram obtidos para amostras do pólo tuberculóide, representando amplificação tardia devido à pouca quantidade de bacilos neste tipo de amostra. Os valores médios dos ciclos iniciais de amplificação da qPCR ML0024 e qPCR 85B estabelecidos no presente trabalho para as formas clínicas foram semelhantes aos descritos na literatura (RONDINI *et al.*, 2003).

A quantificação de números de cópias de DNA de *M. leprae* por fragmento de biópsia de lesão de pele, obtidos pela PCR em tempo real, corroborou com o espectro de Ridley e Jopling (1966) uma vez que foi observado um comportamento crescente deste número de cópias em direção ao pólo virchowiano, relacionando-se diretamente à carga bacilar.

Um diagnóstico e uma classificação apropriados de uma doença são base da medicina moderna para selecionar tratamento, avaliar prognóstico, medir progressos e

melhorar seu entendimento. Isso se aplica à hanseníase, para a qual deve ser estimulada uma contínua e vigorosa pesquisa para refinar os métodos e conceitos de sua classificação (SCOLLARD, 2006).

A estratégia para eliminar a hanseníase como um problema de saúde pública baseia-se na melhoria do acesso ao diagnóstico precoce através da integração de serviços de controle da doença aos serviços de saúde pública já existentes (WHO, 2010), visando identificar os indivíduos doentes ou aqueles que estão em alto risco de desenvolver a doença.

Embora constantes pesquisas sejam realizadas, ainda não foram encontradas regiões do genoma do *Mycobacterium leprae* que possam ser utilizadas como padrão-ouro no diagnóstico da hanseníase. Assim, torna-se necessária a busca por um marcador molecular específico e sensível ao genoma do bacilo e que, aliado à utilização de técnicas mais sensíveis como a PCR em tempo real, permita o desenvolvimento de plataformas moleculares que traduzam um diagnóstico de certeza de forma precoce, que auxilie a confirmação de casos menos bacilíferos, e que possam atuar na detecção de infecção bem como na investigação epidemiológica da hanseníase.

A descoberta de biomarcadores que possam prever a infecção pelo *M. leprae*, estados reacionais ou cura é particularmente oportuna, visto que estes poderiam formar a base de uma ferramenta necessária e útil para complementar a avaliação clínica dos pacientes (WHO, 2010). Mesmo apresentando um custo mais elevado do que as técnicas bacteriológicas, a PCR em tempo real vem sendo cada vez mais utilizada devido à sua flexibilidade de formato semi-automático e à sua velocidade, proporcionando uma vantagem de trabalho experimental em laboratório de rotina e uma sensibilidade mais elevada que a PCR convencional (MARTINEZ *et al.*, 2006).

Além disto, é uma técnica que, se bem otimizada, permite a detecção do bacilo em amostras de formas clínicas paucibacilares, como demonstrado no presente trabalho; isto pode influenciar diretamente no diagnóstico da doença, contribuindo para a diminuição da transmissão do bacilo e também na prevenção de incapacidades. As análises moleculares realizadas neste estudo possibilitaram melhoria no diagnóstico da hanseníase uma vez que encontrou o bacilo em amostras cujos exames baciloscópicos foram negativos e, além disto, mostraram-se concordantes com a literatura (RONDINI *et al.*, 2003; GOULART *et al.*, 2008; WICHTWECHKARN *et al.*, 1995; YOON *et al.*, 1993; GOULART *et al.*, 2002).

Ambos marcadores moleculares possuem igualmente o mesmo número de cópias no genoma, são específicos ao *M. leprae*, apresentam praticamente o mesmo tamanho de *amplicon*, e não apresentam diferenças significativas entre suas sensibilidades. Pode-se optar por ou outro para diagnóstico da hanseníase visando assim, auxiliar a classificação das formas clínicas bem como detectar a presença do bacilo em amostras de pacientes paucibacilares, que apresentam testes baciloscópicos negativos.

