



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

LUANA NEPOMUCENO GONDIM COSTA LIMA

**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO MOLECULAR DA HANSENÍASE EM FORTALEZA,
CEARÁ.**

**FORTALEZA
2014**

LUANA NEPOMUCENO GONDIM COSTA LIMA

**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO MOLECULAR DA HANSENÍASE EM FORTALEZA,
CEARÁ.**

Trabalho de qualificação submetido à
Coordenação do Programa de Pós-Graduação
em Ciências Médicas, da Universidade Federal
do Ceará, como requisito para a defesa da tese
de doutorado.

Área de concentração: Medicina I.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ligia Regina Franco
Sansigolo Kerr.

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Cristiane Cunha
Frota

**FORTALEZA
2014**

LUANA NEPOMUCENO GONDIM COSTA LIMA

**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO MOLECULAR DA HANSENÍASE EM FORTALEZA,
CEARÁ.**

Trabalho de qualificação submetido à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Universidade Federal do Ceará, como requisito para a defesa da tese de doutorado.

Área de concentração: Medicina I.

Aprovada em ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Ligia Regina Franco Sansigolo Kerr. (Orientadora)

Departamento de Saúde Comunitária

Universidade Federal do Ceará -UFC

Prof. Dr. Bernard Carl Ken

Tulane School of Public Health and Tropical Medicine

Department of Global Community Health and Behavioral Sciences.

Nova Orleans - Estados Unidos

Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro

Departamento de Medicina Clínica

Universidade Federal do Ceará -UFC

RESUMO

O estudo da detecção de DNA do *M. leprae* em secreção nasal de pacientes e indivíduos saudáveis em adição as metodologias de genotipagem do *M. leprae* têm complementado a epidemiologia da hanseníase. Este estudo avaliou a positividade de DNA de *M. leprae* na secreção nasal (SN) de pacientes com hanseníase e de indivíduos sadios; e a variabilidade genética entre cepas de *M. leprae*, estudando a relação com fatores clínico-epidemiológicos. Foram coletadas amostras de SN de 185 pacientes (grupo C), de 136 indivíduos sem hanseníase (grupo C1) que frequentavam o Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária Dona Libânia em Fortaleza, Ceará e 121 alunos da Faculdade Christus em Fortaleza (grupo C2). Foram coletadas biópsias de pele (BP) de 38 indivíduos do grupo C. Todas as amostras de SN foram submetidas à extração de DNA e à amplificação da região RLEP por meio de PCR NESTED. Foram analisadas cepas de SN de 48 pacientes utilizando MLVA (análise de multi loci de VNTR-“*variable number tandem repeats*”) de 4 loci: AC8b, AC9, AC8a e GT9. Foram comparadas amostras de BP e SN de 38 pacientes, utilizando MLVA de 15 loci: AT17, GGT5, GTA9, AC8b, AC8a, AT15, AC9, 21-3, GAA21, TA18, 6-7, 27-5, TA10, 23-3, 12-5. Foram RLEP positivo 69,2% dos casos, 66,9% do grupo C1 e 28,1% do grupo C2. O fato de o indivíduo ser homem, pertencer à classe socioeconômica D/E e a cada ano de idade que envelhece, aumenta a chance em 6,266, 3,083 e 1,046, respectivamente, de ser PCR positivo. Na análise de distribuição geográfica dos indivíduos RLEP positivos, o grupo C1 foi o grupo de interseção entre os grupos C e C2 e em relação ao grupo C, os com baciloscopia positiva e RLEP positivo estiveram mais agrupados do que os com baciloscopia positiva e RLEP negativo. Os loci AC8b, AC9, AC8a e GTA9 apresentaram uma diversidade alélica considerada moderadamente discriminante. Houve a formação de quatro grupos com cepas de genótipos idênticos. Os genótipos mais frequentes foram o AC8b: 8, AC9: 7, AC8a: 8, GTA9: 10 e o AC8b: 7, AC9: 8, AC8a: 9, GTA9: 9. As cepas de genótipos únicos foram detectadas em pacientes com idade maior e em pacientes nos quais ocorreu maior tempo entre sintomas e diagnóstico. Foi constatada a existência de diferentes cepas circulando no Município em estudo e diferenças de subpopulações do bacilo entre as amostras de BP e SN de um mesmo indivíduo.

Palavras-chave: Hanseníase. *Mycobacterium leprae*. Reação em Cadeia da Polimerase.

ABSTRACT

The study of detection of *M. leprae* DNA in nasal secretions from patients and healthy subjects in addition to the methodologies for genotyping of *M. leprae* has complemented the leprosy's epidemiology. This study evaluated the positivity of *M. leprae* DNA in nasal secretion (NS) of leprosy patients and healthy individuals; and genetic variability among strains of *M. leprae*, studying the relationship with clinical and epidemiological factors. NS samples were collected from 185 patients (group C), 136 individuals without leprosy (C1) attending the National Reference Center for Sanitary Dermatology Dona Libânia in Fortaleza, Ceará and 121 students from the Faculty Christus in Fortaleza (C2 group). Skin biopsies (SB) were collected from 38 individuals in group C. All samples NS were subjected to DNA extraction and amplification of RLEP region by nested PCR. SN strains from 48 patients were analyzed using AMVL (analysis of multi-VNTR loci "variable number tandem repeats") of four loci: AC8b, AC9, and AC8a GT9. SB and NS samples of 38 patients were compared using AMVL for 15 loci: AT17, GGT5, GTA9, AC8b, AC8a, AT15, AC9, 21-3, GAA21, TA18, 6-7, 27-5, TA10, 23 -3 12-5. 69.2% of the cases, 66.9% of C1 and 28.1% of group C2 were positive RLEP. The fact that the individual is male, belonging to socioeconomic class D / E and every year-old age increases the chance in 6,266, 3,083 and 1,046, respectively, be it positive PCR. In the analysis of geographical distribution of individuals positive RLEP, the C1 was the group of intersection between C and C2 groups and the group C, the smear-positive and positive RLEP were more clustered than smear-positive and negative RLEP. The AC8b, AC9, and AC8a GTA9 loci showed allelic diversity considered moderately discriminating. There was a formation of four groups with strains of identical genotypes. The most common genotypes were AC8b: 8, AC9: 7, AC8a: 8, GTA9: 10 and AC8b: 7, AC9: 8, AC8a: 9, GTA9: 9. Strains of unique genotypes were detected in patients aged greater and in patients in whom there was more time between symptoms and diagnosis. The existence of different strains circulating in the city under study and different subpopulations of bacilli between BP and SN samples of the same individual was observed.

Keywords: Leprosy. *Mycobacterium leprae*. Polymerase Chain Reaction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Produto de amplificação a partir da região genômica <i>M. leprae repetitive element</i> RLEP2 (NCBI X17151).....	40
Figura 2- Equação para o cálculo do poder discriminatório das técnicas moleculares.....	44
Figura 3- Distribuição dos grupos do estudo de acordo com o sexo	46
Figura 4- Mapas do município de Fortaleza com a moradia dos indivíduos do estudo.....	52
Figura 5- Mapas do Município de Fortaleza com a moradia dos indivíduos por grupos do estudo.....	53
Figura 6- Mapas do Município de Fortaleza em distribuição de Densidade Kernel da moradia por grupos do estudo.....	54
Figura 7- Mapa do Município de Fortaleza com a moradia dos indivíduos do estudo com baciloscopia positiva.....	55
Figura 8- Mapas do Município de Fortaleza com a moradia dos indivíduos com os genótipos da cepa de <i>M. leprae</i> analisados.....	59

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Iniciadores para amplificação do DNA do <i>M. leprae</i>	40
Quadro 2- Iniciadores para amplificação de 17 <i>loci</i> de VNTRs em grupos de multiplex PCR.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Distribuição dos grupos estudados de acordo com a idade.....	46
Tabela 2-	Distribuição dos resultados da detecção do gene <i>RLEP</i> de <i>M. leprae</i> por grupos estudados.....	47
Tabela 3-	Distribuição do percentual de PCR positivo para o gene <i>RLEP</i> de <i>M. leprae</i> entre os grupos de acordo com o sexo.....	48
Tabela 4-	Distribuição dos resultados da PCR para o gene <i>RLEP</i> de <i>M. leprae</i> entre os grupos de acordo com a idade.....	48
Tabela 5-	Distribuição dos resultados da PCR para o gene <i>RLEP</i> de <i>M. leprae</i> no grupo de casos de acordo com a baciloscopia e a classificação clínica de acordo com <i>Ridley-Joplin</i>	49
Tabela 6-	Análise de regressão logística de possíveis fatores de risco para a hanseníase em casos e controles com PCR positiva.....	50
Tabela 7-	Os fatores que aumentam a chance de tornar o grupo de casos na análise de regressão logística no grupo PCR positiva em um contexto multidimensional.....	52
Tabela 8-	Diversidade alélica dos 4 loci de VNTRs.....	56
Tabela 9-	VNTRs das cepas de <i>M. leprae</i> das amostras.....	56
Tabela 10-	Grupos de amostras com genótipo de <i>M. leprae</i> idêntico.....	57
Tabela 11-	Características principais dos indivíduos pertencentes aos grupos formados	58
Tabela 12-	Comparação de características dos pacientes com cepas agrupadas e não agrupadas pelo Teste de <i>Mann-Whitney</i>	60
Tabela 13-	VNTRs das cepas de <i>M. leprae</i> das amostras de secreção nasal e biópsia de pele do mesmo paciente.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RLEP	<i>Repetitive Sequence of M. Leprae</i>
pb	Pares de Bases
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
IS	<i>Insertion Sequences</i>
VNTR	<i>Variable Number Tandem Repeat</i>
AC	Antes de Cristo
PQT	Poliquimioterapia
OMS	Organização Mundial da Saúde
D	Hanseníase Dimorfa
DT	Hanseníase Dimorfa Tuberculóide
DV	Hanseníase Dimorfa Virchowiana
DD	Hanseníase Dimorfa – Dimorfa
I	Hanseníase Indeterminada
TT	Hanseníase Tuberculóide
V	Hanseníase Virchowiana
IB	Índice Baciloscópico
kDa	Kilo Daltons
MB	Multibacilar
PB	Paucibacilar
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
BCG	Bacilo <i>Calmette Guérin</i>
PGL-I	Glicolípido Fenólico I
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
RNA	Ácido Ribonucleico
BAAR	Bacilo Álcool Ácido Resistente
CDERM	Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária Dona Libânia
DATASUS	Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde do Brasil
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
STRs	<i>Short Tandem Repeat</i>
MLVA	<i>Multiple-locus VNTR Analysis</i>
FLA	<i>Fragment Length Analysis</i>
NHDP63	<i>National Hansen's Disease Program</i>

C	Grupo Caso
C1	Primeiro Grupo Controle
C2	Segundo Grupo Controle
SN	Secreção Nasal
BP	Biópsia de Pele
DATASUS	Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde do Brasil
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
RNA	Ácido Ribonucleico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	O gênero <i>Mycobacterium</i>	13
1.2	O <i>Mycobacterium leprae</i>	14
1.3	O genoma do <i>M. leprae</i>	15
1.4	Genotipagem do <i>M. leprae</i>	17
1.5	Hanseníase.....	22
1.6	Aspectos epidemiológicos.....	24
1.7	Classificação e manifestações clínicas.....	26
1.8	Tratamento.....	29
1.9	Vacina BCG.....	29
1.10	Diagnóstico.....	30
2	JUSTIFICATIVA	34
3	OBJETIVOS	36
3.1	Objetivo Geral.....	36
3.2	Objetivos específicos.....	36
4	METODOLOGIA	37
4.1	O estudo	37
4.2	Critérios de inclusão e exclusão.....	37
4.3	Amostras de secreção nasal.....	38
4.3.1	Coleta e acondicionamento.....	38
4.3.2	Extração de DNA.....	38
4.3.3	Amplificação do Ácido Nucléico.....	39
4.3.4	Visualização do produto de PCR.....	40
4.4	Amostras de biópsia de pele.....	40
4.4.1	Coleta e acondicionamento.....	40
4.4.2	Extração de DNA.....	41
4.5	MLVA (<i>Multiple-locus VNTR Analysis</i>) das amostras de secreção nasal positivas do sistema RLEP e biópsia.....	41
4.5.1	Condições de amplificação: PCR multiplex.....	42
4.5.2	Eletroforese em gel de agarose.....	43
4.5.3	Análise de fragmentos.....	43

4.6	Cálculo da Diversidade Alélica.....	43
4.7	Cálculo do poder discriminatório.....	44
4.8	Aspectos éticos.....	44
4.9	Análise estatística.....	45
4.10	Análise espacial.....	45
5	RESULTADOS.....	46
5.1	Parte 1 – Identificação de ácidos nucleicos de <i>M. leprae</i> em secreção nasal.....	47
5.2	Parte 2 – Genotipagem do <i>M. leprae</i>	55
	REFERÊNCIAS.....	64
	APÊNDICE A.....	71
	ANEXOS A.....	94

1 INTRODUÇÃO

1.1 O gênero *Mycobacterium*

O gênero *Mycobacterium* pertence à ordem Actinomycetales e família Mycobacteriaceae. É constituído por bacilos aeróbios, imóveis, não formadores de esporos, que medindo 0,2 a 0,6 µm de largura por 1 a 10 µm de comprimento. Mesmo com uma grande quantidade de espécies de micobactérias, apenas poucas espécies causam infecções nos seres humanos como o *M. tuberculosis* causador da tuberculose e o *M. leprae* causador da hanseníase. As outras espécies são coletivamente chamadas de micobactérias atípicas, causando infecções oportunistas como o complexo *M. avium*, *M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. chelonae* e *M. abscessus*. Apesar de apresentarem variações de aspectos clínicos entre as espécies de micobactérias, a maioria é transmitida pelas vias respiratórias e apresenta a capacidade de sobreviver dentro de macrófagos (BARKER, 2006).

A classificação das bactérias no gênero *Mycobacterium* baseia-se na sua resistência aos ácidos, na presença de ácido micólico contendo 60 a 90 carbonos que são clivados por pirólise a metil ésteres de ácidos graxos de 22 a 26 carbonos e no alto teor (61 a 71%) de guanina e citosina (G+C) no seu genoma (COLE et al., 2001; VISSA; BRENNAN, 2001).

As micobactérias são resistentes a numerosos detergentes, bem como aos corantes usuais de laboratório, devido a sua parede celular rica em lipídios que torna sua superfície fortemente hidrofóbica. Uma vez corados com fucsina, os bacilos não podem ser descorados com soluções ácidas ou misturas de álcool e ácido, por isso recebem a denominação de bacilos álcool-ácido-resistentes. A estrutura básica da parede celular é composta de membrana citoplasmática interna revestida por uma espessa camada de peptidoglicano. O esqueleto peptidoglicano está covalentemente ligado a polissacarídeos (arabinogalactano) cujas extremidades são esterificadas a ácidos micólicos de alto peso molecular. Essa camada é revestida por polipeptídios e por uma camada hidrofóbica de ácidos micólicos altamente antigênica que é constituída por lipídios, glicolipídios e glicolipopeptídios livres. Esses lipídios constituem 60% do peso seco da parede celular. As cadeias peptídicas também são consideradas antígenos biologicamente importantes, estimulando a resposta imunológica celular do hospedeiro (SCOLLARD et al., 2006a; VISSA; BRENNAN, 2001). A parede celular é responsável também por outras propriedades dessas bactérias como a resistência aos antibacterianos comuns e capacidade de agregação (BARKER, 2006; COLE et al., 2001).

1.2 O *Mycobacterium leprae*

O *M. leprae* consiste em uma bactéria intracelular, imóvel, não formadora de esporos que se apresenta como bacilo reto ou ligeiramente curvado, de 1,5 a 8 µm de comprimento por 0,2 a 0,5 µm de largura (MONOT et al., 2005; WALKER; LOCKWOOD, 2006). Suas cadeias peptídicas constituem antígenos biologicamente importantes que estimulam a resposta imunológica celular do paciente à infecção, a exemplo do antígeno PGL-I (glicolípido fenólico I) que pode ser empregado no imunodiagnóstico (BARKER, 2006).

A inoculação do *M. leprae* foi conseguida pela primeira vez por Shepard em 1960 em pata de camundongo, obtendo uma lesão localizada. Em 1971 Kirchheimer e Storrs conseguiram infectar tatus, verificando o comprometimento da pele, nervos periféricos, medula óssea, fígado, baço, linfonodos, pulmões, meninges e olhos (SHEPARD, 1960; KIRCHHEIMER e STORRS, 1971). O *M. leprae* representa a única espécie do gênero que não pode ser cultivada “*in vitro*” e, portanto, somente é cultivada em modelos animais como o tatu e em patas de camundongos (REES, 1988; SHEPARD, 1960; TRUMAN et al., 1986).

A temperatura ótima para a sua reprodução está entre 27°C e 33°C, o que explica sua predileção por áreas mais frias do corpo como a pele, os nervos periféricos e a mucosa das vias aéreas superiores. Na pele, o *M. leprae* se encontra preferencialmente nos macrófagos, enquanto no tecido neural, localiza-se nas células de *Schwann*, onde pode permanecer por longo período de tempo sem estimular uma resposta imunológica. Nos esfregaços de pele e nos cortes histopatológicos, os bacilos são vistos isolados, em agrupamentos variados ou em arranjos denominados globias, peculiares ao *M. leprae*, que resultam da união de bacilos através de uma substância chamada gléia (R, 2008).

Esta micobactéria apresenta frequência baixa de mutações e tempo de geração de 24 horas, com divisão lenta binária a cada 12 a 21 dias, que limitam a diversidade genética da espécie (BRITTON; LOCKWOOD, 2004; SASAKI et al., 2001). Sugere-se que o crescimento lento do *M. leprae* seja devido a suas categorias de genes funcionais serem consideravelmente menores do que nas outras micobactérias, tendo algumas quase desaparecidas completamente. Embora os principais caminhos anabólicos estejam relativamente intactos, houve redução extensa de genes necessários para a lipólise. Esta é a principal via catabólica usada por micobactérias intracelulares para obter sua energia da degradação de lipídios e ácidos graxos derivados do hospedeiro. Da mesma forma, as vias de

metabolismo energético são mínimas, como o uso de fontes comuns de carbono, tais como acetato e galactose, e ATPs que não podem ser gerados a partir de oxidação do NADH. Além disso, a anaerobiose e sistemas de transferência de elétrons, juntamente com os sistemas de biossíntese e transporte necessários para produzir os grupos protéticos, foram perdidos. Isto implica que o *M. leprae* é restrito ao crescimento em pouca fonte de carbono e o catabolismo é severamente limitado (COLE et al., 2001).

1.3 O Genoma do *M. leprae*

A partir de cepas de *M. leprae* derivadas de tatus foi possível extrair DNA suficiente para realização o sequenciamento do genoma completo da linhagem TN (Tamil Nadu), originalmente isolado de um paciente em Tamil Nadu, Índia. Assim, foi demonstrado que o genoma do *M. leprae* contém 3.268.210 pb, contendo 57,8% teor de G+C, 49,5% (1293) de pseudogenes, 2% de sequências repetitivas, das quais podem ser dispersas (RLEP, REPLEP, LEPREP e LEPRPT) ou em *tandem* (VNTR) (CLARK-CURTISS; WALSH, 1989; COLE et al., 2001; WOODS; COLE, 1990).

Enquanto o *M. tuberculosis* apresenta um genoma de 4.411.532 pb, o qual pode codificar 3.959 proteínas, o *M. leprae* codifica apenas 1.604 proteínas. Esta drástica redução do número de genes no *M. leprae* comparado ao *M. tuberculosis* e a alta quantidade de pseudogenes, afeta aspectos do seu metabolismo, justificando a impossibilidade deste microorganismo de crescer “*in vitro*”. Este processo evolutivo minimalista tornou o *M. leprae* completamente adaptado ao organismo humano (SINGH; COLE, 2011; VISSA; BRENNAN, 2001).

São encontradas mutações em genes envolvidos na regulação (reguladores da transcrição, repressores e ativadores), na desintoxicação (codificadores das peroxidases), nos reparos do DNA (genes *mutT*, *dnaQ*, *alkA*, *dinX* e *dinP*) e em transportes ou efluxo de metabólitos, como os aminoácidos (arginina, ornitina, D-alanina, D-serina e glicina), peptídios, cátions (magnésio, níquel, mercúrio, amônia, íons férricos e ferrosos e potássio) e ânions (sulfato e fosfato). Todavia, no genoma, estão preservados os genes para a síntese da maioria das moléculas menores como aminoácidos, purinas, pirimidinas e ácidos graxos, e para síntese das macromoléculas como os ribossomos, RNA e proteínas estruturais (VISSA; BRENNAN, 2001).

Em se tratando de redução genética, há menos genes em quase todas as categorias, porém as mais notavelmente afetadas são as sequências de inserção e as famílias de proteínas

ricas em glicina que têm ácido glutâmico-prolina ou ácido glutâmico-prolina-prolina no terminal amino. Essas proteínas podem conferir variação antigênica. Assim, enquanto são necessários genes para a transmissão, estabelecimento e sobrevivência no hospedeiro, a redução genética do *M. leprae* pode ser compensada através da vida parasitária dependente do hospedeiro (VISSA; BRENNAN, 2001).

O mecanismo pelo qual pseudogenes surgiram ainda não é conhecido, todavia têm sido proposto diferentes explicações, como uma resposta alterada ou deficiente a estresses ambientais ou mediada pelo hospedeiro que levam ao dano no DNA. Os danos podem ser devido à perda de fatores- sigma e a falta de atividade da DNA polimerase III mediada por DnaQ (que polimeriza a sub-unidade epsilon da holoenzima DNA polimerase III, cuja função da sub-unidade epsilon é a de remover bases de DNA incorporadas de maneira incorrecta), contribuindo para o acúmulo de mutações em genes (BABU, 2003; LIU et al., 2009; TYAGI; SAINI, 2004). Uma importante característica dos pseudogenes do *M. leprae* é a presença de um grande número (variando de 1 a 40) de códons de parada. A minoria (25%) dos pseudogenes transcritos têm códons de início, enquanto a maioria (67%) contém mais de cinco códons de parada (NAKAMURA et al., 2009). A tendência de pseudo-genes é serem eliminados do genoma, porém é intrigante que o *M. leprae* tenha acumulado e mantido muitos deles (SINGH; COLE, 2011).

As sequências repetitivas são constituintes comuns do genoma de todos os organismos vivos, no entanto, ocorrem com maior frequência em eucariontes superiores. Existem duas formas principais de DNA repetitivo no genoma bacteriano; as sequências dispersas e as sequências em *tandem* que se alinham repetidamente (SINGH; COLE, 2011).

As sequências repetitivas dispersas podem corresponder a genes duplicados ou elementos genéticos móveis presentes em inúmeras cópias, como as sequências de inserção (IS – insertion sequences). O tamanho pequeno do genoma do *M. leprae* foi, principalmente, devido a eventos de recombinação entre estas sequências repetitivas. No *M. leprae* existem apenas vestígios de elementos de sequências de inserção, mais de 26 fragmentos de genes de transposases e quatro famílias de repetições dispersas: RLEP (37 cópias); REPLEP (15 cópias); LEPREP (oito cópias); e LEPRPT (cinco cópias) (COLE et al., 2001; MONOT et al., 2009). O RLEP está entre as sequências do genoma que não codificam regiões. A presença do RLEP no final 3' dos genes e muitas vezes dentro de pseudogenes sugere que essas sequências são os remanescentes de transposons que já perderam a capacidade de sofrer transposição. Antigos estudos sobre o RLEP baseados em polimorfismos do comprimento de fragmentos de

restrição (RFLPs) não detectaram diversidade, como foi mais tarde confirmada pela comparação genômica de cepas de *M. leprae* (COLE et al., 2001; WILLIAMS et al., 1990).

As repetições em *tandem* podem ser relativamente simples, como as repetições múltiplas de sequências de dois ou três nucleotídeos, ou mais complexas, como as duplicações em *tandem* de grandes segmentos cromossômicos. Uma importante forma de polimorfismo do DNA de *M. leprae* resulta das variações de sequências de DNA repetidas em *tandem* (VNTRs).

O *M. leprae* exibe pouquíssima variabilidade genética, no entanto, podem ocorrer polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNP-single nucleotide polymorphism) em algumas regiões do seu genoma. Os SNPs podem ser restritos a uma cepa particular ou compartilhados por linhagens. O primeiro sistema de tipificação de SNP foi baseado em três SNPs informativos e usado para tipificar aproximadamente 400 cepas diferentes de 28 países do mundo. Esta abordagem revelou apenas quatro combinações (SNP tipos 1, 2, 3 e 4), com associações geográficas, fornecendo evidência para um esquema evolutivo global do *M. leprae*. A maioria das amostras provenientes da Ásia Central apresentou o tipo um, enquanto que o tipo dois predominou na Etiópia; tipo três na Europa, na África do Norte e nas Américas e o tipo quatro foi mais frequentemente encontrado no Oeste da África e Caribe. Os autores sugeriram que a hanseníase teve a sua origem no Leste da África, por essa região apresentar o tipo dois, mais raro e provavelmente o mais antigo genótipo do *M. leprae* (MONOT et al., 2005).

Posteriormente, 84 marcadores (78 SNPs e seis sequências de inserção e deleção) foram encontrados, permitindo, assim, a classificação de cepas do *M. leprae* em 16 genótipos diferentes, subtipos dos quatro SNP (1A-4P), mais uma vez mostrando uma relação filo geográfica (MONOT et al., 2009). Em um país com casos endêmicos de hanseníase, este sistema pode ajudar a descobrir as possíveis fontes de infecção através da imigração ou da história de residência no estrangeiro dos pacientes. Esse sistema é estável e confiável para a classificação de cepas em regiões mais amplas, no entanto, para estudos de curto alcance de transmissão o indicado é a utilização da genotipagem através dos VNTRs.

1.4 Genotipagem do *M. leprae*

Nos últimos anos, as metodologias de genotipagem de isolados de *M. leprae* têm complementado a epidemiologia convencional de doenças infecciosas. Com a publicação em

2001 da sequência completa do genoma do *M. leprae* cepa TN (COLE et al., 2001), a seleção de marcadores genômicos polimórficos se tornou viável para genotipagem de cepas.

Os primeiros marcadores no genoma do *M. leprae* que apresentaram polimorfismo foram os STRs (*short tandem repete*). Quase todos os STRs estão dentro de regiões intergênicas ou dentro de pseudogenes, sendo improváveis que interfiram em vias biológicas. Poucos STRs, particularmente os minissatélites, estão dentro de genes. Os loci de STRs, classificados como microsatélites (unidades de repetição menor do que 6 pb) ou minissatélites (unidades de repetição de 6 a 100 pb), são excelentes fontes de polimorfismo.

Os STRs apresentam uma frequência de mutação mais elevada devido ao *Slipped - strand mispairing* durante a replicação do DNA, levando à instabilidade clonal. O *Slipped - strand mispairing* é um erro de pareamento causando um “escorregão” da DNA polimerase da fita molde durante a replicação, que acaba por deixar de incorporar STRs ou adicionar novos, formando uma nova fita de DNA com quantidade de repetições diferente da fita molde. Essa hipótese é a mais aceita para explicar o surgimento de variações pequenas no número de repetições entre os diferentes alelos dentro do locus, sendo mais comum em microsatélites. Dessa forma, enquanto que este dinamismo fornece um maior poder discriminatório, a menor estabilidade e reprodutibilidade de alguns desses loci precisa ser considerado, devendo, portanto, ser cuidadosamente selecionados, a fim de extrair informações e ou conclusões epidemiológicas significativas (LOVETT, 2004; MONOT et al., 2008; REYES; TANAKA, 2010).

O sequenciamento do genoma completo das cepas Br4923 (Brasil), Thai53 (Tailândia) e NHDP63 (*National Hansen's Disease Program-EUA*), mostrou que o genoma Br4923 compreende 3.268.071 pb, o qual em relação ao genoma TN sofreu um decréscimo de 141pb atribuído ao maior número de cópias de loci de repetições em tandem (VNTR - *Variable Number Tandem Repeat*) na cepa TN. No total, os genomas Br4923 e TN diferem em 185 loci, que incluem 146 SNPs, 31 regiões VNTR, e oito de eventos de inserção-deleção (Indel). A comparação do genoma das cepas Thai53 (Tailândia) e NHDP63 (EUA) com as cepas TN e Br4923 revelou apenas 215 sítios polimórficos e mais de 99,995% do genoma idêntico entre essas linhagens geograficamente distantes e alguns eventos de recombinação entre repetições dispersas (RLEP) (MONOT et al., 2009). Quase 25% do total de SNPs ocorrem nestas sequências de repetições dispersas, as quais ocupam apenas 1,16% do genoma. Isso pode indicar que eventos de recombinação entre diferentes cópias dos elementos repetitivos resultam na dispersão de um SNP específico (SINGH; COLE, 2011).

Os STRs têm sido utilizados com sucesso para tipagem do *M. tuberculosis* bem como para outras micobactérias (ALLIX-BÉGUEC et al., 2008; SUPPLY et al., 2006; THIBAUT et al., 2008). No *M. leprae* o primeiro STR reportado como marcador genético foi uma sequência intragênica de seis pb no gene *rpoT* (MATSUOKA; KASHIWABARA; NAMISATO, 2000) que se apresentou como dois alelos dentro do gene do *M. leprae*: as cepas dos pacientes no Japão (com exceção de Okinawa) e Coreia apresentaram três cópias da unidade de repetição, enquanto aqueles do Brasil, Haiti, e Okinawa, no Japão, exibiram quatro cópias. O segundo foi um elemento de repetição de um pseudogene (TTC) (SHIN et al., 2000), do qual foram detectados alelos com variações de 10 a 37 cópias. Essas sequências apresentaram números variáveis de repetições em *tandem* (VNTRs) quando sequenciadas em diferentes isolados.

Estes estudos inspiraram outros pesquisadores a iniciarem uma análise mais abrangente do potencial de outros STRs no *M. leprae*, porque quando vários loci independentes de STRs de amostras clínicas são avaliados, padrões únicos ou “*fingerprints*” emergem. Assim, cerca de 50 loci de VNTR têm sido identificados no *M. leprae* (GILLIS et al., 2009; GROATHOUSE et al., 2004; MATSUOKA; KASHIWABARA; NAMISATO, 2000; MATSUOKA et al., 2004; SHIN et al., 2000; TRUMAN et al., 2004; YOUNG et al., 2004; ZHANG; BUDIAWAN; MATSUOKA, 2005).

Em 2004 Groathouse et al. (2004) pré-selecionaram 44 loci (incluindo o *rpoT* e TTC) do genoma do *M. leprae* e realizaram a triagem de 11 loci STR, dos quais 9 foram polimórficos vindo de quatro isolados humanos e testados através de passagens em tatus. Cinco eram minissatélites (6 a 50 pb unidades de repetição) e quatro eram microsatélites (1 a 5pb unidades de repetição). Esses autores detectaram os VNTRs entre as amostras pela diferença na migração do produto de PCR na eletroforese em gel de agarose a 3%, demonstrando que existiam pelo menos dois alelos para os loci testados, também sequenciaram alguns produtos de PCR para confirmar que os alelos nos loci variam em tamanho devido aos VNTRs.

Matsuoka et al. (2004) aplicaram o locus de microsatélites (TTC) 21 para genotipar *M. leprae* obtidos a partir de swab nasal e lâminas de baciloscopia da pele de pacientes de uma aldeia, ou de uma mesma casa na Indonésia. Enquanto Young et al. (2004) combinaram os loci de VNTR (AT) 15, (GTA) 9, e (TTC) 21 para a identificação de cadeias de transmissão de curto e longo alcance do *M. leprae* em áreas dentro e ao redor da cidade de Hyderabad, na Índia. Truman et al. (2004) demonstraram que os loci (TTC) 21, AT17, TA18 e (GTA)9 foram estáveis depois de múltiplas passagens em tatus e patas de camundongos,

enquanto Matsuoka et al. (2004) comprovaram a estabilidade do locus (TTC) 21 depois de onze passagens em patas de camundongos.

Monot et al. (2008) mapearam cinco STR loci do *M. leprae* em pacientes de Mali, na África e concluíram que nesta área de endemicidade, múltiplas cepas dominantes são encontradas e que marcadores genéticos adicionais são necessários para a genotipagem.

Em estudos na China e nas Filipinas, *M. leprae* foi genotipado em amostras de biópsia de pele e lâminas de BAAR antes do início do tratamento e em dois meses de intervalo durante o tratamento. Estes estudos revelaram variabilidade intrapaciente (principalmente em repetições de di-ou trinucleotídeos como AT17 e GAA21), enquanto que outros loci mantiveram-se estáveis, permitindo assim que os autores estabelecessem relações de transmissão entre os isolados de famílias ou da mesma cidade (SAKAMURI et al., 2009; XING et al., 2009).

A variabilidade genética entre cepas do *M. leprae* no contexto familiar, foi observada por Sakamuri et al (2009). Neste estudo, os autores estudaram três pacientes da mesma família, dos quais dois apresentaram cepas correspondentes, mas diferente de um dos pacientes em quatro loci de 13 VNTRs. Quando foi considerada a informação epidemiológica, verificou-se que esta família tinha uma história de outros cinco pacientes com hanseníase (SAKAMURI et al., 2009).

A partir de uma cepa de referência foram feitos ensaios para testar a sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade dos 16 loci: (AC)8a, (AC)8b, (AC)9, (AT)15, (AT)17, (TA)10, (TA)18, (GGT)5, (GTA)9, 6-7, 12-5, 18-8, 21-3, 23-3, (GAA) 21 e 27-5 (GILLIS et al, 2009). Como medida de sensibilidade de limite inferior, foi analisada a capacidade para detecção de *M. leprae* de cada par de primer, usando reações de PCR em concentrações de 1000 *M. leprae* / PCR (200.000.000 bacilos/ml), 100 *M. leprae* / PCR (200.000 bacilos/ml) e 10 *M. leprae* / PCR (2000 bacilos/ml). De cada concentração foram feitas cinco reações idênticas, sendo os produtos analisados em gel de agarose, observando-se a intensidade da banda no gel. Por conseguinte, a partir da concentração de 10 *M. leprae* / PCR todos os pares de iniciadores produziram um fragmento visível no gel e produziram somente uma única banda dominante, exceto o locus (GAA) 21 que produziu uma banda fraca secundária. Já em altas concentrações de *M. leprae* os loci (AC) 8a, (AT) 15, (AT) 17, (TA) 10, (TA) 18, 21 (GAA), 18-8 e 6-7 produziram pelo menos outra banda menor visível no gel. Para avaliar a especificidade e reprodutibilidade, o produto das reações de PCR na concentração de 1000 *M. leprae* / PCR foram sequenciados por dois sequenciadores diferentes. Todos os loci foram identificados como específicos do *M. leprae* pelos dois sequenciadores utilizando ambos

primers forward ou reverse. Para avaliar a estabilidade de 13 loci durante a infecção, cepas NHDP60 do *M. leprae* foram inoculadas em tatus, representando quatro ciclos de infecção ao longo de um período de cinco anos. Todos os loci, com exceção do (GAA) 21 foram encontrados estáveis ao longo do tempo (GILLIS et al., 2009). Dessa forma, todos os pares de iniciadores passaram nos critérios de sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade.

A variabilidade também deve ser avaliada em termos de se as mudanças em um ou mais STRs permite a detecção de clusters do bacilo.

Kimura et al (2009) relataram o desenvolvimento, teste e reprodutibilidade da técnica de análise de múltiplos loci de VNTR (MLVA) do *M. leprae* em cepas derivadas de tatus e de materiais clínicos, além das variações no número de repetição dos loci propostos. Esses autores padronizaram a amplificação de 17 loci em quatro combinações de multiplex PCR. Todas as combinações foram otimizadas com o DNA da cepa chamada de NHDP63 obtido do tecido de um tatu infectado com bacilos de um hanseniano e, posteriormente, esse DNA foi utilizado como referência para o mapeamento de VNTR.

Para testar a viabilidade do multiplex PCR e FLA (*Fragment Length Analysis*) em amostras clínicas, Kimura et al (2009) usaram DNA de 30 amostras armazenadas de biópsias de pacientes com hanseníase. Adicionalmente, um conjunto de amostras foi submetido a multiplex PCR utilizando iniciadores não marcados e sequenciamento de DNA. Para cada combinação, foram aleatoriamente testados pelo menos três isolados de DNA. Assim, foi constatado que os alelos determinados por sequenciamento dos amplificadores estavam em total concordância com os estimados pelo FLA.

Para testar a reprodutibilidade da FLA, Kimura et al (2009) realizaram multiplex PCR várias vezes usando o DNA da cepa NHDP63 e os produtos de cada PCR foram submetidos a FLA em dias separados. As amostras clínicas foram também submetidas a PCR multiplex e FLA com *Qiagen* enzima multiplex e outra enzima (*AmpliTaq Gold; Applied Biosystems*). Em geral, os tamanhos dos picos e padrões permaneceram estáveis entre os experimentos de PCRs independentes e FLA, sendo também demonstrado que a variação devido a DNA polimerase é mínima e insignificante. Além disso, quando os produtos do multiplex PCR foram armazenados para FLA, não houve significativas mudanças nos perfis, indicando que os produtos podem ser armazenados até um ano a -20 °C.

Em 21 amostras de tatu e a cepa TN no estudo de Kimura et al (2009) foi observado uma diversidade genética de Nei (1978) de 0,5463 (para 16 loci) e de 0,54 (para 15 loci) em 30 isolados clínicos das Filipinas. Para esses mesmos loci, a diversidade genética de 27 isolados, principalmente de origem japonesa relatados por Zhang et al. (2005), foi de 0,6,

esses índices de diversidade são comparáveis aos sistemas de tipagem por VNTR de outras bactérias. Com o *Bacillus anthracis*, um sistema de oito VNTR-locus foi utilizado para tipagem, demonstrando uma média de diversidade de 0,52 para 89 isolados (KEIM et al., 2000). Com *Salmonella entérica* sorovar *S. Enteritidis*, Malorny et al. (2008) demonstraram a discriminação de isolados em um sistema de tipagem com base em nove loci VNTR mesmo com a diversidade alélica individual variando de 0,07 a 0,65 (MALORNY; JUNKER; HELMUTH, 2008). Para tipagem de cepas de *M. tuberculosis*, Supply et al. (2006) demonstraram uma diversidade genética média de 0,58 para 24 loci (SUPPLY et al., 2006).

Dessa forma, o MLVA (Análise de multi loci de VNTR através de FLA) foi depois aplicado em estudos de base populacional em Cebu, Filipinas (SAKAMURI et al., 2009), ficando estabelecida que a capacidade de distinguir cepas com apenas 15 loci e o fato de permitir que os produtos *stutter* de PCR possam ser distinguidos a partir do pico principal do alelo, demonstra o potencial do MLVA para tipagem molecular do *M. leprae*. Assim, microssatélites tendem a apresentar maior diversidade alélica do que os minissatélites e quando esses são combinados são considerados úteis na diferenciação de amostras de diferentes países e regiões geográficas (SAKAMURI et al., 2009) e apropriado para monitorar a disseminação do *M. leprae* a curtas distâncias, tais como dentro de uma região ou uma cidade.

1.5 Hanseníase

Os mais antigos registros escritos descrevendo a doença são a partir de antigos textos indianos no Sushruta Samhita cerca de 600 AC, que certamente foram transmitidos oralmente através de séculos anteriores. Há também descrições da doença em textos antigos do Egito. O esqueleto com hanseníase mais antigo encontrado foi em Balathal na Índia com 4.000 anos de idade (LOWE, 1947; HULSE, 1972).

A principal porta de entrada para a Europa foi pelos comerciantes, colonizadores e soldados gregos, entre os séculos X e XV. Durante os séculos XVII e XVIII, a doença diminuiu acentuadamente no continente europeu em decorrência das melhores condições socioeconômicas. Durante o período de colonização, a América Latina tornou-se o grande foco endêmico de hanseníase, principalmente por colonizadores portugueses e escravos africanos. Nesta mesma época, colonizadores escandinavos disseminaram a hanseníase na América do Norte (LOWE, 1947; MONOT et al., 2005).

A doença entrou no Brasil por vários pontos do litoral com os primeiros colonizadores portugueses, principalmente açorianos, e para sua disseminação muito contribuíram os escravos africanos. Os primeiros casos registrados foram no Rio de Janeiro no ano de 1600. Após isso, outros focos da doença foram identificados, principalmente na Bahia e no Pará (ANTONIO; SANTOS; ARMAUER, 2008).