Portanto, esse trabalho vem corroborar com a classificação de Ridley-Jopling (1966) mostrando a presença de DNA do *M. leprae* em amostras cujos testes baciloscópicos foram negativos; correlacionando-se diretamente com a carga bacilar de cada forma clínica do espectro da doença. Com isso, recomenda o uso desses marcadores como auxílio diagnóstico e prognóstico na rotina dos serviços de saúde da alta complexidade, com o intuito de auxiliar a busca em atender à estratégia da Organização Mundial de Saúde para eliminar a hanseníase como um problema de saúde pública.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 APPLIED BIOSYSTEMS. **Princípios da PCR em tempo real**. Disponível em: <http://www.appliedbiosystems.com.br/site/material/d1jg4lmm.pdf>>Acesso em dezembro de 2006.
- 2 BANG P.D., SUZUKI K., PHUONG L.E.T., CHU T.M., ISHII N., KHANG T.H. **Evaluation of polymerase chain reaction-based detection of *Mycobacterium leprae* for the diagnosis of leprosy**. Journal of Dermatology, v. 36(5), p. 269-76, 2009.
- 3 BRASIL, Ministério da Saúde. **Guia para o Controle da Hanseníase**. Cadernos de Atenção Básica, v. 10, p. 89, 2002.
- 4 BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Hanseníase no Brasil: Dados e indicadores selecionados Brasília – DF; 2009**.
- 5 BRENNAN P.J. **Carbohydrate containing antigens of *Mycobacterium leprae***. Leprosy Review, v. 57 (Suppl 2), p. 39-51, 1986.
- 6 BRENNAN P.J. **The microbiology of *Mycobacterium leprae*, Part II. Reflections on major developments and those responsible for them**. International Journal of Leprosy, v. 62, p. 594-598, 1994.

- 7 BRONTE V., ZANOVELLO P., ROSATO A., ZAMBON A., MANDRUZZATO S., PIZZO P., DI VIRGILIO .F, COLLAVO D. **Synergistic Effect of Extracellular Adenosine 5'- Triphosphate and Tumor Necrosis Factor on DNA Degration.** Cellular Immunology. v. 152(1), p. 110-119, 1993.
- 8 BRYCESON A, PFALTZGRAFF RE. **Leprosy.** 3th ed. New York: Churchill Livingstone, 1990.
- 9 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.** Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Brasil, 2006.
- 10 CHAE, G.T.; KIM, M.J.; KANG, T.J.; LEE, S.B.; SHIN, H.K.; KIM J.P.; KO, Y.H.; KIM, S.H.; KIM, N.H. **DNA-PCR and RT-PCR for the 18-Kda gene of *Mycobacterium leprae* to assess the efficacy of multi-drug therapy for leprosy.** Journal of Medical Microbiology, v. 55(5), p. 417-422, 2002.
- 11 COLE, S. T., BROSCHE, R., PARKHILL, J., GARNIER, T., CHURCHER, C., HARRIS, D., GORDON, S. V., EIGLMEIER, K., GAS, S., BARRY III, C. E., TEKAIA, F., BADCOCK, K., BASHAM, D., BROWN, D., CHILLINGWORTH, T., CONNOR, R., DAVIES, R., DEVLIN, K., FELTWELL, T., GENTLES, S., 8HAMLIN, N., HOLROYD, S., HORNSBY, T., JAGELS, K., KROGH, A., M9CLEAN, J., MOULE, S., MURPHY, L., OLIVER, K., OSBORNE, J., QUAIL,

- M. A., RAJANDREAM, M. A., ROGERS, J., RUTTER, S., SEEGER, K., SKELTON, J., SQUARES, R., SQUARES, S., SULSTON, J. E., TAYLOR, K., WHITEHEAD, S., AND BARRELL. B. G. **Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence.** Nature, v. 393, p. 537–544, 1998.
- 12 COLSTON M.J. **The Microbiology of *Mycobacterium leprae*: progress in the last 30 years (1962-1992).** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 87, p. 504-507, 1993.
- 13 CRIPPA I.L.F., SCHETTINI A.P., PENNINI S.N., SCHETTINI M.C., REBELLO P.F.B. **Correlação clínico-laboratorial baseada em dados secundários dos casos de hanseníase atendidos no período de 01/2000 a 03/2001 na Fundação Alfredo da Matta,** Manaus-AM, Brasil. Anais Brasileiros de Dermatologia, v. 79(5), p. 547-554, 2004.
- 14 CROFT R.P., SMITH W., NICHOLLS P., RICHARDUS J.H. **Sensitivity and specificity of methods of classification of leprosy without use of skin-smears examination.** International Journal of Leprosy, v. 66, p. 445-450, 1998.
- 15 DAYAL, R., SINGH, S.P., MATHUR, P.P., KATOCH, V.M.; NATRAJAN, M. **Diagnostic value of in situ polymerase chain reaction in leprosy.** Indian Journal of Pediatric. v.72, p.1043-1046, 2005.