A causa da doença somente foi conhecida depois de 1873, quando o norueguês Gerhard Henrik Armauer Hansen, ao examinar as células leprosas encontradas nos nódulos de um doente, percebeu a presença do bacilo no microscópio (R, 2008).

Até a década de 1950, o tratamento era feito basicamente com o óleo de chaulmoogra, medicamento fitoterápico e originário da Índia que não agia diretamente sobre o bacilo, mas apenas sobre os efeitos da doença já instalada nos pacientes. O chaulmoogra e o isolamento eram considerados as melhores formas de se tratar a hanseníase. Somente após a Segunda Guerra mundial, com os avanços da indústria químico-farmacêutica, os exames laboratoriais e a descoberta de agentes etiológicos de várias doenças, é que foram empregados quimioterápicos para o tratamento (MACIEL et al., 2003).

No Brasil, a política de controle da doença, após a década de 1930, era feita, sobretudo com a construção de leprosários nas unidades da federação, algumas inclusive com mais de um hospital (LIMA et al., 2003).

Em 1958, foi realizado o Sétimo Congresso Internacional de Leprologia em Tóquio ratificando que a forma de contágio não era hereditária e havia possibilidade de cura com os antibióticos. Assim, o isolamento questionado desde a década de 1920, como um fator de cura, não deveria mais ser recomendado como elemento fundamental de tratamento para a doença (MACIEL et al., 2003).

No Brasil, a aprovação do decreto nº 165, de 14 de maio de 1976, com o qual a doença teve seu nome alterado oficialmente para hanseníase, resultou em uma ampla mobilização com o intuito de diminuir o preconceito existente na palavra lepra e seus derivados (MACIEL et al., 2003).

Em junho de 1981, a criação do MORHAN (Movimento de Reintegração das Pessoas Atingidas pela Hanseníase) foi um marco na forma de assegurar os direitos dos pacientes, garantindo a reinserção social dos afetados pela hanseníase. Este momento político, marcado como praticamente o final de uma ditadura militar de quase 20 anos e a busca pela democracia no Brasil, assistiu a realização da Oitava Conferência Nacional de Saúde, em 1986, recuperando os direitos dos cidadãos e discutindo a desativação dos leprosários que tiveram seu papel redefinido (MACIEL et al., 2003).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou que a hanseníase foi eliminada como problema global no ano de 2000, apesar da notificação de 719.330 casos novos nesse mesmo ano. Do total de 122 países considerados endêmicos em 1985, 107 atingiram a meta estabelecida pela OMS (BRITTON; LOCKWOOD, 2004).

1.6 Aspectos epidemiológicos

A poliquimioterapia (PQT) foi instituída pelos programas de controle global da hanseníase, o qual curou mais de 14 milhões de pessoas nos últimos 20 anos. Embora isso se correlacione com mais de uma redução de 90% na taxa de prevalência, a cadeia de transmissão não foi quebrada com cerca de 250.000 casos novos de hanseníase ainda sendo registrados anualmente e concentrados em alguns países. Isso se traduz na identificação de um caso novo aproximadamente a cada 2 minutos, ressaltando a necessidade de prosseguir com o compromisso de controle da doença e pesquisas em hanseníase. As regiões mais afetadas pela hanseníase em 2012 foram: 25 países da África, 28 das Américas, 20 do Mediterrâneo, 11 do Sudeste da Ásia e 31 países do Pacífico Ocidental. De acordo com OMS (WHO, 2013) e a partir de relatórios de 130 países, houve um aumento na prevalência global registrada e detecção de casos novos em 2012, que foi de 181.941 casos (0,34), em comparação com 189.018 (0,33) ao fim do primeiro trimestre de 2013 (TALHARI et al., 2012).

A distribuição dos casos novos detectados em 2012 pela OMS foi semelhante aos achados nos anos anteriores. O Sudeste da Ásia responderam por 71% dos casos novos detectados em todo o mundo, a região das Américas por 16%, África por 9%, Oriente Mediterrâneo por 2% e o Pacífico Ocidental por 2% (WHO, 2013).

No Brasil, em 2012, o coeficiente de prevalência de hanseníase foi de 1,51 caso/10 mil habitantes, o que representou uma redução de 12% em relação ao valor do coeficiente no ano 2004 (1,71 caso/10 mil habitantes). Nesse mesmo ano, foram diagnosticados 33.303 casos novos, sendo 2.246 (7%) em menores de 15 anos, ficando um coeficiente geral de detecção de 17,2/100 mil habitantes, considerado muito alto (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

Os estados do Mato Grosso, Maranhão e Tocantins apresentaram os coeficiente de prevalência mais altos (entre 5 e 9,99 casos/ 10 mil habitantes) comparando com os estados da região Sul, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo, na região Sudeste, somados ao Rio Grande do Norte, no Nordeste (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

O Estado do Ceará, em 2012 apresentou 2.136 casos novos, com um coeficiente de detecção geral de 24,82 e em menores de 15 anos de 5,3/100.000 habitantes, demonstrando a existência de focos de transmissão ativos de hanseníase, com uma média anual de 5,9% do total de casos notificados da doença nessa faixa etária. Entre os 184 municípios do Ceará, 29 (16%) não notificaram casos em 2010, 32 são considerados hiperendêmicos, dos quais 14 com menos de 10 casos novos. A capital Fortaleza apresentou 24,4 casos/100 mil habitantes em 2012. No entanto, observa-se queda expressiva no coeficiente geral de detecção de 2,2 casos/100 mil habitantes ao ano, nos últimos 10 anos (SECRETARIA DO ESTADO DO CEARÁ, 2013).

A manifestação da doença na pessoa infectada pelo bacilo e suas diferentes formas clínicas dependem, dentre outros fatores, da relação parasita/hospedeiro e pode ocorrer após um longo período de incubação, que varia de dois a sete anos. Além das condições individuais, outros fatores relacionados aos níveis de endemia e às condições socioeconômicas desfavoráveis, assim como condições precárias de vida e de saúde e o número elevado de pessoas convivendo em um mesmo ambiente, influenciam no risco de adoecer (JOYCE, 2012; KERR-PONTES et al., 2004).

A hanseníase pode atingir pessoas de todas as idades, de ambos os sexos, no entanto, raramente ocorre em crianças. Observa-se que crianças, menores de quinze anos, adoecem mais quando há uma maior endemicidade da doença. Em geral, os maiores coeficientes de detecção de casos são no sexo masculino, considerado geralmente o risco de exposição como o fator responsável (BRITTON; LOCKWOOD, 2004; JOYCE, 2012).

O homem é considerado o único reservatório natural do *M. leprae*, apesar de haver relato de animais selvagens naturalmente infectados, como tatus e macacos (MEYERS; GORMUS; WALSH, 1992; TRUMAN et al., 1986). As vias aéreas superiores representam a principal via de entrada e de eliminação do *M. leprae*. No entanto, o mecanismo preciso de transmissão do *M. leprae* ainda é desconhecido (BRITTON; LOCKWOOD, 2004; JOYCE, 2012).

O *M. leprae* é capaz de sobreviver fora do corpo humano por vários meses sob condições desfavoráveis. Adicionalmente, acredita-se que os reservatórios ambientais do *M. leprae* não podem ser excluídos devido à existência de um considerável número de observações epidemiológicas e microbiológicas que indicam que as fontes ambientais podem desempenhar um importante papel na transmissão da doença. Várias fontes ambientais têm sido estudadas a fim de comprovar a contaminação indireta e incluem solo, vegetação, água,

artrópodes, tatus e macacos (BRITTON; LOCKWOOD, 2004; LAVANIA et al., 2008; SASAKI et al., 2001).

1.7 Classificação e manifestações clínicas

A hanseníase tem recebido várias classificações. Rabello, em 1937, descreveu a forma indeterminada (I) e as formas polares tuberculóide (TT) e virchowiana (V) (RABELLO, 1937). No Congresso Internacional de Leprologia realizado em Madrid, em 1953, foram mantidos os critérios propostos por Rabello, acrescentando-se um novo grupo de pacientes, a que se denominou “borderline” ou dimorfo (R, 2008).

Na década de 1960, Ridley e Jopling propuseram uma modificação na classificação de Madrid, introduzindo o conceito da classificação espectral da hanseníase, subdividindo os dimorfos em dimorfo-tuberculóide (DT), dimorfo-dimorfo (DD) e dimorfo-virchowiano (DV). Foi mantido o conceito de polaridade da doença e essa classificação, denominada espectral, foi fundamentada em parâmetros clínicos e histopatológicos (RIDLEY e JOPLING, 1966). Nos estudos de Ridley e Jopling (1966), foram incluídos somente casos com lesões de pele, associados ou não a lesões de nervo. A forma neural pura não foi incluída dentro do espectro, assim como o grupo indeterminado da Classificação de Madrid. A respeito dessas duas apresentações da doença, Ridley e Jopling referem que no caso da hanseníase neural pura o espessamento do nervo aparece precocemente nos casos TT, mas pode ser visto em todos os casos, à exceção dos casos V. Relata-se que os pacientes TT apresentam um ou dois nervos comprometidos, enquanto os doentes DT ou DD apresentam vários nervos comprometidos (RIDLEY e JOPLING, 1966).

Visando o tratamento poliquimioterápico dos pacientes, em 1982, a OMS adotou a forma paucibacilar (PB) para os pacientes I, TT e a maioria dos DT, todos com índice baciloscópico (IB) menor que 2+ da Escala de Ridley e a forma multibacilar (MB) para os pacientes DD, DV e V, todos com IB igual ou maior que 2+. No entanto, nos últimos anos, a OMS vem dividindo os pacientes na forma paucibacilar e forma multibacilar, sendo esta uma classificação operacional que objetiva o tratamento e que considera o número de lesões cutâneas (RIDLEY, 1974; OMS, 2013; PARDILLO et al., 2007)

No Brasil, o Ministério da Saúde classificou a hanseníase conforme a Portaria 817 de 26 de julho de 2000, considerando pacientes paucibacilares aqueles com menos de cinco lesões de pele e/ou com comprometimento de um tronco nervoso e pacientes multibacilares aqueles com cinco ou mais lesões de pele e/ou com comprometimento de mais de um tronco

nervoso. No grupo multibacilar são colocados todos os casos com baciloscopia positiva, qualquer que seja o IB (BRASIL-MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000).

Admite-se que a hanseníase virchowiana possa evoluir a partir da forma indeterminada ou apresentar-se como tal desde o início. Sua evolução crônica caracteriza-se por máculas simétricas, ligeiramente eritematosas, mal delimitadas, que progridem a uma infiltração generalizada e difusa da pele, mucosa das vias aéreas superiores, olhos, testículos, nervos, podendo afetar, ainda, os linfonodos, o fígado e o baço. Na pele descrevem-se pápulas e nódulos. A infiltração é difusa e mais acentuada nos sítios de menor temperatura do corpo como na face e nos membros. Há rarefação dos pêlos nos membros, cílios e supercílios. A queda dos pêlos nesse local chama-se *madarose*. As infiltrações da face, incluindo os pavilhões auriculares, com *madarose* e manutenção da cabeleira, formam um quadro conhecido como *facies* leonina. A manutenção da cabeleira dá-se devido ao couro cabeludo corresponder a um sítio de maior temperatura. O comprometimento nervoso ocorre nos ramúsculos da pele, na inervação vascular e nos troncos nervosos. Esses últimos vão apresentar deficiências funcionais e sequelas tardias (LOCKWOOD; SUNEETHA, 2005; WALKER; LOCKWOOD, 2006).

Os macrófagos dos pacientes virchowianos não são capazes de eliminar os bacilos fagocitados, o que propicia a sua sobrevivência e multiplicação no interior desses fagócitos, que desse modo, transformam-se em células de virchow, repletas de bacilos (com grandes quantidades de lipídios em sua parede) e de gotas de gordura. Nestes doentes encontram-se abundantes bacilos na pele e na mucosa nasal. No entanto, pacientes V não são hospedeiros imunocomprometidos. A anergia imunológica associada aos pacientes V é específica para antígenos de *M. leprae* (BARKER, 2006; FOSS; CAROLINA; MOTTA, 2012).

Pacientes V têm predominância da resposta humoral, representam a forma multibacilar e nos casos virgens de tratamento são um importante foco infeccioso e reservatório da doença. A forma V apresenta baciloscopia fortemente positiva (FOSS; MOTTA, 2012).

Na hanseníase tuberculóide encontram-se lesões bem delimitadas, em número reduzido, hipopigmentadas, anestésicas e de distribuição assimétrica. Descrevem-se lesões em placas com bordas papulosas e áreas da pele eritematosas. Seu crescimento lento leva à atrofia no interior da lesão com descamação das bordas. Observa-se ainda, a variedade infantil que se localiza principalmente na face, podendo se manifestar como nódulos ou placas (SCOLLARD et al., 2006b; WALKER; LOCKWOOD, 2006).

Os pacientes TT apresentam resposta imune celular, Th1, que restringe o crescimento do patógeno, constituindo a forma paucibacilar da hanseníase. Apesar da possibilidade de cura espontânea, a orientação é de que os casos sejam tratados para reduzir o tempo de evolução da doença e o risco neural (FOSS; MOTTA, 2012; LOCKWOOD; SUNEETHA, 2005).

O grupo indeterminado não faz parte da classificação espectral de Ridley e Jopling, inclui os pacientes que apresentam as manifestações iniciais da hanseníase, sendo uma forma benigna da doença. É considerada uma forma transicional, com padrão imunológico ainda não definido. Na hanseníase indeterminada, as lesões surgem após um período de incubação que varia de dois a cinco anos. Ocorre o aparecimento de manchas hipocrômicas e com alteração de sensibilidade que podem ocorrer em pequeno número e em qualquer área da pele. Geralmente, apenas a sensibilidade térmica encontra-se alterada sem comprometimento de troncos nervosos. Na histopatologia não há evidência de granuloma e o infiltrado inflamatório é inespecífico. A baciloscopia revela-se negativa. Essa forma, que é considerada a primeira manifestação clínica da hanseníase, pode evoluir para cura ou para outra forma clínica (R, 2008; WALKER; LOCKWOOD, 2006).

O grupo dimorfo é composto por pacientes que se situam na área interpolar, pois não podem ser classificados em um dos tipos polares da hanseníase. Tais pacientes apresentam lesões com estruturas tanto da hanseníase virchowiana, quanto da tuberculóide em reação. A hanseníase dimorfa é caracterizada pela sua instabilidade imunológica, o que faz com que haja grande variação em suas manifestações clínicas, seja na pele, nos nervos, ou no comprometimento sistêmico. As lesões da pele são numerosas e sua morfologia mescla aspectos de DV e DT, podendo haver predominância de uma ou de outra (ARMOUR; SCOLYER; BARNETSON, 2005; FOSS; MOTTA, 2012).

A forma DT é similar à tuberculóide, porém as lesões são mais numerosas. A forma DV diferencia-se da forma virchowiana pelo fato das lesões serem mais definidas e com áreas de pele saudáveis entre elas. A forma DD é uma forma instável que pode variar de DT a DV, caracteriza-se pela presença de placas com bordas elevadas e bem delimitadas, com ilhas de pele aparentemente saudáveis. A baciloscopia pode ser negativa ou positiva com índice bacilar variável (ARMOUR; SCOLYER; BARNETSON, 2005; R, 2008).

Na forma neural pura não se encontram lesões cutâneas. Há comprometimento de um ou mais nervos periféricos com espessamento do tronco nervoso e dano neural precoce, principalmente quando atinge nervos sensitivo-motores (SCOLLARD et al., 2006b; WALKER; LOCKWOOD, 2006). Na classificação espectral de Ridley e Jopling, essa forma

não está incluída, embora esteja descrita como subtipo das formas tuberculóide e dimorfa (RIDLEY; JOPLING, 1966).

Os surtos reacionais representam episódios inflamatórios que se intercalam no curso crônico da hanseníase. Os tipos de reações mais importantes são a reação reversa ou reação do tipo 1 e a reação do tipo 2 ou eritema nodoso da hanseníase (CUEVAS et al., 2007; FOSS; MOTTA, 2012).

A reação do tipo 1 corresponde a uma reação de hipersensibilidade que pode ocorrer em 30 % dos pacientes com as formas dimorfas. Caracteriza-se pela exacerbação das lesões preexistentes que se tornam edemaciadas, eritematosas brilhantes, podendo chegar a ulceração. Podem surgir lesões novas e as neurites são frequentes podendo ser a única manifestação clínica (CUEVAS et al., 2007; FOSS; MOTTA, 2012).

A reação do tipo 2 pode afetar 20% dos pacientes virchowianos e 10% dos pacientes com a forma DV, sendo mais frequente quanto maior a infiltração cutânea e o índice bacteriano. É desencadeada por depósitos de complexos imunológicos e está associada a concentrações elevadas do fator de necrose tumoral- α (TNF α). O eritema nodoso é a lesão típica epidérmica e é caracterizada por lesões eritematosas dolorosas, de tamanhos variados, incluindo pápulas e nódulos localizados em qualquer região da pele. A presença de febre alta pode acompanhar essa reação (FOSS; MOTTA, 2012; RADA et al., 2012).

1.8 Tratamento

O tratamento da hanseníase compreende a quimioterapia intensiva, supressão dos surtos reacionais, prevenção de incapacidades físicas, reabilitação física e psicossocial. O esquema terapêutico depende da classificação operacional do caso. As drogas utilizadas são a rifampicina, dapsona e clofazimina. O fornecimento do medicamento é gratuito no Brasil. Há também tratamentos alternativos que utilizam o esquema rifampicina, ofloxacina, minociclina para tratamento de lesão única de pele em pacientes paucibacilares (OMS, 2008).

1.9 Vacina BCG

A Vacina BCG (Bacilo Calmette Guérin) previne doenças micobacterianas, incluindo a hanseníase e a tuberculose. Em neonatais a vacina BCG é rotineiramente utilizada na maior parte do mundo, inclusive no Brasil, para evitar a tuberculose (RODRIGUES et al., 2007).

Estudos realizados na Índia e no Brasil demonstraram que a BCG protege contra a hanseníase. No estudo brasileiro, os resultados sugerem que a vacinação de neonatos com BCG pode ter um importante impacto sobre a transmissão da hanseníase e que mesmo micobactérias ambientais não interferem na eficácia da vacina, pelo menos na Região Amazônica. Já o estudo indiano mostrou uma eficácia da vacina de 54%, com o maior efeito protetor visto na forma multibacilar (68%) e sugeriu que a vacina é bastante eficaz para evitar a transmissão do *M. leprae* dentro de uma comunidade (CUNHA et al., 2004; ZODPEY; AMBADEKAR; THAKUR, 2005).

Em outro estudo no Brasil, os resultados demonstraram uma elevada eficácia de 86% da vacinação com BCG contra a hanseníase até a idade de 29 anos (RODRIGUES et al., 2007). Esta estimativa de proteção está dentro da faixa fornecida em três outros estudos mais antigos realizados em diferentes estados do Brasil, em que foi encontrado uma proteção de 74% em Manaus, no Norte (CUNHA et al., 2004), 81% na região central (RODRIGUES et al., 1992) e 90% em São Paulo, no Sudeste do país (LOMBARDI et al., 1996).

Rodrigues et al. (2007) constataram que o efeito da proteção da BCG contra a hanseníase pode durar pelo menos 30 anos, e sugerem que eventualmente poderá durar mais de 40 anos. Seus resultados também demonstraram que os adultos portadores da cicatriz de BCG, por volta de 40 anos, apresentaram menor risco de contrair hanseníase. Assim, este estudo adiciona à nova e crescente evidência de que a proteção da BCG contra a tuberculose e a hanseníase pode durar mais tempo do que se creditava anteriormente (RODRIGUES et al., 2007).

1.10 Diagnóstico

O diagnóstico da hanseníase mais utilizado baseia-se na clínica, sendo confirmado pela baciloscopia. Outros exames podem ser necessários como o exame histopatológico da pele, biópsia do nervo, a reação de Mitsuda e testes sorológicos (SASAKI et al., 2001).

O exame histopatológico da pele é importante para diminuir dúvidas no diagnóstico, bem como para a classificação da doença. Histologicamente, a presença de inflamação neural diferencia a hanseníase de outras desordens granulomatosas (BRITTON; LOCKWOOD, 2004).

A baciloscopia é o exame complementar mais útil no diagnóstico, sendo de fácil execução e baixo custo. Sua alta especificidade permite a identificação de pacientes com

maior potencial de infectividade e aqueles com maior risco de reincidência. A coleta é feita nos lóbulos das orelhas, cotovelos e em lesão suspeita. A coloração é feita pelo método de Ziehl-Neelsen, sendo o resultado apresentado como índice baciloscópio (BRASIL, 2010).

A Mitsudina, nome adotado no Brasil para a lepromina, ainda é muito utilizada na Região Norte brasileira. Consiste de uma injeção intradérmica de bacilos de Hansen inativados pelo calor, extraídos mecanicamente de hansenomas de pacientes virgens de tratamento ou de tecidos de tatus infectados pelo *M. leprae*. A reação é considerada positiva com o aparecimento de uma infiltração fraca, pápula ou nódulo com mais de três milímetros de diâmetro. Isso ocorre devido aos bacilos desta suspensão serem fagocitados pelos macrófagos, que em seguida se transformam em células epitelióides. Dessa forma, a reação de Mitsuda é negativa em pacientes V, positiva em pacientes TT, fracamente positiva em pacientes dimorfos e variável no grupo com a forma indeterminada. Em outras palavras, a reação positiva somente indica que os macrófagos de um indivíduo são capazes de destruir tanto os bacilos de Hansen mortos quanto vivos, não sendo muito útil no diagnóstico da doença. Este teste é usado na classificação da doença e na definição do prognóstico, portanto não empregado no diagnóstico (BEIGUELMAN, 2002; SCOLLARD et al., 2006b).

A aplicação do teste sorológico para detecção de anticorpos antiPGL-I constitui mais um recurso diagnóstico em hanseníase, principalmente nas formas multibacilares. As indicações mais precisas seriam para o diagnóstico de infecção subclínica, mapeamento soropidemiológico, acompanhamento terapêutico e detecção precoce de recidiva da doença. Todavia o teste não é útil com fins de diagnóstico em uma comunidade endêmica (FROTA et al., 2010). Estudos têm documentado a relação entre os níveis de endemicidade da hanseníase na população e soroprevalência em diferentes partes do mundo. Assim, o rastreamento de contatos de hanseníase, mediante a sorologia em área de alta endemicidade, pode ser útil nas medidas de controle da moléstia (NAGAO-DIAS et al., 2007; SASAKI et al., 2001; SCOLLARD et al., 2006b).

A avaliação da função motora deve ser feita principalmente nos pacientes em tratamento, com a finalidade de detecção precoce de incapacidades. Sequelas bem definidas podem ser encontradas já no período do diagnóstico, tais como: a paralisia facial do tipo periférico unilateral ou bilateral, ou a paralisia do ramo orbicular no nervo zigomático (BRITTON; LOCKWOOD, 2004).

A identificação do *M. leprae* é difícil devido à inabilidade do bacilo para crescimento “*in vitro*”, assim, o diagnóstico da hanseníase é baseado na detecção microscópica do bacilo em combinação com a avaliação clínica. Entretanto, a baciloscopia

apresenta baixa sensibilidade por requerer, no mínimo, 10.000 bacilos por grama de tecido para sua detecção e comparando-se a classificação clínica, através do número de lesões cutâneas, com os resultados dos exames baciloscópicos, foi demonstrado que o método clínico também apresenta baixa sensibilidade (BUHRER-SEKULA et al., 2000; CROFT; CROFT, 1998).

O estudo do DNA utilizando a técnica da PCR tem sido utilizado para o diagnóstico molecular do *M. leprae*, pois permite detectar a presença do bacilo mesmo que esse esteja em pequenas quantidades, sugerindo vantagem quando comparada ao exame histopatológico e baciloscópico convencionais (BANERJEE et al., 2010; CARDONA-CASTRO; BELTRÁN-ALZATE; MANRIQUE-HERNÁNDEZ, 2008; JOB et al., 2008). A PCR apresenta especificidade de 100% e uma alta sensibilidade (80%) quando comparada com a baciloscopia e a histopatologia (28% e 31% respectivamente). Estas diferenças de sensibilidade entre PCR e baciloscopia, PCR e histopatologia foram estatisticamente significativa ($p < 0,001$ em ambos os casos) (BANERJEE et al., 2010; KUMAR; DOGRA, 2009).

O desenvolvimento da PCR representou uma oportunidade para uma detecção sensível, específica e rápida do *M. leprae* (SCOLLARD et al., 2006b). Na literatura existem várias seqüências alvos para PCR e sondas específicas de DNA para *M. leprae* como os genes codificadores do antígeno 36-kDa (DE WIT et al., 1991; YOON et al., 1993), antígeno 18-kDa (WILLIAMS et al., 1990; YOON et al., 1993), antígeno 65-kDa (PLIKAYTIS; GELBER; SHINNICK, 1990; YOON et al., 1993) e seqüências repetitivas do *M. leprae* (WOODS; COLE, 1990; YOON et al., 1993). A maioria mostrou uma grande sensibilidade da PCR, pois de um a cem microorganismos por amostras foram detectados por este método (DONOGHUE; HOLTON; SPIGELMAN, 2001).

Vários estudos utilizando biópsias de pele de pacientes com hanseníase têm demonstrado que a técnica da PCR apresenta maior sensibilidade na detecção do bacilo, sugerindo vantagem quando comparada ao exame histopatológico e baciloscópico convencionais (CARDONA-CASTRO; BELTRÁN-ALZATE; MANRIQUE-HERNÁNDEZ, 2008; DONOGHUE; HOLTON; SPIGELMAN, 2001; JOB et al., 2008; KUMAR; DOGRA, 2009). Adicionalmente, considerando que os tipos PBs carregam poucos microorganismos e que nenhum desses casos seria detectado por análise microscópica, a positividade da PCR nas formas PBs (4,16%) demonstrada por Pontes et al. (2008) se tornou mais significativa, mostrando claramente uma vantagem em torno da microscopia. Inúmeras amostras clínicas

podem ser usadas para a detecção do *M. leprae*, através da PCR, entre elas, raspado celular, sangue, biópsia de pele e nervo e secreção nasal.

2 JUSTIFICATIVA

Apesar de vários avanços alcançados no diagnóstico da hanseníase, a existência de regiões com aglomeração de casos e indícios de transmissão ativa (regiões Norte, Centro-Oeste e Nordeste) que concentram 53,5% dos casos detectados em apenas 17,5% da população brasileira, residente em extensas áreas geográficas, adiciona maior complexidade a intervenções efetivas. Os Determinantes sociais e históricos associados à ocupação da Amazônia Legal e à manutenção de iniquidades sociais na região Nordeste, ajudam a explicar o acúmulo de pessoas infectadas, em se tratando de doença de longo período de incubação (MINISTÉRIO DA SAÚDE-MS, 2013; KERR-PONTES et al., 2006). Dessa forma, é necessária a intensificação da vigilância epidemiológica nessas áreas, da vigilância de contatos, manutenção de ações efetivas para estabilização da endemia como a cura de todos os casos diagnosticados precocemente e a avaliação e monitoramento das incapacidades físicas apresentadas pelos casos já diagnosticados tardiamente. Mas, isso apenas será possível com a expansão do acesso às oportunidades de diagnóstico, tratamento e vigilância.

A vigilância de contatos ou de indivíduos provenientes de regiões endêmicas, possíveis portadores do *M. leprae* em baixas concentrações, é de extrema importância, pois a contínua exposição pode resultar em aumento do risco de infecção causada pela invasão ativa por bacilos ou por entrada passiva, decorrente de uma lacuna no epitélio da pele ou mucosa nasal após o trauma físico (PATROCÍNIO et al., 2005). Adicionalmente, mais pesquisas são necessárias para confirmar se o DNA amplificado na PCR de pacientes ou de contatos é realmente do *M. leprae*, para compreender se o reservatório nasal é persistente, transitório ou recorrente e se induz imunidade protetora (CARDONA-CASTRO; BELTRÁN-ALZATE; MANRIQUE-HERNÁNDEZ, 2008). Assim, o estudo da detecção de DNA do *M. leprae* em secreção nasal de pacientes e indivíduos saudáveis em uma área endêmica através da técnica de PCR, o qual permite o monitoramento do *M. leprae* em baixas concentrações, se faz relevante para a detecção de portadores assintomáticos, como ferramenta auxiliar para o diagnóstico da doença, evitando a utilização de outros métodos diagnósticos invasivos, para a elucidação do sítio de exposição ao bacilo e possível rota de entrada do bacilo em humanos. Estes estudos complementarizam estudos sobre a transmissão da hanseníase e fatores de risco intra e extra-familiares.

Adicionalmente, é importante o estudo da epidemiologia molecular da hanseníase, da diversidade genética do *M. leprae* sob uma perspectiva local e global, distinção entre casos de reativação e re-infecção da hanseníase, os quais podem ser feitos através de sistemas de

genotipagens. Os métodos de genotipagem são os únicos meios pelos quais as cadeias de transmissão da hanseníase dentro das populações podem ser estabelecidas e os padrões para marcadores genômicos podem ser experimentalmente avaliados na população de pacientes de interesse. Tais informações fornecem uma imagem mais detalhada da estrutura clonal de linhagens de *M. leprae* que circulam nos pacientes do Estado do Ceará, utilizando amostras de secreção nasal, as quais são coletadas de forma menos invasivas. Além disso, o agrupamento derivado dos métodos de genotipagem serve como um substituto para parentesco epidemiológico, mesmo antes que o traçado dos contatos seja realizado. No entanto, tem de ser salientado, que uma descrição mais precisa do cenário da transmissão da hanseníase é fornecido por síntese de ambos os dados, moleculares e epidemiológicos, contribuindo para a eliminação da doença como um problema de saúde pública.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a variabilidade genética entre isolados clínicos de *M. leprae* e estudar a relação entre composição genética e fatores clínico-epidemiológicos.

3.2 Objetivos específicos

- Detectar a presença de DNA de *M. leprae* na mucosa nasal de pacientes hansenianos correlacionando com fatores clínico-epidemiológicos
- Detectar a presença de DNA de *M. leprae* na mucosa nasal de indivíduos sadios correlacionando com fatores clínico-epidemiológicos
- Identificar os marcadores genéticos mais apropriados para diferenciação das cepas de *M. leprae* em amostras de secreção nasal
- Diferenciar as cepas de *M. leprae* presentes nas amostras de secreção nasal entre pacientes com hanseníase correlacionando com dados clínicos epidemiológicos
- Analisar o polimorfismo genético do *M. leprae* na população do município Fortaleza através da análise de isolados de secreção nasal de diferentes pacientes
- Analisar a diferença entre cepas de *M. leprae* em amostras de secreção nasal e biópsia de pele isolados do mesmo paciente com hanseníase

4 METODOLOGIA

4.1. O estudo

Trata-se de um estudo transversal realizado em amostras de secreção nasal e biópsia de indivíduos com diagnóstico de hanseníase, sem tratamento prévio, atendidos em centro de referência em hanseníase Centro de Dermatologia Sanitária Dona Libânia (CDERM) localizado em Fortaleza – Ceará, no período de Janeiro de 2008 a dezembro de 2010. O CDERM é uma unidade da administração estadual, conveniada ao SUS (DATASUS, 2014), e um centro nacional em Dermatologia Sanitária.

A primeira parte desta pesquisa compreendeu um estudo prospectivo, longitudinal do tipo caso-controle, onde foram estudados um grupo de casos e dois grupos distintos de controles para investigar a prevalência de portadores nasais de *M. leprae*. Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisa em Micobactérias da Universidade Federal do Ceará (UFC).

A segunda etapa compreendeu a análise de amostras de secreção nasal positivas no sistema RLEP em pacientes com amostras de biópsias de pele com o objetivo de avaliar a diversidade genética de cepas de *M. leprae* intrapaciente. Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular aplicado a Micobactérias do Departamento de Micobacterioses (Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ).

4.2. Critérios de inclusão e exclusão

Um caso foi definido de acordo com a OMS, como um indivíduo que apresentou uma ou mais das seguintes características: lesão (ões) de pele com alteração de sensibilidade; acometimento de nervo (s), com espessamento neural; baciloscopia positiva. O diagnóstico dos casos foi realizado por dermatologistas altamente capacitados do CDERM, em Fortaleza, Ceará, em seguimento naquela unidade, coletados no período de novembro de 2008 a dezembro de 2010. O diagnóstico foi baseado nas características clínicas e no índice baciloscópico (IB) (RIDLEY; JOPLING, 1966), classificados como PB ou MB seguindo os critérios da OMS. Pacientes PB foram definidos como aqueles que têm um IB negativo, menos de cinco lesões cutâneas, diferentes aparências clínicas indicativas de hanseníase; os pacientes MB foram definidos como aqueles que apresentam cinco ou mais lesões cutâneas

independentemente de IB e quaisquer pacientes com baciloscopia positiva (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Casos novos de hanseníase, ou com abandono ou recidiva, sem utilização de tratamento nos últimos cinco anos compuseram o grupo de casos do estudo. Um total de 185 indivíduos compôs o grupo de casos.

O primeiro grupo controle, denominados C1, foi constituído de 136 indivíduos, que frequentavam o CDERM, em que foram diagnosticadas outras patologias dermatológicas que não a hanseníase. Os dados foram coletados no período de novembro de 2008 a dezembro de 2010. O segundo grupo controle, denominados C2, foi formado por 121 alunos do curso de medicina e fisioterapia da Faculdade Christus, em Fortaleza, Ceará, que não frequentavam o CDERM. Os dados deste grupo foram coletados no período de junho de 2011.

Não foram incluídos indivíduos abaixo de cinco ou acima de 72 anos de idade e os pacientes HIV positivos. Aos pacientes menores de 18 anos de idade foi requerido o consentimento escrito dos pais

4.3. Amostras de secreção nasal

4.3.1. Coleta e acondicionamento

De cada participante foi coletado secreção nasal de ambas as narinas, utilizado um swab para cada cavidade nasal. Os swabs foram previamente umedecidos em tampão TE (Tris 10mM – EDTA 1mM, pH 8,0). As amostras foram coletadas por rotação no anteposto externo do orifício nasal e em seguida mantidas à -20°C até serem conduzidas ao Laboratório de Pesquisa em Micobactérias, no Bloco de Biomedicina, da Universidade Federal do Ceará (UFC) para o processo de extração de DNA.

4.3.2. Extração de DNA

A ponta do swab foi cortada com bisturi estéril e transferida para um tubo *ependorf* de 2,0mL juntamente com o líquido remanescente. Foi adicionado 1mL de NaOH 4% e centrifugado à 2500 rpm por 20 minutos. Todo o sobrenadante foi desprezado e ao precipitado foi adicionado 600µL de solução S.E.B. (10mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 50mM de NaCl, 2% de SDS e 0,3 mg/mL de proteinase K) com incubação por 18 horas à 56°C. Logo depois, foi

adicionado 600µL de fenol-clorofórmico-álcool isoamílico (25:24:1). A seguir, a amostra foi centrifugada a 12.000 rpm por 15 minutos, o sobrenadante foi transferido para outro tubo e adicionado 500µL de clorofórmio, homogeneizado e centrifugado à 12.000 rpm por 5 minutos. Em seguida, foi adicionado 35µL de NaCl 2,5mM e 500µL de álcool isopropílico, e novamente centrifugado a 14.000 rpm por 20 minutos a 4°C. Após isso, o sobrenadante foi desprezado e adicionado 500 µL de etanol 70% ao precipitado. A amostra foi então centrifugada a 14.000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante desprezado e o DNA ressuspensão em 70 µL de água milliQ (destilada e autoclavada).

4.3.3. Amplificação do Ácido Nucléico

Os iniciadores foram desenhados com o programa *Primer3* v.0.4.0 (ROZEN; SKALETSKY, 2000) a partir da região genômica do *M. leprae* X17151 (*M. leprae repetitive elemental*, RLEP2).

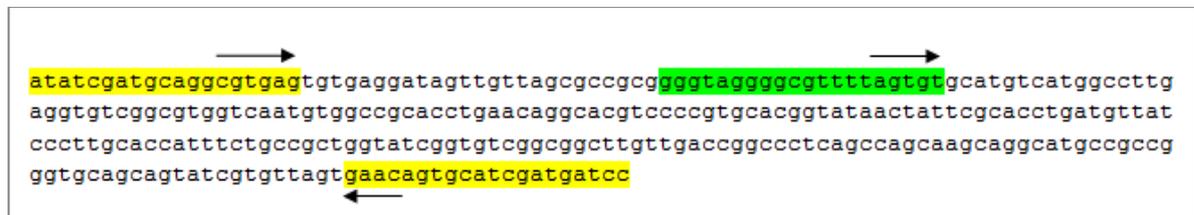
Foram utilizados três iniciadores (QUADRO 01 e FIGURA 01) e duas reações de PCR para amplificar o fragmento genômico de 238 pb específico do *M. leprae*. Para a realização da PCR foi utilizado o kit *Ilustra™ Pure Taq Ready-to-go PCR Beads* (GE Healthcare) e os iniciadores RLEP2.1 e RLEP2.2 (Invitrogen) para a primeira PCR e para a segunda PCR, os iniciadores RLEP2.2 e RLEP2.3 (Invitrogen). Para a primeira reação de PCR foram utilizados 5 µL do DNA extraído, 1 µL do iniciador RLEP2.1, 1 µL do RLEP2.2 e 18 µL de água milliQ e para segunda reação de PCR foram utilizados 0,5 µL do produto da primeira PCR, 1 µL do iniciador RLEP2.2, 1 µL do RLEP2.3 e 22,5 µL de água milliQ. As amostras foram levadas ao termociclador *Gene Amp PCR System 9700* (*Applied Biosystems*) e as duas reações se processaram no seguinte esquema: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de: 94°C por 30 segundos para a desnaturação, 59,5°C por 30 segundos para o anelamento e 72°C por 1 minuto para a extensão. Após os 40 ciclos houve um período de extensão final que ocorreu a 72°C por 14 minutos e depois as amostras foram mantidas a 4°C até serem retiradas do termociclador e armazenadas a -20°C. O esquema de amplificação para a segunda reação foi basicamente o mesmo, mudando somente a temperatura de anelamento para 59,8 °C. O produto gerado pela primeira PCR foi de 282 pb, e o produto gerado pela segunda PCR de 238 pb.

Quadro 01 - Iniciadores para amplificação do DNA do *M. leprae*.

Iniciadores	Sentido	Sequência (5' - 3')	Tm (°C)
RLEP2.1	Positivo	ATATCGATGCAGGCGTGAG	59,80
RLEP2.2	Negativo	GGATCATCGATGCACTGTTC	59,04
RLEP2.3	Positivo	GGGTAGGGGCGTTTTAGTGT	60,24

Fonte: Próprio autor (2014)

Figura 01 - Produto de amplificação a partir da região genômica *M. leprae repetitive element* RLEP2 (NCBI X17151).



Fonte: Próprio autor (2014). Em amarelo: iniciadores RLEP2.1 (5'-at at c gat gc ag g c gt ga g-3') e RLEP2.2 (5'-g g a t c a t c g a t g c a c t t c-3'), produto de 282 pb; em verde: iniciador RLEP2.3 (5'-g g g t a g g g g c g t t t t a g t g t-3'), produto de 238 pb. Setas indicam sentido de amplificação (Software Primer 3).

4.3.4. Visualização do produto de PCR

Dez microlitros do produto amplificado do segundo PCR foram aplicados em um volume de 50 mL de gel de agarose (*Invitrogen*) a 2,0% preparado em TBE 1x (Tris Base 100mM, Ácido Bórico 100mM e EDTA 6,4mM), contendo brometo de etídio na concentração final de 0,5 µg/mL. A corrida eletroforética foi desenvolvida a 80 V por cerca de 45 minutos (*Electrophoresis Power Supply EPS 600 - Pharmacia Biotech*), em seguida as bandas foram visualizadas e digitalizadas sob iluminação ultravioleta em transluminador (*ImageQuant 300 - GE Healthcare*).