- 16 De WIT M.Y.L., FABER R.W., KRIEG R.S., DOUGLAS J.T., LUCAS S.B., MONTREEWASUWAT N., PATTYN S.R., HUSSAIN R., PONNIGHAUS J.R., HARTSKEERL R.A., KLATSER P.R. **Application of a polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae* in skin tissues.** Journal of Clinical Microbiology, v. 29(5), p. 906-910, 1991.
- 17 DE WIT M.Y.L., DOUGLAS J.T., MCFADDEN J., KLATSER P. **Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium leprae* in nasal swabs specimens.** Journal of Clinical Microbiology, v. 31, p. 502–506, 1993.
- 18 DONOGHUE, H. D.; HOLTON, J.; SPIGELMAN, M. **PCR primers that can detect low levels of *Mycobacterium leprae* DNA.** Journal of medical Microbiology. V. 50 (2), p. 177-182, 2001
- 19 FINE P.E., JOB C.K., LUCAS S.B., MEYERS W.M., PÖNNIGHAUS J.M., STERNE J.A. **Extent, origin, and implications of observer variation in the histopathological diagnosis of suspected leprosy.** International Journal Leprosy Other Mycobacterial Disease, v. 61(2), p. 270, 1993.
- 20 FOSS, N. T., GOULART, I.M.B, **Hanseníase: Episódios Reacionais.** Projeto Diretrizes, p. 19, 2003.

- 21 GILLIS, T. P., AND D. L. WILLIAMS. **Polymerase chain reaction and leprosy.** International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Disease. V. 59, p. 311–316, 1991.
- 22 GOULART I.M.B. **Detecção de TGF- α 1 em lesões cutâneas de diferentes formas clínicas de hanseníase.** Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, p. 83, 1995.
- 23 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.
- 24 GOULART I.M.B., REIS E.M., NUNES M.M., LOBATO J., GONÇALVES M.A., COSTA A.V., GOULART L.R. **Sorologia e PCR quantitativa na classificação clínica de Ridley-Jopling da hanseníase.** UFU, Ano 30 - Tropeçando Universos (artes, humanidades, ciências). EDUFU - Editora da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG, Brasil, p. 1529-553, 2008.
- 25 HACKEL C. **Identificação específica do *M. leprae* pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR).** Hansenologia Internationalis, v. 15, p. 67-75, 1990.

- 26 HARDAS U., LELE V. **Evaluation of fluorescence microscopy for detection of *M. leprae*.** Leprosy in India. New Delhi, V. 53(2), p. 273-277, 1981.
- 27 HASTINGS, R. C.; GILLIS, T. P.; KRAHENBUHL, J. L.; FRANZBLAU, S. G. **Leprosy.** Clinical Microbiology Review. v. 1, n. 3, p. 330-348, 1988.
- 28 HATTA, M.; VAN BEERS, S. M.; MADJID, B.; DJUMADI, A.; DE WIT, M. Y.; KLATSER, P. R. **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, p. 381-385, 1995.
- 29 IBUKI Y., MIZUNO S., GOTO R. **λ - Irradiation induced DNA damage enhances NO production via NF- κ B activation in RAW264.7 cells.** Biochimistry and Biophysical Acta, v. 1593, p. 159-167, 2003.
- 30 ILA. **Summary of the Report of the International Leprosy Association Technical Forum.** Leprosy Review, v. 70, p. 3-5, 2002.
- 31 JAMIL, M.; KEER, J.T.; LUCAS, S.B.; DOCKRELL, H.M.; CHIANG, T.J.; HUSSAIN, R.; STOKER, N.G. **Use of polymerase chain reaction to assess efficacy of leprosy chemotherapy.** Lancet. V.342, p. 264-268, 1993.