4.4. Amostras de biópsia de pele

4.4.1. Coleta e acondicionamento

Foram coletadas amostras de biópsias de lesão de pele somente dos pacientes através do *punch* de 5 mm, sendo esse procedimento realizado pelos médicos do CDERM. Foi introduzida a lâmina do *punch* perpendicularmente à pele, com o eixo deste instrumento posicionado a 90° em relação ao plano da superfície cutânea. Foram promovidos movimentos giratórios, iniciando a incisão, em um único sentido, evitando, desta forma, artefatos como desagregação de fibras e anexos. A base do cilindro de tecido produzido foi incisada pela própria lâmina do *punch*, através da inclinação do cabo para um ângulo de 30-45°. O tecido removido foi colocado em um *ependorf* de 1,5 mL estéril que foi estocado á -20°C para posterior extração de DNA.

4.4.2. Extração de DNA

As amostras de biópsias de pele foram processadas utilizando o kit para extração de DNA genômico *DNeasy Blood & Tissue (Qiagen)*, seguindo as orientações do fabricante.

4.5. MLVA (*Multiple-locus VNTR Analysis*) das amostras de secreção nasal positivas do sistema RLEP e biópsia

Para avaliação da diversidade genética do *M. leprae* entre indivíduos, foram analisadas cepas de secreção nasal (SN) de 48 pacientes positivos do sistema RLEP, utilizando os quatro *loci* de repetições em *tandem* de número variável (VNTRs): AC8b, AC9, AC8a e GT9.

Para o estudo da variabilidade da cepa no mesmo indivíduo foram comparadas amostras de biópsia de pele (BP) e SN de 38 pacientes positivos do sistema RLEP, utilizando os quinze *loci* de VNTRs: AT17, GGT5, GTA9, AC8b, AC8a, AT15, AC9, 21-3, GAA21, TA18, 6-7, 27-5, TA10, 23-3, 12-5.

Os VNTRs, presentes em pseudogenes ou segmentos intergênicos do genoma do bacilo, foram separados em quatro combinações de multiplex PCR (QUADRO 02), usando-se *primers* 5' *forward* marcados com fluorescência. Os *primers* são específicos para o *M. leprae*, com exceção do (TA) 18 que eventualmente pode produzir um produto de reação cruzada de 242 pb a partir do DNA humano (JENSEN et al., 2011).

Quadro 02- Iniciadores para amplificação de 17 *loci* de VNTRs em grupos de multiplex PCR.

Locus	Primers Forward	Primers Reverse	pb	PCR*
(AC)8b	VIC-GCCCACTTACCTCAACCAAC	CCTATAACGGCACTCAGTCCA	390	1
(GTA)9	NED-AGCCTTAGTCGCGCAGATG	TCCGCTGTCCGTCCGCTGA	307	
(GGT)5	6FAM-GCAGCGGTGTAACAGCATAGC	TGTCTGCCTTGCGAAACGGT	242	
(AT)17	PET-TCTCCAACATGCTGCGACA	GTACAGCGGCCTGATCGAA	181	
21-3	6FAM-GAATCTGACCTTTCGGAAATG	CGATGCAGCTTCCTACGG	312	2
(AC)9	NED-AGCGCCCGTTGTCGATAGA	GACTGGATGTCGGCACCCC	236	
(AT)15	PET-CAATATGCGGGTTGGCGCTTCTG	CCGTCTGGCTCGATGGCTGGATTC	168	
(AC)8 ^a	VIC-GTGTACGCGGAACCAGGCA	CCATCTGTTGGTACTACTGA	124	
27-5	6FAM-ATTGAGCAGATGGCCGGTC	AGCAGTCGGCACGCCCTT	327	3
6-7	VIC-GCCATCGTTGTCGGTTCATC	CGGAGGAGGTGGGTACGGT	268	
(TA)18	NED-CGTGCGTCGTGTGTAGGC	GACGTGGCAACATCGAAGTT	230	
(GAA)21	PET-CTACAGGGGGCACTTAGCTC	GGACCTAAACCATCCCGTTTT	201	
12-5	VIC-CTGGTCCACTTGCGGTACGAC	GGAGAAGGAGGCCGAATACA	289	4
23-3	6FAM-CCGAAGCCCTGGACGAAG	GCCGTAAATCCGCTCCC	243	
(TA)10	PET-TAGATTCAAACGACCATGCA	TGATAATCACGTGTTTCCGC	185	

Fonte: Jensen et al. (2011). *PCR: Número da combinação da PCR multiplex.

4.5.1. Condições de amplificação: PCR multiplex

A Multiplex PCR foi realizada utilizando-se o *Qiagen* Multiplex PCR Kit (*Qiagen*). Cada reação conteve 20 μ L de volume final, composta de 10 μ L de 2x *Qiagen* Multiplex PCR *Master Mix*, 2 μ L de 5x solução Q, 2 μ L (cada) dos *primers forward* e *reverse* e 2 μ L de DNA; o volume foi ajustado com água destilada estéril. A concentração final de cada *primer* foi 0,2 M.

As seguintes condições do PCR foram utilizadas para a obtenção dos produtos amplificados: 15 min para desnaturação inicial a 95°C; depois 40 ciclos de desnaturação por

30 s a 94 °C, anelamento por 90 s a 60 °C, extensão por 90 s a 72°C acrescido de extensão final a 72 °C por 10 min.

4.5.2. Eletroforese em gel de agarose

Dez microlitros do produto amplificado foram aplicados em um volume de 50 mL de gel de agarose (*Invitrogen*) a 2,0% preparado em TBE 1x (Tris Base 100mM, Ácido Bórico 100mM e EDTA 6,4mM), contendo brometo de etídio na concentração final de 0,5 µg/mL. A corrida eletroforética foi desenvolvida a 80 V por cerca de 45 minutos (*Electrophoresis Power Supply EPS 600 - Pharmacia Biotech*), em seguida as bandas foram visualizadas e digitalizadas sob iluminação ultravioleta em transluminador (*ImageQuant 300 - GE Healthcare*).

4.5.3. Análise de fragmentos

Após a PCR multiplex, 1 µL do produto da PCR foi diluído 30-60 vezes, e 1 µL do produto da PCR diluído foi combinado com 8,7 µL formamida deionizada (*Applied Biosystems*) e 0,3 µL de LIZ-500 (*Applied Biosystems*). O material foi desnaturado a 94° C por 5 min e submetido à eletroforese capilar no sequenciador automático modelo ABI 3130 DNA (*Applied Biosystems*), injetado no capilar (comprimento 50 cm, polímero POP-7) pela aplicação de uma voltagem de 1 kV por 22s. A eletroforese capilar foi executada com voltagem de 15kV a 60°C por 45min (JENSEN et al., 2011).

Os eletroferogramas foram visualizados e analisados, assim como os números de repetições dos 14 *loci* dos VNTRs foram determinados, utilizando-se o *Peak Scanner™* Software, versão 1.0 (*Applied Biosystems*).

4.6. Cálculo da Diversidade Alélica

A diversidade alélica (h) em cada locus de VNTR foi calculada conforme preconizado por Gilmour e Whittam (1986), utilizando-se a fórmula: $h = 1 - \sum x_i^2 [n / (n-1)]$, em que x_i é a frequência do alelo i no locus, e n é o número de isolados. A diversidade alélica (h) é um bom índice indireto de heterogeneidade/polimorfismo das amostras e também um bom índice de poder discriminatório fornecido pelos *loci* em estudo (GILMOUR; WHITTAM, 1986) Segundo Sola et al. (2003), com base neste índice, a amostra é

considerada altamente discriminatória/polimórfica se $h \geq 0,6$; moderadamente discriminatória se $0,3 \leq h \leq 0,6$ e fracamente discriminatória se $h \leq 0,3$ (SOLA et al., 2003).

4.7. Cálculo do poder discriminatório

O poder discriminatório de um método de tipagem é a sua habilidade de distinguir entre cepas não relacionadas. Isto é determinado pelo número de tipos definidos pelo método e a frequência relativa dos tipos (HUNTER; GASTON, 1988). O índice discriminatório de Hunter – Gaston (HGDI) pode ser utilizado como um parâmetro numérico do poder discriminatório de RFLP, MIRU-VNTR Spoligotyping, isoladas ou em associação. O HGDI foi calculado conforme preconizado por Hunter e Gaston (1988) por meio da utilização da fórmula da figura 02.

Figura 02: Equação para o cálculo do poder discriminatório das técnicas moleculares

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s x_j(x_j - 1)$$

Fonte: Hunter e Gaston (1988). D é o índice de poder discriminatório, N o número de linhagens testadas não relacionadas, S o número de tipos diferentes, e x_j o número de cepas pertencentes ao tipo j, assumindo que os agrupamentos serão classificados em categorias exclusivas (HUNTER e GASTON, 1988). A equação de Hunter e Gaston é uma aplicação do índice de diversidade de Simpson (SIMPSON, 1949).

4.8. Aspectos éticos

O projeto “Estudos clínico-epidemiológicos da Hanseníase em área endêmica do Nordeste brasileiro”, ao qual este subprojeto está vinculado, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária Dona Libânia através do protocolo nº 011/07 (ANEXO 1).

4.9. Análise estatística

Para avaliar a associação em tabela de contingência com o grupo PCR positivo/negativo para o DNA do *M. leprae* foram utilizados os testes Exato de *Fischer* e Qui-Quadrado de *Pearson*. Para os fatores que apresentaram associação significativa foi estimado o *Odds Ratio* e o Intervalo de confiança com um coeficiente de confiança de 95%. A diferença entre PCR positiva e negativa em relação à média de variáveis quantitativas foi avaliada através do Teste *t-Student* ou do Teste de *Mann-Whitney*, dependendo se a distribuição da variável possuiu ou não, respectivamente, distribuição Normal.

Para verificar em um contexto multidimensional os fatores que aumentaram a chance de obter a PCR positiva, foi utilizada a análise de regressão logística em função dos fatores independentes que apresentaram associação significativa ao nível de significância 5% com o grupo PCR positiva/negativa.

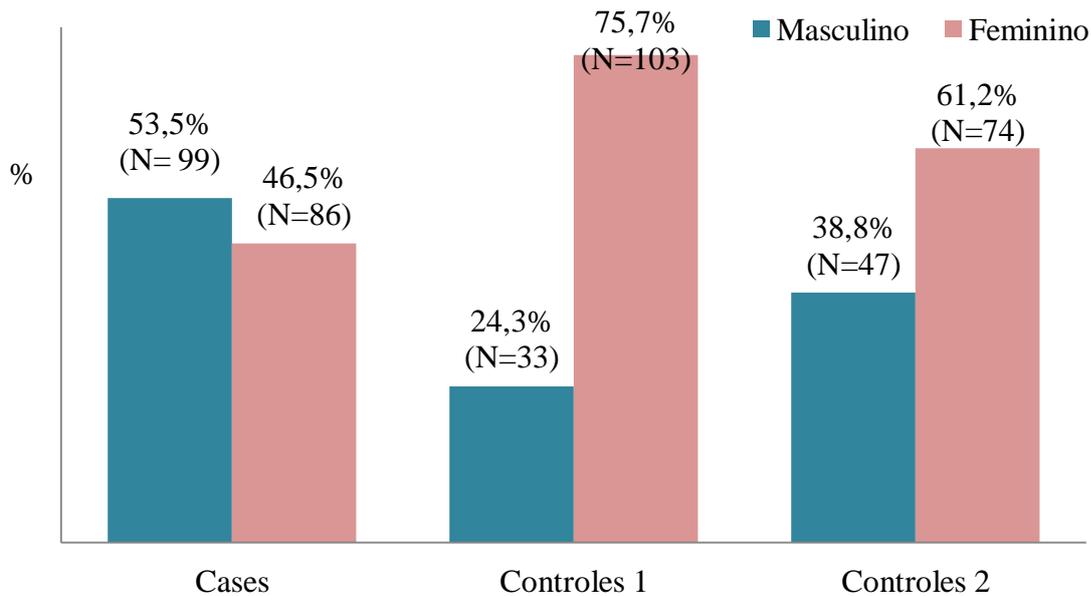
4.10. Análise espacial

Para permitir a análise espacial e mapeamento dos casos de hanseníase (C) e grupos controles (C1 e C2), o endereço de cada um deles no momento da entrada no estudo foi geocodificado com a atribuição de uma latitude e uma longitude para o endereço, utilizando o software *Google Earth*. As coordenadas foram transcritos para a planilha do Excel e transformados em arquivos PDF para ser usado diretamente no aplicativo *GIS software ArcGIS 9.3*. Depois que os dados foram formatados em planilhas, a aplicação *ArcMap* foi usada para fazer a informação disponível em mapas que mostram a distribuição dos indivíduos georeferenciados em Fortaleza de acordo com os resultados dos experimentos. As densidades populacionais foram geradas utilizando a extensão *Spatial Analyst - densidade kernel*, usando um raio de busca de 20 km e uma escala de 2,5 quilômetro.

5 RESULTADOS

Dos participantes do estudo houve uma predominância do sexo feminino nos grupos dos controles 1 (C1) e 2 (C2), enquanto no grupo de casos (C) não houve prevalência significativa de gênero (*Chi-square* 28.02, $p = 0.000001$) (FIGURA 3).

Figura 3 – Distribuição dos grupos do estudo de acordo com o sexo



Fonte: Próprio autor (2014). *Chi-square* 28.02, $p < 0.001$.

Em relação à idade dos casos, esta variou entre 04 e 81 anos, sendo de modo semelhante aos dos C1 que variou entre quatro a 69 anos. Todavia a idade dos C2 variou entre 18 e 31 anos (TABELA 1).

Tabela 1– Distribuição dos grupos estudados de acordo com a idade

Grupo	N	Média	dp	Mínimo	Mediana	Máximo
C	185	40.249	16.829	4	43.0	81
C1	136	29.051	14.346	4	26.5	69
C2	121	21.430	2.729	18	21.0	31
Total	442	31.652	15.651	4	26.0	81

Fonte: Próprio autor (2014). dp, desvio padrão.

De acordo com a baciloscopia e a classificação clínica de *Ridley-Joplin*, dos 185 casos que integraram o estudo, 89 foram classificados como dimorfos, 37 tuberculóides, 44 virchowiano, 9 indeterminados e 6 não tiveram sua forma clínica informada.

Os resultados do estudo são apresentados em duas partes (Parte 1 e Parte 2). A Parte 1 se refere à identificação de ácidos nucleicos de *M. leprae* em secreção nasal dos casos e controles, enquanto que a Parte 2 se refere aos resultados da análise de genotipagem dos casos.

5.1 Parte 1 – Identificação de ácidos nucleicos de *M. leprae* em secreção nasal

Em relação aos resultados da análise de amplificação da região genômica do *RLEP* de *M. leprae* na secreção nasal dos três grupos participantes, 128 (69,2%) casos tiveram resultado positivo, semelhante ao grupo C1 com 91 (66,9%) de positividade, porém no grupo C2 somente 34 (28,1%) indivíduos foram positivos, sendo essa diferença estatisticamente significativa (TABELA 2, $p < 0,0001$).

Tabela 2 – Distribuição dos resultados da detecção do gene *RLEP* de *M. leprae* por grupos estudados

Resultado <i>RLEP</i>	Grupo						Total		Grupo	OR	IC 95%	
	C		C1		C2		N	%			LI	LS
	N	%	N	%	N	%						
Negativo	57	30,8	45	33,1	87	71,9	189	42,8	C/C2	5,746	3,469	9,517
Positivo	128	69,2	91	66,9	34	28,1	253	57,2	C1/C2	5,175	3,035	8,823
Total	185	100,0	136	100,0	121	100,0	442	100,0	C/C1	1,110	0,691	1,784

Fonte: Próprio autor (2014). Teste Quadrado de Pearson; $p < 0,0001$. OR, odds Ration; IC, Intervalo de confiança com um coeficiente de confiança de 95%; LI, Limite Inferior; LS, Limite Superior; C, casos; C1, Não hansenianos do CDERM; C2, Não hansenianos e Não CDERM.

Quando feita a análise dos resultados do *RLEP* que mostraram positividade ao *M. leprae* nos grupos em relação ao sexo, foi observado que dos positivos a maioria do grupo C1 foi do sexo feminino, 71 de 91 (78%), enquanto nos outros dois grupos de C e C2, não houve predominância significativa de algum sexo (TABELA 3, $p < 0,0001$). Todavia, não houve diferença estatisticamente significativa nas amostras negativas para o *RLEP* (TABELA 3).

Tabela 3 – Distribuição do percentual de PCR positivo para o gene *RLEP* de *M. leprae* entre os grupos de acordo com o sexo

Resultado <i>RLEP</i>	Sexo	Grupo						P	Grupo	OR	IC 95%					
		C		C1		C2					LI	LS				
		N	%	N	%	N	%									
Negativo	Homem	25	43,9	13	28,9	32	36,8	0,3125	-	-	-	-				
	Mulher	32	56,1	32	71,1	55	63,2									
	Total	57	100,0	45	100,0	87	100,0									
Positivo	Homem	74	57,8	20	22,0	15	44,1	<0,0001	C/C2	1,736	0,810	3,721				
	Mulher	54	42,2	71	78,0	19	55,9						C1/C2	0,357	0,154	0,826
	Total	128	100,0	91	100,0	34	100,0									

Fonte: Próprio autor (2014). Testes Exato de *Fischer*; $p < 0,0001$. OR, *Odds Ratio*; IC, Intervalo de confiança com um coeficiente de confiança de 95%; LI, Limite Inferior; LS, Limite Superior; C, casos; C1, Não hansenianos do CDERM; C2, Não hansenianos e Não CDERM.

Em relação à faixa etária foi observada através do Teste de *Mann-Whitney* que nos positivos para o *RLEP* a média de idade dos casos foi significativamente maior do que nos controles C1 e C2 (TABELA 4, $p < 0,0001$).

Tabela 4 – Distribuição dos resultados da PCR para o gene *RLEP* de *M. leprae* entre os grupos de acordo com a idade

Resultado <i>RLEP</i>	Grupo	N	Média	dp	Mediana	p
Negativo	C	57	38,649	17,457	38,0	<0,0001
	C1	45	25,933	14,339	24,0	
	C2	87	21,494	2,791	21,0	
Positivo	C	128	40,961	16,563	43,0	<0,0001
	C1	91	30,593	14,174	29,0	
	C2	34	21,265	2,597	20,5	

Fonte: Próprio autor (2014). Teste de *Mann-Whitney*; dp, desvio padrão; C, casos; C1, Não hansenianos do CDERM; C2, Não hansenianos e Não CDERM.

Quando feita a análise dos resultados da PCR no grupo de casos de acordo com a baciloscopia e a classificação clínica de *Ridley-Joplin*, foi observada somente significância estatística em relação à baciloscopia (TABELA 5, $p = 0,0260$), sendo a positividade de *RLEP* maior nos indivíduos que tiveram a baciloscopia positiva (67 de 85, 79,3%).

Table 5– Distribuição dos resultados da PCR para o gene *RLEP* de *M. leprae* no grupo de casos de acordo com a baciloscopia e a classificação clínica de acordo com *Ridley-Joplin*

	Resultados da PCR						p	OR (95% CI)
	Positivo		Negativo		Total			
	N	%	N	%	N	%		
Baciloscopia								
Positiva	67	57,3	18	37,5	85	51,5	0,0260	2,233 (1,121; 4,451)
Negativa	50	42,7	30	62,5	80	48,5		1,000
Total	117	100,0	48	100,0	165	100,0		
Classificação Clínica								
Boderlaine	58	46,8	31	56,4	89	49,7	0,3746	-
Tuberculóide	27	21,8	10	18,2	37	20,7		
Lepromatosa	34	27,4	10	18,2	44	24,6		
Indeterminada	5	4,0	4	7,3	9	5,0		
Total	124	100,0	55	100,0	179	100,0		

Fonte: Próprio autor (2014). Testes Exato de *Fischer*; OR, *Odds Ration*; IC, Intervalo de confiança com um coeficiente de confiança de 95%.

Para análise de regressão logística de possíveis fatores de risco para um resultado de PCR positivo para o gene *RLEP* de *M. leprae*, foram comparados somente os grupos C e C1, devido o grupo C2 ter um perfil de escolaridade e nível socioeconômico constante e diferente dos demais grupos.

Entre os indivíduos *RLEP* positivos, a frequência da presença da cicatriz da BCG mostrou-se elevada nos grupos C e C1, 65% e 78%, respectivamente ($p = 0,0460$; TABELA 6). Assim, na análise de regressão de possíveis fatores de risco para um resultado de PCR positivo para *M. leprae* nos grupos C e C1, foi observado que os indivíduos sem a cicatriz de BCG apresentaram menos chance de serem PCR positivo comparado com quem tinha a cicatriz (OR = 0,512).

Para o nível de escolaridade (TABELA 6), foi observada nos grupos C e C1 maior positividade ao *RLEP* (58,6% e 40,7%, respectivamente) nos indivíduos analfabetos ou com primeiro grau incompleto dos grupos C e C1 ($p = 0,0085$). Assim, na análise de regressão de possíveis fatores de risco para positividade na PCR para *M. leprae* em C e C1, foi observado que os indivíduos analfabetos ou com primeiro grau incompleto apresentaram mais chances de obterem *RLEP* positivo comparado com indivíduos com maior nível de escolaridade (OR = 2,729).

Em relação ao critério de classificação econômica dos indivíduos *RLEP* positivos (TABELA 6), foi observada maior positividade nos indivíduos do grupo C dos níveis D/E, enquanto no grupo C1 foi observada maior positividade nos indivíduos B/C (67,2% e 61,5%, respectivamente, $p < 0,0001$). Assim, na análise de regressão de possíveis fatores de risco para a positividade ao *RLEP* de *M. leprae* em C, foi observado que nos indivíduos da classe D/E têm mais chances de serem *RLEP* positivo comparado com os da classe B/C. Enquanto no grupo C1, os indivíduos da classe B/C têm mais chances de serem PCR positivos comparado aos da classe D/E (OR = 3,276).

Para o tempo de escolaridade do chefe da família (principal indivíduo da renda familiar) (TABELA 6), foi observada maior positividade nos indivíduos dos grupos C que apresentaram o chefe da família com tempo de estudo inferior a 8 anos, enquanto no grupo C1 foi observada maior positividade nos indivíduos dos quais o chefe da família teve o tempo de estudo superior a 8 anos (65,8% e 55,7%, respectivamente, $p = 0,0028$). Assim, na análise de regressão de possíveis fatores de risco para a positividade ao *RLEP* em C, foi observado que os indivíduos nos quais o chefe da família tem tempo de estudo inferior a 8 anos, tem mais chances de serem PCR positivo comparado com os de tempo de estudo superior a 8 anos, enquanto que no grupo C1 os indivíduos nos quais o chefe da família tem tempo de estudo superior a 8 anos, tem mais chances de serem *RLEP* positivo comparado com os de tempo de estudo inferior a 8 anos (OR = 2,419).

Tabela 6 – Análise de regressão logística de possíveis fatores de risco para a hanseníase em casos e controles C1 com PCR positiva

<i>RLEP</i> -PCR positivo	C		C1		Total		P	OR (95% CI)
	N	%	N	%	N	%		
Cicatriz de BCG								
Sim	80	65,0	69	78,4	149	70,6	0,0460	0,512 0,273 - 0,961
Não	43	35,0	19	21,6	62	29,4		1,000
Total	123	100,0	88	100,0	211	100,0		
Escolaridade								
Analfabeto/ 1º incompleto	75	58,6	37	40,7	112	51,1	0,0085	2,729 1,436 - 5,187
1º completo/ 2º incompleto	27	21,1	19	20,9	46	21,0		1,913 0,881; 4,156
2º completo/ superior/ pós	26	20,3	35	38,5	61	27,9		1,000
Total	128	100,0	91	100,0	219	100,0		

Tabela 6 – Análise de regressão logística de possíveis fatores de risco para a hanseníase em casos e controles C1 com PCR positiva

<i>RLEP</i> -PCR positivo	C		C1		Total		P	OR (95% CI)
	N	%	N	%	N	%		
Nível socioeconômico								
B/C	42	32,8	56	61,5	98	44,7	<0,0001	1,000
D/E	86	67,2	35	38,5	121	55,3		3,276
Total	128	100,0	91	100,0	219	100,0		1,870 - 5,740
Escolaridade do Chefe da família								
< 8 anos	77	65,8	39	44,3	116	56,6	0,0028	2,419
> 8 anos	40	34,2	49	55,7	89	43,4		1,37 - 4,269
Total	117	100,0	88	100,0	205	100,0		1,000

Fonte: Próprio autor (2014). Testes Exato de *Fischer*; OR, *Odds Ration*; IC, Intervalo de confiança com um coeficiente de confiança de 95%. Classificação econômica, A a E de acordo com os critérios do sistema de pontos do Critério de Classificação Econômica Brasil da Associação Brasileira de Pesquisas 9http://www.abep.org/new/codigosConduas.aspx).

C, casos; C1, Não hansenianos do CDERM.

Baseado nos resultados descritos na tabela 06, no contexto multivariado e nível de significância de 5%, foi observado que os fatores idade, sexo e o nível sócio econômico influenciam o risco de apresentar resultado *RLEP* positivo.

Assim, o indivíduo com nível socioeconômico e sexo predefinidos, a cada ano de idade que ele envelhece, implica que a chance é de 1,046 vezes maior de ele ser *RLEP* positivo. O indivíduo com idade e nível socioeconômico predefinidos, o fato de ele ser homem aumenta a chance de ele ser *RLEP* positivo em 6,266 vezes em comparação a ser mulher. Também é demonstrado que o indivíduo com uma idade e sexo predefinidos, o fato de ele pertencer à classe econômica D/E aumenta a chance de ele ser *RLEP* positivo em 3,083 em comparação a pertencer à classe B/C. Sendo jovem, nível socioeconômico B/C e mulher tem risco de ele ser *RLEP* positivo de 0,081 vezes em comparação aos outros fatores (TABELA 7).

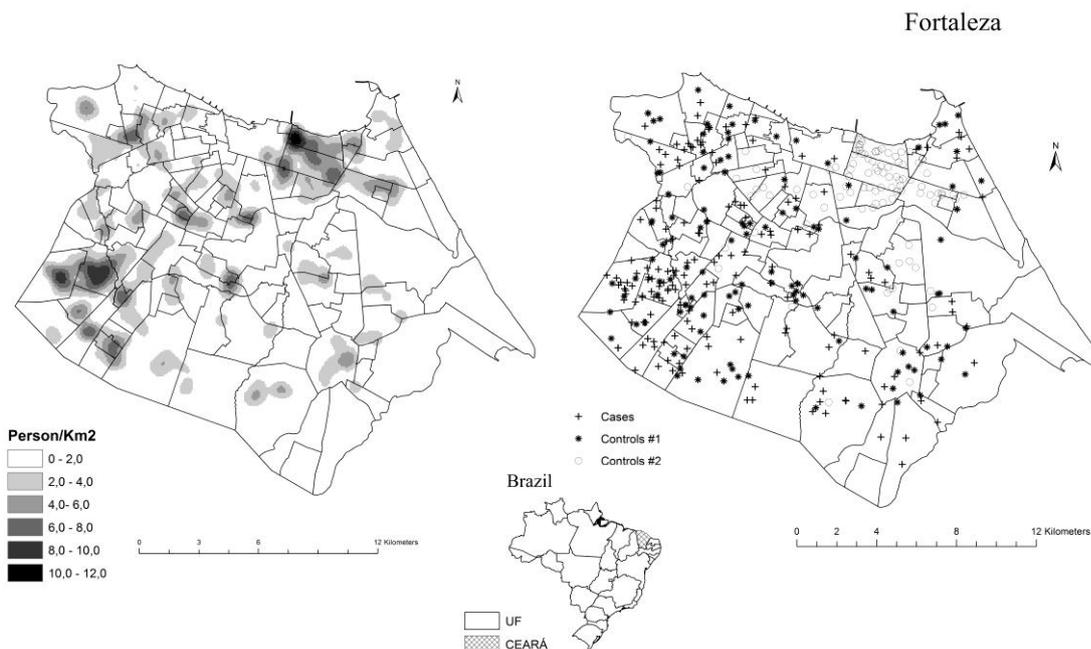
Tabela 7– Os fatores que aumentam a chance de tornar o grupo de casos na análise de regressão logística no grupo PCR positiva em um contexto multidimensional

Fatores	p	OR	95% IC (OR)	
			LI	LS
Idade (anos)	<0,0001	1,046	1,024	1,070
Sexo masculino	<0,0001	6,266	3,079	12,748
Nível socioeconômico D/E	0,0010	3,083	1,600	5,940
Constante	<0,0001	0,081	-	-

Fonte: Próprio autor (2014). Método *Forward Stepwise* e estatística *Wald*. OR, *Odds Ratio*; IC, Intervalo de confiança com um coeficiente de confiança de 95%.

Os mapas da Figura 4 mostram a localização da moradia dos indivíduos dos três grupos dessa pesquisa.

Figura 4- Mapas do município de Fortaleza com a moradia dos indivíduos do estudo

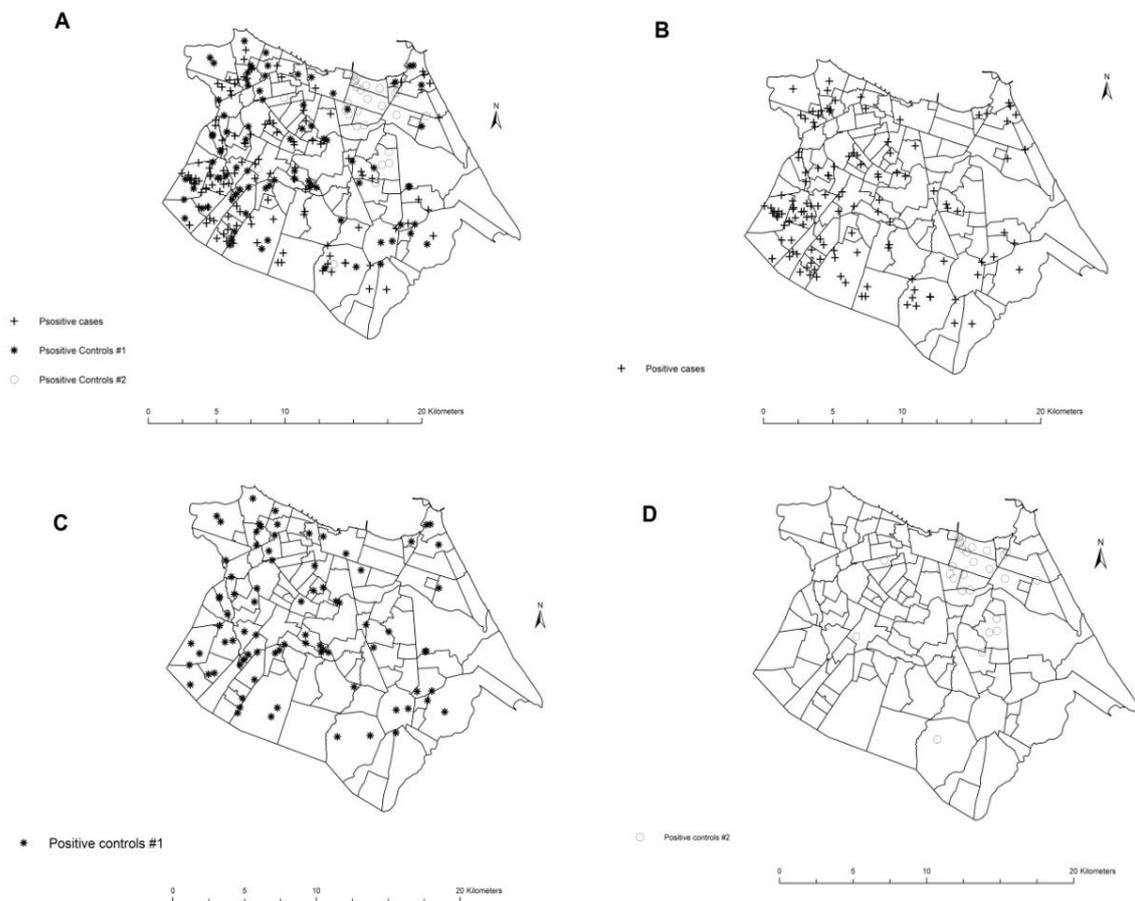


Fonte: Próprio autor (2014). A: Distribuição de Densidade *Kernel* da moradia de todos os indivíduos dos três grupos do estudo (casos, controles 1 e 2). B: Localização da moradia de todos os indivíduos dos três grupos do estudo

Os mapas das Figuras 5 e 6 mostram a localização da moradia dos indivíduos dos três grupos dessa pesquisa positivos ao *RLEP* de *M. leprae*, sendo a Figura 6 com a distribuição de Densidade *Kernel*. Foi observado que os grupos C e C1 estão distribuídos pelo

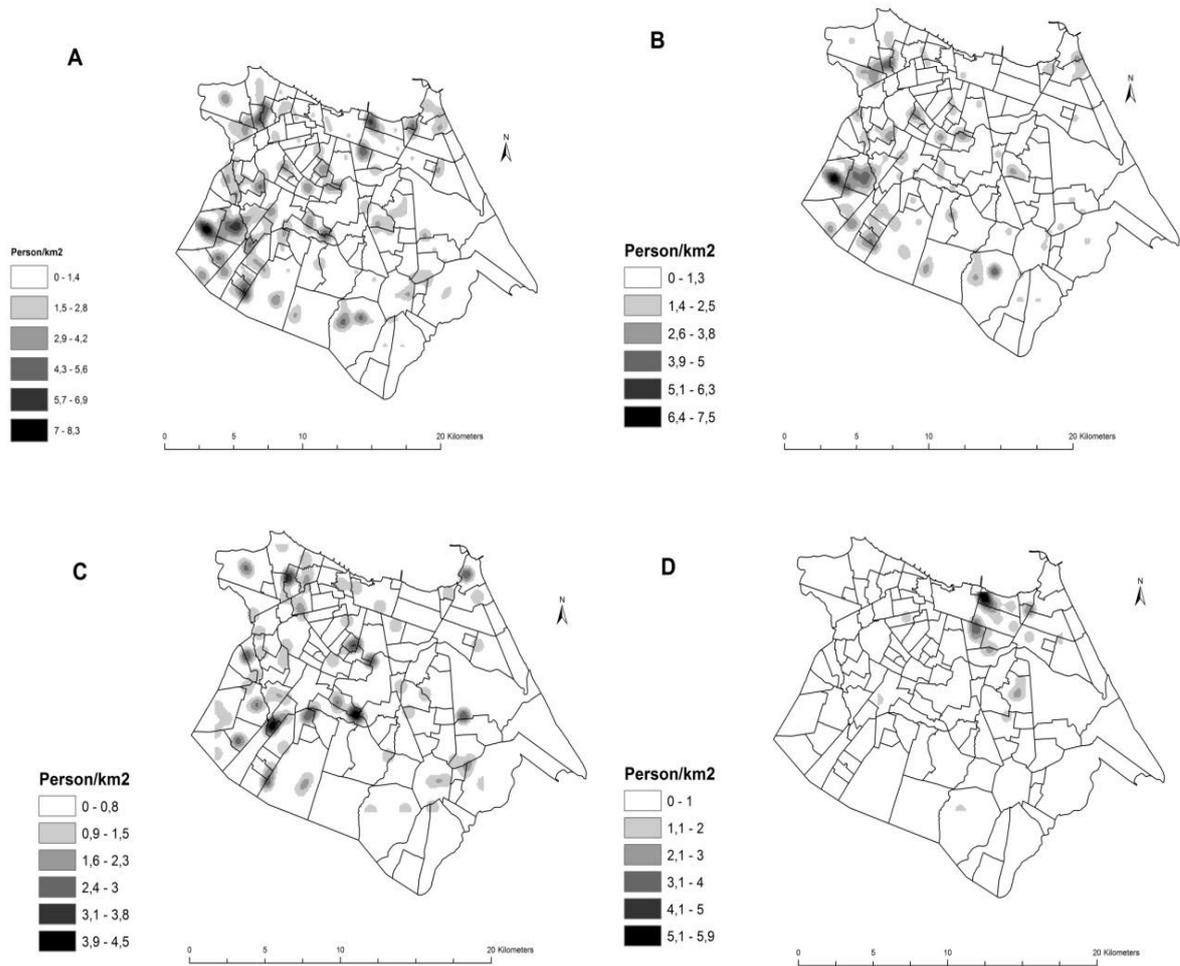
município (FIGURA 5, mapas B e C), contudo, os grupos C e C1 mostram aglomerações (região mais escura do mapa) na periferia do município (FIGURA 6, mapas B e C), regiões que são menos favorecidas economicamente. Já o grupo C2, foi observado que eles se aglomeram em uma região mais favorecida economicamente (FIGURA 6, mapa D). No mapa A da Figura 5 foi observado que o grupo C1 é o grupo de interseção entre os grupos C e C2, pois o grupo C1 se encontra com o grupo C2 e com o grupo C, enquanto o grupo C quase não tem contato geográfico com o grupo C2.

Figura 5- Mapas do Município de Fortaleza com a moradia dos indivíduos por grupos do estudo



Fonte: Próprio autor (2014). A: localização da moradia de todos os indivíduos com *RLEP* positivo dos três grupos do estudo. B: localização da moradia dos indivíduos com *RLEP* positivo do grupo C. C: localização da moradia dos indivíduos com *RLEP* positivo do grupo C1. D: localização da moradia dos indivíduos com *RLEP* positivo do grupo C2.

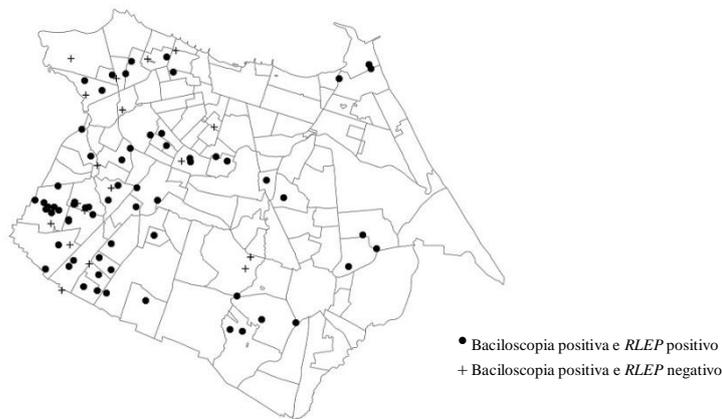
Figura 6- Mapas do Município de Fortaleza em distribuição de Densidade Kernel da moradia por grupos do estudo



Fonte: Próprio autor (2014). A: localização da moradia de todos os indivíduos *RLEP* positivo dos três grupos do estudo. B: localização da moradia dos indivíduos com *RLEP* positivo do grupo C. C: localização da moradia dos indivíduos com *RLEP* positivo do grupo C1. D: localização da moradia dos indivíduos com *RLEP* positivo do grupo C2.

O mapa da Figura 7 mostra a localização da moradia do grupo de casos de acordo com a baciloscopia positiva e resultados da amplificação da região *RLEP*, em quais foi observado que os pacientes positivos para a baciloscopia e *RLEP* estão mais aglomerados do que os pacientes positivos para a baciloscopia e negativos para o *RLEP*.

Figura 7- Mapa do Município de Fortaleza com a moradia dos indivíduos do estudo com baciloscopia positiva



Fonte: Próprio autor (2014).

5.2 Parte 2 – Genotipagem do *M. leprae*

Para a análise dos VNTRs publicados por KIMURA *et al* (2009), foram utilizadas amostras de secreção nasal (SN) positivas para o gene *RLEP* de 48 indivíduos do grupo de casos, sendo de 38 destes indivíduos também analisadas amostras de biópsia de pele (BP) para o estudo da variabilidade da cepa no paciente.

Devido ao comportamento de alguns *loci* com pouca ou ausência de amplificação, assim como uma alta variabilidade ou invariabilidade, foram escolhidos para análise das amostras de SN e comparações entre pacientes, somente os *loci* AC8b, AC9, AC8a e GT9. Conforme mostrado na tabela 8, foram observadas variações em número de cópias que variaram de seis a oito para o *locus* AC8b com índice de discriminação alélica (h) de 0,47, de sete a nove para o *locus* AC9 com $h = 0,51$, de 8 a 11 para o *locus* AC8a com $h = 0,57$ e de oito a 16 para o *locus* GT9 com $h = 0,57$. Dessa forma, os *loci* de VNTRs empregados neste estudo foram considerados moderadamente discriminatórios.