- 32 JOB C.K., BASKARAN B., JAYAKUMAR J., ASCHHOFF M. **Histopathologic evidence to show that indeterminate leprosy may be a primary lesion of the disease.** International Journal Leprosy Other Mycobacterial Disease, v. 65(4), p. 443-449, 1997.
- 33 JOPLING, W. H.; MCDOUGALL, A. C. **Manual de hanseníase.** 4ª Ed. Livraria Atheneu. Rio de Janeiro, 1991.
- 34 KANG TJ, KIM SB, LEE, GT, KIM JP, KIM C. **Comparision 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, n.28, p. 420-424, 2003.
- 35 KATOCH, V. M. **Molecular techniques for leprosy: present applications and future perspectives.** Indian Journal of Leprosy. V. 71, p. 45–59, 1999.
- 36 KLATSER, P.R.; VAN BEERS, S.; MADJID, B.; DAY, R.; DE WIT, M.Y. **Detection of *Mycobacterium leprae* nasal carriers in populations for which leprosy is endemic.** Journal of Clinical Microbiology, n.31, p.2947-2951, 1993.
- 37 KRAMME, S.; BRETZEL, G.; PANNING, M.; KAWUMA, J.; DROSTEN, C. **Detection and quantification of *Mycobacterium leprae* in tissue samples by real-time PCR.** Medical Microbiology Immunology, 2003.

- 38 KURABACHEW, M.; WONDIMU, A.; RYON, J.J. **Reverse transcription-PCR detection of *Mycobacterium leprae* in clinical specimens.** Journal of Clinical Microbiology, v. 36, n. 5, p. 1352-1356, 1998.
- 39 LOMBARDI, C.; SUÁREZ, R.E.G.; **Epidemiologia da Hanseníase.** In: TALHARI, S.; NEVES, R.G. Hanseníase, 3ª ed. Manaus: cap. 12, p. 127-136. 1997.
- 40 MARTINEZ, A N.; BRITTO, C.F.P.C.; NERY, J.A C.; SAMPAIO, E.P.; JARDIM, M.R.; SARNO, E.N.; MORAES, M.O. **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, Sept, p.3154-3159, 2006.
- 41 MIRSA, N.; RAMESH, V.; MIRSA, R.S.; NARAYAN, N.P.S.; CLSTON, M.J.; NATH, I. **Clinical Utility of LSR/A15 Gene for *Mycobacterium leprae* Detection in Leprosy Tissues Using the Polymerase Chain Reaction.** International Journal of Leprosy. v.63, n.1, 1995.
- 42 MOHANTY, K. K. **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.

- 43 NOORDEEN, S. K. **The epidemiology of leprosy**, *In*: HASTINGS, R. C. Leprosy. Churchill Livingstone, Edinburgh, United Kingdom. p. 15-30, 1985.
- 44 PATROCÍNIO, L.G.; GOULART, I.M.B.; GOULART, L.R.; PATROCÍNIO, J.A, FERREIRA, F.R.; FLEURY, R.N. **Detection of *Mycobacterium leprae* in nasal mucosa biopsies by the polymerase chain reaction.** FEMS Immunological and Medical Microbiology. V. 44, n. 3, p. 311-316, 2005.
- 45 PATTYN, S.R.; URSI, D.; IEVEN, M.;GRILLONE, S.; RAES, V. **Detection of *Mycobacterium leprae* by the polymerase chain reaction in nasal swabs of leprosy patients and their contacts.** International Journal of Leprosy and Mycobacterial Disease, n.61, p. 389-393, 1993.
- 46 PHETSUKSIRI, B.; RUDEEANEKSIN, J.; SUPAPKU, P.; WACHAPONG, S.; MAHOTARN, K.; BRENNAN, P.J. **A simplified reverse transcriptase PCR for rapid detection of *Mycobacterium leprae* in skin specimens.** FEMS Immunology and Medical Microbiology, n.48, p.319-328, 2006.
- 47 PULST S.M. **Ethical issues in DNA testing.** Muscle and Nerve, v. 23, p. 1503-1507, 2000.
- 48 RAFI A., DONOGHUE H.D., STANFORD J.L. **Application of PCR for detection of *M. leprae* DNA in specimens form treated patients.** International Journal of Leprosy, v. 63, p. 42-45, 1995.