Tabela 8- Diversidade alélica dos 4 loci de VNTRs

VNTR	Número de alelos							Diversidade alélica (h)	Conclusão	Total de amostras	
	6	7	8	9	10	11	12				16
AC 8b	1	30	17					0,47	Moderadamente discriminante	48	
AC 9		19	19	1				0,51	Moderadamente discriminante	39	
AC 8a			20	20	3	1		0,57	Moderadamente discriminante	44	
GTA 9			2	14	24		2	1	0,57	Moderadamente discriminante	43

Fonte: Próprio autor (2014).

Com a perda de dados demográficos, do total de 48 amostras de SN genotipadas para os quatro *loci* (TABELA 9), somente 12 amostras foram utilizadas para análise descritiva e comparações dos genótipos de *M. leprae* definidos neste estudo, das quais houve a formação de quatro grupos com cepas de genótipo de *M. leprae* indênticos, o que resultou em um índice discriminatório de Hunter – Gaston de 0.7273 (HGDI) (TABELA 10).

Tabela 9- VNTRs das cepas de *M. leprae* das 48 amostras

Registro	AC 8b	AC 9	AC 8a	GTA 9
84267*	8	8	8	10
85.886	7	8	9	9
86187*	8	7	8	10
86.190	7	8	9	9
86.340	7	7	8	9
86.362	7	8	9	9
86.394	7	7	8	-
86.498	7	7	8	16
86.555	7	8	9	10
86610*	6	-	8	9
86.645	7	-	9	-
86776*	7	8	8	9
86.829	7	-	8	9
86.855	8	7	8	10
86962*	8	7	8	10
87126*	8	7	8	10
87184*	7	8	9	-
87212*	7	8	9	8
87.214	8	7	8	10
87330*	7	7	10	8
87401*	8	7	8	10
87.419	7	-	9	-
87.549	8	7	9	10
87.560	7	8	9	9
87914*	8	7	8	10

Tabela 9- VNTRs das cepas de *M. leprae* das 48 amostras

Registro	AC 8b	AC 9	AC 8a	GTA 9
88.276	8	-	-	-
88689*	8	7	8	10
88742*	7	8	9	10
88935*	7	8	9	12
89.115	7	8	9	9
89160*	7	8	8	10
89167*	7	8	9	9
89.167	7	8	9	9
90148*	8	7	9	10
90373*	7	7	9	10
90.730	8	-	10	-
90.780	8	-	-	10
91.371	8	-	-	10
91.796	7	8	9	9
91845*	7	8	10	10
91.979	8	7	9	10
92008*	7	8	9	10
92070*	7	9	11	10
92114*	7	7	8	10
92.275	7	-	-	10
92662*	7	8	8	9
92.642*	7	7	8	10
-	8	7	8	12

Fonte: Próprio autor (2014). * amostras utilizadas para análise descritiva.

Tabela 10 - Grupos de amostras com genótipo de *M. leprae* idêntico

Registro	Grupo	AC 8b	AC 9	AC 8a	GTA 9
86.776	1	7	8	8	9
92.662	1	7	8	8	9
92.642	2	7	7	8	10
92.114	2	7	7	8	10
88.742	3	7	8	9	10
92.008	3	7	8	9	10
87.401	4	8	7	8	10
86.187	4	8	7	8	10
87.126	4	8	7	8	10
87.914	4	8	7	8	10
86.962	4	8	7	8	10
88.689	4	8	7	8	10

Fonte: Próprio autor (2014).

As características dos pacientes, obtidas através do questionário aplicado (APÊNDICE 1), foram avaliadas entre as amostras de cepas agrupadas e foram selecionadas

as informações consideradas mais prováveis de estarem fazendo associações entre os indivíduos de cada grupo (TABELA 11).

O grupo 1 foi composto de dois indivíduos com hanseníase virchowiana, cicatriz de BCG, com idades de 51 e 62 anos, os quais em comum nasceram em um município do interior do Ceará chamado Aracati, esses indivíduos moraram no mesmo período em Aracati por 12 anos. Ambos afirmaram ter conhecido alguém com hanseníase, mas que não era parente. A data de diagnóstico foi um ano de diferença de um para o outro.

O grupo 2 foi composto de dois indivíduos com hanseníase dimorfa, cicatriz de BCG, com idades de 59 e 60 anos, diagnosticados no ano de 2010 com diferença de 4 meses. Nasceram em cidades diferentes no interior do Ceará e foram morar em Fortaleza em 1995 e 1970, respectivamente.

O grupo 3 foi composto de dois indivíduos com idades de 34 e 32 anos e diagnosticados com um ano de diferença. O primeiro nasceu e morava em Fortaleza, apresentava hanseníase dimorfa e cicatriz de BCG. O segundo nasceu em São Paulo, vindo para Fortaleza em 1997, apresentava hanseníase virchowiana e sem cicatriz de BCG.

O grupo 4 foi composto por 6 indivíduos com idades que variaram de 12 a 71 anos de idade, todos foram diagnosticados no ano de 2009. No grupo, quatro indivíduos apresentaram hanseníase dimorfa e os dois que apresentaram hanseníase virchowiana foram diagnosticados no mês de fevereiro do ano de 2009.

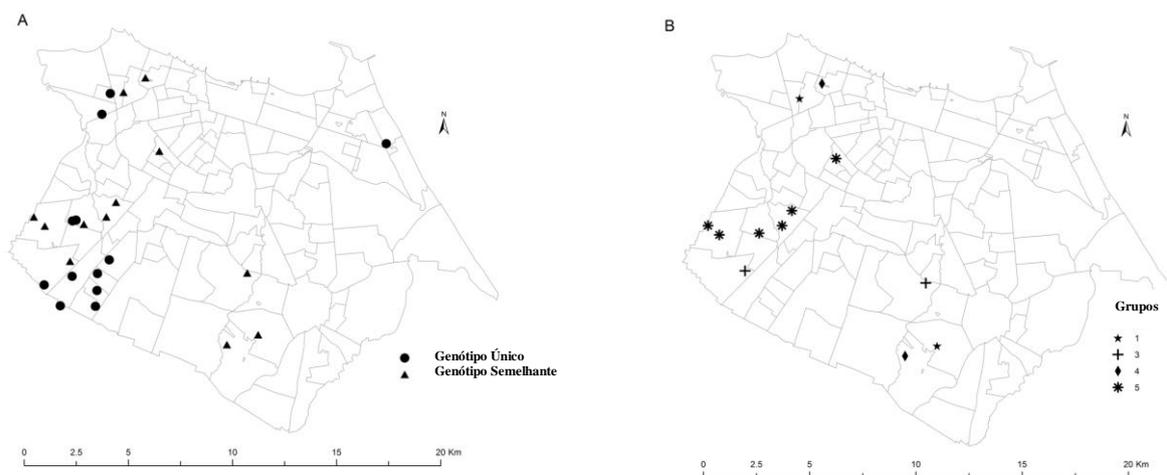
Tabela 11- Características principais dos indivíduos pertencentes aos grupos formados

Registro	Grupo	Data do diagnóstico	Forma clínica	Cidade de nascimento	Data nascimento	Idade	Cicatriz de BCG
86776	1	11/03/2009	Virchowiana	Aracati/CE	29/11/1946	62	sim
92662	1	19/08/2010	Virchowiana	Aracati/CE	08/10/1958	51	sim
92642	2	18/08/2010	Dimorfa	Missao Velha/CE	18/08/1950	60	sim
92114	2	29/04/2010	Dimorfa	Morada Nova/CE	16/04/1951	59	sim
88742	3	09/09/2009	Dimorfa	Fortaleza/CE	16/06/1975	34	não
92008	3	21/06/2010	Virchowiana	Sao Paulo/SP	12/12/1977	32	não
87401	4	25/04/2009	Virchowiana	Uruburetama/CE	23/05/1964	45	sim
86187	4	01/02/2009	Dimorfa	Canide/CE	01/08/1937	71	não
87126	4	01/04/2009	Virchowiana	Capistrano de Abreu/CE	29/10/1955	53	não
87914	4	01/07/2009	Dimorfa	Fortaleza/CE	19/03/1966	43	não
86962	4	01/03/2009	Dimorfa	Fortaleza/CE	22/05/1995	13	sim
88689	4	28/08/2009	Dimorfa	Sao Joao da Se/PI	01/07/1997	12	sim

Fonte: Próprio autor (2014).

A análise da distribuição geográfica da população de pacientes com base no endereço residencial não revelou agrupamentos dos pacientes com genótipos semelhantes, enquanto que entre os pacientes com genótipos únicos, foi observado uma maior proximidade geográfica com maior aglomeração na região oeste do município (FIGURA 8).

Figura 8- Mapas do Município de Fortaleza com a moradia dos indivíduos com os genótipos da cepa de *M. leprae* analisados



Fonte: Próprio autor (2014). A: Localização da moradia dos pacientes de acordo com aqueles com cepas de genótipos únicos e cepas de genótipos semelhantes. B: Localização da moradia dos pacientes de acordo com os grupos formados a partir das cepas com genótipos semelhantes.

Quando foram avaliadas algumas características dos pacientes com cepas agrupadas e as que não se agrupavam, para que dessa forma, fossem identificadas quais estariam associadas à formação dos grupos, foi observado que os pacientes que foram enquadrados em grupos apresentaram média de idade de 23,5, enquanto os com genótipos únicos apresentaram média de 48 ($p= 0,0110$). O tempo entre sintomas e diagnóstico dos pacientes com cepas agrupadas foi menor do que as de genótipo único, mas não foi estatisticamente significativa, já o índice baciloscópico foi o mesmo para ambos os grupos de pacientes (TABELA 12).

Tabela 12- Comparação de características dos pacientes com cepas agrupadas e não agrupadas pelo Teste de *Mann-Whitney*

	Amostras	N	Média	dp	Mediana	p
Idade	não agrupadas	12	25,500	8,163	23,5	0,0110
	agrupadas	12	44,583	18,807	48,0	
Tempo (meses) entre sintomas e diagnóstico	não agrupadas	12	22,625	17,391	24,8	0,7728
	agrupadas	12	20,304	17,505	13,1	
Índice Baciloscópio	não agrupadas	9	4,239	0,302	4,0	0,9670
	agrupadas	10	4,100	1,312	4,3	

Fonte: Próprio autor (2014). dp, desvio padrão.

Amostras de SN e de BP do mesmo paciente foram analisadas para investigar a possibilidade de diversidade genética do *M. leprae* no indivíduo, sendo para tanto comparadas amostras de 38 pacientes e avaliados 15 *loci* de VNTRs (TABELA 13).

Alguns *loci* de amostras de *M. leprae* de SN não amplificaram. Deste modo, na análise de comparação genotípica das cepas originadas do mesmo paciente foram observadas as quantidades dos *loci* divergentes e dos *loci* que não amplificaram (TABELA 13).

Dentre os resultados, amostras de cinco pacientes não divergiram em nenhum *loci* amplificado, porém a SN de dois destes cinco pacientes não amplificaram um *locus* e as cepas de SN dos outros três pacientes não amplificaram dois *loci* (TABELA 13).

Outros dois pacientes tiveram cepas com uma similaridade real de 86,7%, visto que todos os *loci* amplificaram (TABELA 13).

Outro par de pacientes apresentaram cepas que divergiram em sete *loci*, esses pacientes foram os que apresentaram SN e BP com as cepas mais diferentes, pois em um paciente todos os 15 *loci* foram amplificados e no outro somente um *loci* não amplificou (TABELA 13).

Cepas com notáveis diferenças entre SN e BP foram observadas também em quatro pacientes. Suas amostras divergiram em cinco *loci*, também com alguns *loci* não amplificados. Outro paciente teve cepas que divergiram em seis *loci*, com somente um *loci* não amplificado. Adicionalmente, foi observado que a maioria das cepas de *M. leprae* do mesmo paciente com *loci* de VNTRs diferentes envolveu aumento do número de cópias nas amostras de BP (TABELA 13).

Tabela 13- VNTRs das cepas de *M. leprae* das amostras de secreção nasal e biópsia de pele do mesmo paciente

Registro	Amostra	AT17	GGT5	GTA9	AC8b	AC8a	AT15	AC9	21-3	GAA21	TA18	6-7	27-5	TA10	23-3	12-5	Nº VNTRs não amplificados	Nº VNTRs diferentes
86.555	SN	11	4	10	7	9	16	8	2	12	21	6	5	-	2	4	1	0
	BP	11	4	10	7	9	16	8	2	12	21	6	5	8	2	4		
87.212	SN	12	4	8	7	9	14	8	2	13	23	6	5	-	2	4	1	0
	BP	12	4	8	7	9	14	8	2	13	23	6	5	8	2	4		
87.156	SN	10	4	9	-	9	16	7	2	14	19	6	5	-	2	4	2	0
	BP	10	4	9	7	9	16	7	2	14	19	6	5	8	2	4		
86.190	SN	11	4	9	7	9	-	8	2	11	21	6	5	-	2	4	2	0
	BP	11	4	9	7	9	28	8	2	11	21	6	5	8	2	4		
87.401	SN	19	4	10	8	8	-	7	2	14	16	6	5	-	2	4	2	0
	BP	19	4	10	8	8	24	7	2	14	16	6	5	8	2	4		
87.914	SN	16	4	10	8	8	16	7	2	14	18	6	5	10	2	4	0	2
	BP	16	4	10	8	8	15	7	2	15	18	6	5	10	2	4		
91.796	SN	13	4	9	7	9	16	8	2	11	25	7	5	8	2	4	0	2
	BP	13	4	9	7	9	16	8	2	11	21	6	5	8	2	4		
86.187	SN	-	4	10	8	8	22	7	2	15	15	6	5	-	2	4	2	2
	BP	21	4	10	8	8	23	7	2	15	15	6	5	8	2	4		
85.886	SN	13	4	9	7	9	17	8	2	12	15	7	5	-	2	4	1	2
	BP	13	4	9	7	9	18	8	2	12	17	7	5	8	2	4		
88.935	SN	13	4	12	7	9	18	8	2	11	18	7	4	10	2	4	0	3
	BP	13	4	12	7	9	19	8	2	11	19	6	4	10	2	4		
89.167	SN	12	4	9	7	9	15	8	2	12	17	5	5	9	2	4	0	3
	BP	12	4	9	7	10	14	8	2	12	17	6	5	9	2	4		
92.070	SN	14	4	10	7	11	16	9	2	9	-	7	5	10	2	4	1	2
	BP	14	4	10	7	11	16	9	2	9	26	6	5	8	2	4		
87.126	SN	22	4	10	8	8	-	7	2	13	17	7	5	-	2	4	2	2
	BP	12	4	10	8	8	29	7	2	14	17	7	5	8	2	4		
89.160	SN	11	4	10	7	8	16	8	2	11	-	7	5	8	2	4	1	3
	BP	11	4	10	7	8	15	8	2	12	21	6	5	8	2	4		

Tabela 13- VNTRs das cepas de *M. leprae* das amostras de secreção nasal e biópsia de pele do mesmo paciente.

Registro	Amostra	AT17	GGT5	GTA9	AC8b	AC8a	AT15	AC9	21-3	GAA21	TA18	6-7	27-5	TA10	23-3	12-5	Nº VNTRs não amplificados	Nº VNTRs diferentes
90.148	SN	13	4	10	8	9	10	7	2	13	15	7	5	8	2	4	0	4
	BP	20	4	10	8	8	29	7	2	14	15	7	5	8	2	4		
86.855	SN	18	4	10	8	8	-	7	2	14	19	7	5	-	2	4	2	3
	BP	14	4	10	8	9	25	7	2	14	20	7	5	8	2	4		
84.267	SN	13	4	10	8	8	16	8	2	12	18	6	5	-	2	4	1	4
	BP	12	4	9	7	9	16	8	2	12	18	6	5	8	2	4		
87.851	SN	15	4	-	-	8	16	7	2	12	15	6	4	8	2	4	2	3
	BP	16	4	15	7	8	16	7	2	12	14	6	5	8	2	4		
88.742	SN	13	4	10	7	9	16	8	2	11	26	6	5	8	2	4	0	5
	BP	13	4	9	7	9	15	8	2	13	25	5	5	8	2	4		
88.689	SN	16	4	10	8	8	-	7	2	15	-	7	5	8	2	4	2	3
	BP	17	4	10	8	8	22	7	2	16	25	6	5	8	2	4		
86.776	SN	13	4	9	7	8	21	8	2	12	16	X	5	-	2	4	2	4
	BP	13	4	9	8	9	22	8	2	12	17	6	5	8	2	4		
87.214	SN	18	4	10	8	8	-	7	2	14	22	-	-	-	2	4	4	2
	BP	18	4	10	8	8	33	7	2	13	25	6	5	8	2	4		
87.250	SN	17	4	10	-	8	-	7	2	14	17	7	-	-	2	4	4	2
	BP	17	4	10	8	8	26	7	2	15	16	7	5	8	2	4		
87.370	SN	18	4	9	-	9	13	8	-	10	19	7	5	-	2	5	3	3
	BP	19	4	9	7	9	12	8	2	10	19	7	4	10	2	5		
86.962	SN	17	6	10	8	8	-	7	2	17	19	6	5	-	2	4	2	4
	BP	25	4	10	8	8	34	7	2	16	14	6	5	8	2	4		
87.669	SN	11	4	12	-	9	19	7	2	12	-	6	4	8	2	4	2	4
	BP	15	4	12	7	9	17	7	2	15	17	6	2	8	2	4		
88.053	SN	14	4	10	-	9	19	8	2	11	16	5	5	5	5	4	1	6
	BP	12	4	9	7	9	16	8	2	10	16	6	5	10	2	4		
86.340	SN	14	4	9	7	8	22	7	2	10	-	6	5	-	2	4	2	5
	BP	13	4	9	7	9	14	8	2	12	30	6	5	9	2	4		

Tabela 13- VNTRs das cepas de *M. leprae* das amostras de secreção nasal e biópsia de pele do mesmo paciente.

Registro	Amostra	AT17	GGT5	GTA9	AC8b	AC8a	AT15	AC9	21-3	GAA21	TA18	6-7	27-5	TA10	23-3	12-5	Nº VNTRs não amplificados	Nº VNTRs diferentes
91.845	SN	11	4	10	7	10	16	8	2	9	20	7	5	8	2	4	0	7
	BP	17	4	9	8	9	16	8	2	15	23	6	5	8	2	4		
91.979	SN	15	4	10	8	9	-	7	2	14	16	7	5	8	2	4	1	7
	BP	13	4	9	7	9	16	7	2	11	14	6	5	8	2	4		
89.230	SN	-	4	7	-	9	-	8	2	11	20	-	-	8	2	-	6	2
	BP	12	4	9	7	9	16	8	2	12	20	6	5	8	2	4		
87.188	SN	18	4	10	-	9	-	7	2	14	-	-	-	-	2	3	6	3
	BP	20	4	10	8	8	28	7	2	14	17	6	5	8	2	4		
87.549	SN	-	4	10	8	9	-	7	2	-	22	-	4	-	-	-	7	3
	BP	11	4	10	8	9	16	7	2	13	14	6	5	8	2	4		
87.728	SN	12	4	10	-	9	18	-	2	10	-	5	-	11	2	-	5	5
	BP	18	4	10	8	8	25	7	2	19	23	6	5	8	2	4		
88.079	SN	16	-	-	-	8	-	-	-	14	13	6	4	8	2	4	6	3
	BP	16	4	10	8	8	30	6	2	13	5	6	5	8	2	4		
87.197	SN	18	4	9	-	9	-	7	-	14	-	7	-	-	-	3	7	4
	BP	18	4	11	8	9	21	7	2	15	10	6	5	8	2	4		
88.119	SN	12	4	13	-	10	15	7	2	10	-	-	6	-	-	-	6	5
	BP	16	4	7	7	10	20	7	2	14	18	7	5	8	2	4		
88.899	SN	11	4	11	-	-	20	-	-	14	-	-	-	9	2	-	8	3
	BP	13	4	9	8	8	22	7	2	14	19	6	5	9	2	4		

Fonte: Próprio autor (2014). Em amarelo os loci diferentes. Em vermelho os maiores números de loci diferentes. SN= Secreção Nasal; BP=Biópsia.