- 49 RAMAPRASAD, P.; FERNANDO, A.; MADHALE, S.; RAO, J.R.; EDWARD, V.K.; SAMSON, P.D.; KLATSER, P.R.; DE WIT, M.Y.; SMITH, W.C.; CREE, I.A, **Transmission and protection in leprosy: indication of the role of mucosal immunity.** *Leprosy Review*, v. 68, p 301-315, 1997.
- 50 REES R.F.W. **The microbiology of leprosy.** *in*: Hastings RC. *Leprosy*. London: Churchill Livingstone; p.31-52. 1989.
- 51 RIDLEY DS, JOPLING WH. **Classification of leprosy according to immunity: a five group system.** *International Journal of Leprosy*, n.34, p.255-273, 1966.
- 52 RODRIGUES, L.S. **Estudo do efeito anti-apoptótico do *Mycobacterium leprae* em células de Schwann humanas.** Dissertação (Mestrado). Programa de Biologia Celular e Molecular. 130 p., 2005.
- 53 RONDINI S., MENSAH-QUAINOO E., TROLL H., BODMER T., PLUSCHKE G. **Development and application of real-time PCR assay for quantification of *Mycobacterium ulcerans* DNA.** *Journal of Clinical Microbiology*, v. 41(9), p. 4231-4237, 2003.

- 54 RUDEEANEKSIN J., SRISUNGNGAM S., SAWANPANYALERT P., SITTIWAKIN T., LIKANONSAKUL S., PASADORN S., PALITTAPONGARNPIM P., BRENNAN P.J., PHETSUKSIRI B. **LightCyclerTM real-time PCR for rapid detection and quantitation of *Mycobacterium leprae* in skin specimens.** FEMS Immunology and Medical Microbiology, v. 54(2), p. 263-270, 2008.
- 55 SAIKI R.K., SCHARF S., FALOONA F., MULLIS K.B., HORN G.T., ERKICH H.A., ARNHEIM N. **Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.** Science; v. 230, p. 1350, 1985.
- 56 SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T: **Molecular Cloning: a Laboratory Manual.** Cold Spring Harbor, New York , 2nd ed., 1989.
- 57 SANTOS A.R., DE MIRANDA A.B.; SARNO E.M.; SUFFYS P.N.; DEGRAVE W.N. **Use of PCR-mediated amplification of *Mycobacterium leprae* DNA in different types of clinical samples for the diagnosis of leprosy.** Journal of Medical Microbiology, v. 39, p. 298-304, 1993.
- 58 SANTOS A.R., GOES FILHO J.T., NERY J.A.C., DUPPRE N.C., GALLO M.E.N., SUFFYS P.N., DEGRAVE W.M. **Evaluation of PCR mediated DNA amplification in non-invasive biological specimens for subclinical detection of *Mycobacterium leprae*.** FEMS Immunology and Medical Microbiology, v. 11, p. 113-120, 1995.

- 59 SANTOS A.R., DEGRAVE W.M., SUFFYS P.N. Use of **polymerase chain reaction (PCR) in leprosy reseach**. Indian Journal of Leprosy, v. 71, p. 101-110, 1999.
- 60 SANTOS, AR.; BALASSIANO, V.; OLIVEIRA, M.L.; PEREIRA, M.A; SANTOS, P.B.; DEGRAVE, W.M.; SUFFYS, P.N. **Detection of *Mycobacterium leprae* DNA by polymerase chain reaction in the blood of individuals, eighth years completion of anti-leprosy therapy**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. n.96, p. 1129-1133, 2001.
- 61 SCOLLARD, D. M., T. P. GILLIS, AND D. L. WILLIAMS. **Polymerase chain reaction assay for the detection and identification of *Mycobacterium leprae* in patients in the United States**. American Journal of Clinical Pathology. V. 109, p. 642–646, 1998.
- 62 SCOLLARD, D.M.; ADAMS, L.B.; GILLIS, T.P.; KRAHENBUHL, J.L.; TRUMAN, R.W.; WILLIAMS, D.L. **The continuing challenges of leprosy**. Clinical and Microbiology Review, v. 19 (2), p.338-381, 2006.
- 63 SHAMSI, F.A; CHAUDHRY, I.A; MORAES, M.O; MARTINEZ, A.N.; RILEY, F.C. **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.

- 64 SHEPARD, D.D.; McRAE, D.H. **A method for counting acid-fast bacteria.** International Journal of Leprosy. V.36, p.78-82, 1968.
- 65 SHI, L.; YAJIMA, M.; KAWATSU, K.; MATSUOKA, M.; KASHIWABARA, Y. **Comparison of polymerase chain reaction, immunohistochemistry and conventional histopathology in the diagnosis of early leprosy in Sichuan Province of China.** Nihon Hansenbyo Gakkai Zasshi, v. 69, n. 3, p. 147-155, 2000.
- 66 SUGITA, Y. **PCR in leprosy.** Nihon Hansenbyo Gakkai Zasshi, v. 70, n. 1, p. 03-13, 2001.
- 67 TEIXEIRA, A.C., CRUVINEL, D.L., ROMA, F.R., LUPPINO, L.F., RESENDE, L.H.P., SOUSA, T., BÜHRER- SÉKULA, S., GOULART, I.M.B. **Evaluation of the concordance between clinical and laboratorial exams in the diagnosis of leprosy.**
- 68 VAN DER VLIET G.M., CHO S.N., KAMPIRAPAP K., VAN LEEUWEN J., SCHUKKINK R.A., VAN GEMEN B., DAS P.K., FABER W.R., WALSH G.P., KLATSER P.R. **Use of NASBA RNA amplification for detection of *Mycobacterium leprae* in skin biopsies from untreated and treated leprous patients.** International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases. V. 64, p. 369-403, 1996.

- 69 WATERS, M.F.R. **Leprosy**. Br. Med. J., v.283, p.1321, 1981.
- 70 WICHTWECHKARN, J.; KARNJAN, S.; SHUNTAWUTTISEETEE, S.; SORJPRASIT, C.; KAMPIRAPAP, K.; PEERAPAKORN, S. **Detection of *Mycobacterium leprae* Infection by PCR**. Journal of Clinical Microbiology, v.33, n.1, p.45-49, 1995.
- 71 WILLIAMS, D.L.; GILLIS, T.P.; FIALLO, P.; JOB, C.K.; GELBER, R.H.; HILL, C.; IZUMI, S. **Detection of *Mycobacterium leprae* and the potential for monitoring antileprosy drug therapy directly from skin biopsies by PCR**. Molecular Cells and Probes. n.6, p.401-410, 1992.
- 72 WILSON S.M. **Application of nucleic acid-based technologies to the diagnosis and detection of disease**. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 87, p. 609-611, 1993.
- 73 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.
- 74 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chemotherapy of leprosy for control programmes**. Technical Report Series. N. 675. Geneva, 1982.

- 75 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Leprosy Situation.** Weekly Epidemiological Record. World Health Organization, Geneva. V. 33, p. 293-300, 2008.
- 76 WORLD HEALTH ORGANIZATION, **Global Leprosy Situation.** Weekly Epidemiological Record. World Health Organization, Geneva. V. 84, n. 33, p. 333-340, 2009.
- 77 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **First WHO report on neglected tropical diseases 2010: working to overcome the global impact of neglected tropical disease.** World Health Organization, Geneva. p. 69-74, 2010.
- 78 YAWALKAR SJ: **Epidemiology. Leprosy for medical practitioners and paramedical workers.** CIBA-GEIGY Limited. Basle, Switzerland, p. 21-26, 2009.
- 79 YIN J.L., SHCKEL N.A., ZEKRY A., MCGUINNESS P.H., RICHARDS C., PUTTEN K.V., MCCAUGHAN G.W., ERIS J.M., BISCHOP G.A. **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 Cellular Biology, v. 79(3), p. 213-221, 2001.

- 80 YOON, K-H.; CHO, S-N.; LEE, M-K.; ABALOS, R.M.; CELLONA, R.V.; FAJARDO, J.R.; T.T.; GUIDO, L.S.; DELA CRUZ, E.C.; WALJH, G.P.; KIM, J-D. **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 dermato-neurológico, 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,

_____, concordo em colaborar com a pesquisa, declarando estar ciente dos riscos, benefícios e direitos.

Assinatura _____

Uberlândia, ____ de _____ de 20 ____.