REFERÊNCIAS

- ALLIX-BÉGUEC, C. et al. Evaluation and strategy for use of MIRU-VNTRplus, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. **Journal of clinical microbiology**, v. 46, n. 8, p. 2692–2699, 2008.
- ANTONIO, L.; SANTOS, D. C.; ARMAUER, H. Contrapontos da história da hanseníase no Brasil : cenários de estigma e confinamento *. p. 167–190, 2008.
- ARMOUR, K. S.; SCOLYER, R. A.; BARNETSON, R. S. **Borderline lepromatous leprosy presenting as a single cutaneous plaque.***The Australasian journal of dermatology*, 2005.
- BABU, M. M. **Did the loss of sigma factors initiate pseudogene accumulation in *M. leprae*?***Trends in Microbiology*, 2003.
- BANERJEE, S. et al. Multiplex PCR technique could be an alternative approach for early detection of leprosy among close contacts--a pilot study from India. **BMC infectious diseases**, v. 10, p. 252, 2010.
- BARKER, L. P. *Mycobacterium leprae* interactions with the host cell: recent advances. **The Indian journal of medical research**, v. 123, n. 6, p. 748–59, jun. 2006.
- BEIGUELMAN, B. Genética e hanseníase * Genetics and leprosy. **Ciencia & Saúde Coletiva**, v. 7, n. 1, p. 117–128, 2002.
- BRITTON, W. J.; LOCKWOOD, D. N. J. **Leprosy***Lancet*. **Anais...**2004
- BUHRER-SEKULA, S. et al. Use of ML dipstick as a tool to classify leprosy patients. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association**, v. 68, n. 4, p. 456–463, 2000.
- CARDONA-CASTRO, N.; BELTRÁN-ALZATE, J. C.; MANRIQUE-HERNÁNDEZ, R. Survey to identify *Mycobacterium leprae*-infected household contacts of patients from prevalent regions of leprosy in Colombia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 4, p. 332–6, jun. 2008.
- CLARK-CURTISS, J. E.; WALSH, G. P. isolates of *Mycobacterium leprae* . Conservation of Genomic Sequences among Isolates of *Mycobacterium leprae*. v. 171, n. 9, 1989.
- COLE, S. T. et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. **Nature**, v. 409, n. 6823, p. 1007–1011, 2001.
- CROFT, R. A.; CROFT, R. P. Expenditure and loss of income incurred by tuberculosis patients before reaching effective treatment in Bangladesh. **The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease**, v. 2, n. 3, p. 252–254, 1998.

CUEVAS, J. et al. **Erythema Nodosum Leprosum: Reactional Leprosy Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, 2007.

CUNHA, S. S. et al. **Design of the leprosy component of the Brazilian BCG revaccination trial for assessing BCG effectiveness against leprosy in school children. International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association.** [s.l: s.n.].

DEPARTAMENTO DE INFORMÁTICA DO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE DO BRASIL, DATASUS. Disponível em: <<http://w3.datasus.gov.br/datasus/datasus.php>>. Acesso em: 12 set. 2013.

DE WIT, M. Y. et al. Application of a polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae* in skin tissues. **Journal of clinical microbiology**, v. 29, n. 5, p. 906–10, maio 1991.

DONOGHUE, H. D.; HOLTON, J.; SPIGELMAN, M. PCR primers that can detect low levels of *Mycobacterium leprae* DNA. **Journal of medical microbiology**, v. 50, n. 2, p. 177–82, fev. 2001.

FOSS, N. T.; CAROLINA, A.; MOTTA, F. Leprosy , a neglected disease that causes a wide variety of clinical conditions in tropical countries. v. 107, p. 28–33, 2012.

FOSS, N. T.; MOTTA, A. C. F. Leprosy, a neglected disease that causes a wide variety of clinical conditions in tropical countries. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107 Suppl , p. 28–33, 2012.

FROTA, C. C. et al. Seropositivity to anti-phenolic glycolipid-I in leprosy cases, contacts and no known contacts of leprosy in an endemic and a non-endemic area in northeast Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 104, n. 7, p. 490–495, 2010.

GILLIS, T. et al. Characterisation of short tandem repeats for genotyping *Mycobacterium leprae*. **Leprosy review**, v. 80, n. 3, p. 250–260, 2009.

GILMOUR, M. N.; WHITTAM, T. S. Population Genetics. v. 51, n. 5, p. 873–884, 1986.

GROATHOUSE, N. A. et al. Multiple polymorphic loci for molecular typing of strains of *Mycobacterium leprae*. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 4, p. 1666–1672, 2004.

HUNTER, P. R.; GASTON, M. A. typing systems : an application of Simpson ' s Numerical Index of the Discriminatory Ability of Typing Systems : an Application of Simpson ' s Index of Diversity. v. 26, n. 11, p. 2465–2467, 1988.

JENSEN, R. W. et al. DNA fingerprinting of *Mycobacterium leprae* strains using variable number tandem repeat (VNTR) - fragment length analysis (FLA). **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 53, p. e3104, jan. 2011.

JOB, C. K. et al. Transmission of leprosy: a study of skin and nasal secretions of household contacts of leprosy patients using PCR. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 78, n. 3, p. 518–21, mar. 2008.

JOYCE, M. P. Historic aspects of human susceptibility to leprosy and the risk of conjugal transmission. v. 107, p. 17–21, 2012.

KEIM, P. et al. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. **Journal of bacteriology**, v. 182, n. 10, p. 2928–36, maio 2000.

KERR-PONTES, L. R. S. et al. Inequality and leprosy in Northeast Brazil: an ecological study. **International journal of epidemiology**, v. 33, n. 2, p. 262–269, 2004.

KERR-PONTES, L. R. S. et al. Socioeconomic, environmental, and behavioural risk factors for leprosy in North-east Brazil: results of a case-control study. **International journal of epidemiology**, v. 35, n. 4, p. 994–1000, 2006.

KUMAR, B.; DOGRA, S. Leprosy: A disease with diagnostic and management challenges! **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**, v. 75, n. 2, p. 111, 2009.

LAVANIA, M. et al. Detection of viable *Mycobacterium leprae* in soil samples: insights into possible sources of transmission of leprosy. **Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 8, n. 5, p. 627–31, set. 2008.

LIU, D. et al. Analysis of newly detected leprosy cases and misdiagnosis in Wuhan (1990–2004). **Leprosy review**, v. 80, n. 4, p. 410–415, 2009.

LOCKWOOD, D. N. J.; SUNEETHA, S. Leprosy: too complex a disease for a simple elimination paradigm. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 83, n. 3, p. 230–235, 2005.

LOMBARDI, C. et al. Protective efficacy of BCG against leprosy in Sao Paulo. **Bull Pan Am Health Organ**, v. 30, n. 1, p. 24–30, 1996.

LOVETT, S. T. Encoded errors: mutations and rearrangements mediated by misalignment at repetitive DNA sequences. **Molecular microbiology**, v. 52, n. 5, p. 1243–53, jun. 2004.

MALORNY, B.; JUNKER, E.; HELMUTH, R. Multi-locus variable-number tandem repeat analysis for outbreak studies of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. **BMC microbiology**, v. 8, p. 84, 2008.

MATSUOKA, M. et al. Genotyping of *Mycobacterium leprae* on the Basis of the Polymorphism of TTC Repeats for Analysis of Leprosy Transmission Genotyping of *Mycobacterium leprae* on the Basis of the Polymorphism of TTC Repeats for Analysis of Leprosy Transmission. 2004.

MATSUOKA, M.; KASHIWABARA, Y.; NAMISATO, M. A *Mycobacterium leprae* isolate resistant to dapsone, rifampin, ofloxacin and sparfloxacin. **International journal of leprosy**

and other mycobacterial diseases: official organ of the International Leprosy Association, v. 68, n. 4, p. 452–5, dez. 2000.

MEYERS, W. M.; GORMUS, B. J.; WALSH, G. P. Nonhuman sources of leprosy. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases: official organ of the International Leprosy Association**, v. 60, n. 3, p. 477–480, 1992.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de procedimentos técnicos: baciloscopia em hanseníase** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010. 54 p. : il. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

MONOT, M. et al. On the origin of leprosy. **Science (New York, N.Y.)**, v. 308, n. 5724, p. 1040–1042, 2005.

MONOT, M. et al. Are variable-number tandem repeats appropriate for genotyping *Mycobacterium leprae*? **Journal of clinical microbiology**, v. 46, n. 7, p. 2291–7, jul. 2008.

MONOT, M. et al. Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. **Nature genetics**, v. 41, n. 12, p. 1282–9, dez. 2009.

NAGAO-DIAS, A. T. et al. Salivary anti-PGL IgM and IgA titers and serum antibody IgG titers and avidities in leprosy patients and their correlation with time of infection and antigen exposure. **The Brazilian journal of infectious diseases: an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 11, n. 2, p. 215–219, 2007.

NAKAMURA, K. et al. Detection of RNA expression from pseudogenes and non-coding genomic regions of *Mycobacterium leprae*. **Microbial Pathogenesis**, v. 47, n. 3, p. 183–187, 2009.

PARDILLO, F. E. F. et al. Methods for the classification of leprosy for treatment purposes. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 44, n. 8, p. 1096–1099, 2007.

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

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

R, M. C. Enfermedad de Hansen: Revisión a propósito de un caso. v. 25, n. 1, p. 64–69, 2008.

RADA, E. et al. Serologic follow-up of IgG responses against recombinant mycobacterial proteins ML0405, ML2331 and LID-1 in a leprosy hyperendemic area in Venezuela. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 107 Suppl, p. 90–94, 2012.

REES, R. J. Animal models in leprosy. **British medical bulletin**, v. 44, n. 3, p. 650–64, jul. 1988.

REYES, J. F.; TANAKA, M. M. Mutation rates of spoligotypes and variable number tandem repeat loci in *Mycobacterium tuberculosis*. **Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 10, n. 7, p. 1046–1051, 2010.

RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.**, v. 34, n. 3, p. 255-273, 1966.

RODRIGUES, L. C. et al. Long lasting BCG protection against leprosy. **Vaccine**, v. 25, n. 39-40, p. 6842–6844, 2007.

RODRIGUES, M. L. et al. **Protective effect of intradermal BCG against leprosy; a case-control study in central Brazil. International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association.** [s.l: s.n.].

SAKAMURI, R. M. et al. Population-based molecular epidemiology of leprosy in Cebu, Philippines. **Journal of clinical microbiology**, v. 47, n. 9, p. 2844–54, set. 2009.

SASAKI, S. et al. *Mycobacterium leprae* and leprosy: a compendium. **Microbiology and immunology**, v. 45, n. 11, p. 729–736, 2001.

SCOLLARD, D. M. et al. The continuing challenges of leprosy. **Clinical microbiology reviews**, v. 19, n. 2, p. 338–381, 2006a.

SCOLLARD, D. M. et al. The Continuing Challenges of Leprosy The Continuing Challenges of Leprosy. v. 19, n. 2, 2006b.

SHEPARD, C. C. THE EXPERIMENTAL DISEASE THAT FOLLOWS THE INJECTION OF HUMAN LEPROSY BACILLI INTO FOOT-PADS OF MICE. **The Journal of experimental medicine**, v. 112, n. 3, p. 445–454, 1960.

SHIN, Y. C. et al. Variable numbers of TTC repeats in *Mycobacterium leprae* DNA from leprosy patients and use in strain differentiation. **Journal of clinical microbiology**, v. 38, n. 12, p. 4535–4538, 2000.

SIMPSON, E. H. Measurement of diversity. **Nature**, p. 163-688, 1949.

SINGH, P.; COLE, S. T. *Mycobacterium leprae*: genes, pseudogenes and genetic diversity. **Future microbiology**, v. 6, n. 1, p. 57–71, 2011.

SOLA, C. et al. Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRUs: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 3, n. 2, p. 125–133, jul. 2003.

SUPPLY, P. et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, n. 12, p. 4498–4510, 2006.

TALHARI, S. et al. Hansen ' s disease : a vanishing disease ? v. 107, n. March, p. 13–16, 2012.

THIBAUT, V. C. et al. Combined multilocus short-sequence-repeat and mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem-repeat typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates. **Journal of clinical microbiology**, v. 46, n. 12, p. 4091–4094, 2008.

TRUMAN, R. et al. Genotypic Variation and Stability of Four Variable-Number Tandem Repeats and Their Suitability for Discriminating Strains of *Mycobacterium leprae*. v. 42, n. 6, p. 2558–2565, 2004.

TRUMAN, R. W. et al. Evaluation of the origin of *Mycobacterium leprae* infections in the wild armadillo, *Dasypus novemcinctus*. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 35, n. 3, p. 588–593, 1986.

TYAGI, J. S.; SAINI, D. K. Did the loss of two-component systems initiate pseudogene accumulation in *Mycobacterium leprae*? **Microbiology (Reading, England)**, v. 150, n. Pt 1, p. 4–7, jan. 2004.

VISSA, V. D.; BRENNAN, P. J. The genome of *Mycobacterium leprae*: a minimal mycobacterial gene set. **Genome biology**, v. 2, n. 8, p. REVIEWS1023, 2001.

WALKER, S. L.; LOCKWOOD, D. N. J. The clinical and immunological features of leprosy. **British medical bulletin**, v. 77-78, p. 103–121, 2006.

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

WOODS, S. A.; COLE, S. T. A family of dispersed repeats in *Mycobacterium leprae*. **Molecular microbiology**, v. 4, n. 10, p. 1745–1751, 1990.

XING, Y. et al. VNTR typing studies of *Mycobacterium leprae* in China: assessment of methods and stability of markers during treatment. **Leprosy review**, v. 80, n. 3, p. 261–71, set. 2009.

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

YOUNG, S. K. et al. Microsatellite mapping of *Mycobacterium leprae* populations in infected humans. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 11, p. 4931–4936, 2004.

ZHANG, L.; BUDIAWAN, T.; MATSUOKA, M. Diversity of Potential Short Tandem Repeats in *Mycobacterium leprae* and Application for Molecular Typing. v. 43, n. 10, p. 5221–5229, 2005.

ZODPEY, S. P.; AMBADEKAR, N. N.; THAKUR, A. Effectiveness of Bacillus Calmette Guerin (BCG) vaccination in the prevention of leprosy: A population-based case-control study in Yavatmal District, India. **Public Health**, v. 119, n. 3, p. 209–216, 2005.

APÊNDICE A – QUESTIONÁRIO

1. Caso ou controle: 1. () Caso 2. () Controle. Se controle pule para Questão 7
Caso: pacientes que se enquadrem no perfil de sujeito da pesquisa (diagnóstico de hanseníase; idade entre 5 e 65 anos de idade)
Controle: pacientes que não apresentam os requisitos para compor o perfil do sujeito da pesquisa.

2. Tipo de paciente:
 - 1) MDT-U/Caso Novo
Paciente virgem de tratamento, recém-ingresso no MDT-U (Projeto já em andamento no D. Libânia) ou apenas um
 - 2) MDT-U Em curso de tratamento
Paciente já participante do projeto MDT-U e realizando tratamento
 - 3) Neural Pura
Paciente sem lesões cutâneas, com manifestações em nervo somente.
 - 4) Lesão Única (Paucibacilar)
Paciente apresentando apenas uma única lesão cutânea que é descartado no MDT-U
 - 5) Multibacilar (não MDT-U)
Paciente multibacilar, mas que não está participando do projeto MDT-U

3. Código no MDT-U: |___|___|___|___|
Esta informação é solicitada somente para os participantes do projeto MDT-U. Inserir o código identificador atribuído aos pacientes já participantes do projeto MDT-U. Esta informação encontra-se no cartão de consultas do paciente. Se não for MDT-U e apenas caso novo incluir o código 00 (dois zeros).

4. Número Prontuário: |___|___|___|___|___|
Inserir o número do prontuário do paciente. Esta informação encontra-se no cartão de consultas do paciente

5. Data dos 1^{os} Sintomas: __/__/__
Informar a data mais precisa possível em que o paciente se recorda do aparecimento dos primeiros sintomas. A data deve ser inserida no seguinte formato 00/00/0000, devendo-se digitar as barras.

6. Data do diagnóstico: __/__/__
Inserir a data do diagnóstico. Esta informação encontra-se no cartão de consultas do paciente. A data deve ser inserida no seguinte formato 00/00/0000, devendo-se digitar as barras

7. Letra do entrevistador e número do questionário: _____

CASO: Inserir sua letra identificadora (previamente atribuída) e o número do questionário que você está realizando. O número do questionário corresponde à quantidade de entrevista que você realizou, independente desta ter sido finalizada. Ex: você está realizando sua primeira entrevista e sua letra identificadora é G. Neste espaço, insira G01.

CONTROLE: Os controles possuem numeração diferenciada, que se iniciará em 1001, 1002, 1003 etc. Os números deverão estar contidos no intervalo de 1001 a 1259. Para saber o número da sua entrevista de controle, cheque a “Planilha para coleta de dados (CONTROLE)” e verifique a numeração correspondente a última entrevista registrada. A sua entrevista utilizará o número seguinte e assim sucessivamente.

8. Data da entrevista: __/__/__

Confirmar se a data exibida está correta. Caso não esteja, inserir a data corretamente, no formato requisitado pelo questionário (00/00/0000).

9.	Quantas pessoas residem em sua casa?	<p>Atualmente, ___ pessoas</p> <p>Pedir para que o paciente informe o número de pessoas que residem atualmente em sua casa</p> <p>E 10 anos atrás, ___ pessoas</p> <p>Pedir para que o paciente informe o número de pessoas que residiam com ele há 10 anos atrás</p>
10.	CASO Você conhece ou conhecia alguém que tem hanseníase antes do seu diagnóstico?	<p>Sim</p> <p>Não (pule para a 19)</p> <p>Não sei (pule para a 19)</p>

	<p>CONTROLE Você conhece ou conhecia alguém com hanseníase?</p> <p><i>Busca descobrir se o paciente conhecia alguém com hanseníase antes do seu diagnóstico.</i></p>		
11.	Quantas pessoas?	_____ pessoas	
12.	<p>Quem era?</p> <p><i>Marcar as pessoas dignósticadas com hanseníase com quem o sujeito entrevistado estabelecia contatos.</i></p> <p><i>Podem ser assinaladas mais de uma opção neste item.</i></p> <p><i>No caso de assinalar o item "outro", informar qual o tipo de relação que o sujeito</i></p>	<p>Parente (com quem convive freqüentemente) 1</p> <p>Parente (com quem tem pouca convivência) 2</p> <p>Vizinho 3</p> <p>Amigo 4</p> <p>Conhecido 5</p> <p>Colega de trabalho 6</p> <p>Outro _____ -8</p> <p><i>(Especificar)</i></p>	

	<i>entrevistado estabelecia com a pessoa com hanseníase</i>		
13.	Essa pessoa vivia ou ainda vive com você na mesma casa? <i>Verificar se houve convivência direta e frequente do sujeito entrevistado com a pessoa com hanseníase.</i>	Sim Não Não respondeu	1 2 -9
14.	Quando foi o primeiro contato com esta pessoa? <i>Inserir há quanto tempo ocorreu o último contato com a pessoa com hanseníase (anos, meses ou dias)</i>	_____ Anos, _____ Meses _____ Dias <i>Nesta opção, deve-se buscar preencher todos os espaços (anos, meses, dias).</i>	
15.	Quanto tempo (somando todos os períodos) durou o contato com esta pessoa que tinha hanseníase? <i>Inserir o tempo em que o</i>	_____ anos _____ meses _____ dias <i>Nesta opção, deve-se buscar preencher</i>	

	<p><i>entrevistado manteve contato com a pessoa com hanseníase. Caso este contato tenha acontecido em intervalos, informar a soma total dos intervalos de contato.</i></p> <p><i>Ex. Joao manteve contato com Maria (com hanseníase) por 1 ano em 1999 e mais 2 anos entre 2001 e 2003. Deve-se informar “3 anos” de contato, a soma dos períodos de exposição.</i></p>	<p><i>todos os espaços (anos, meses, dias) para informações mais precisas.</i></p>	
16.	<p>Qual a frequência desse contato?</p> <p><i>Assinalar a frequência, o mais aproximado possível, com que o entrevistado mantinha contato com pessoas com hanseníase.</i></p> <p><i>No caso de assinalar a opção</i></p>	<p>Diariamente</p> <p>Alguns dias por semana</p> <p>Mais de 15 dias de um mês</p> <p>Menos de 15 dias de um mês</p> <p>Mensalmente ou pouco mais</p> <p>Algumas vezes no semestre</p> <p>Mais de metade dos dias do ano</p> <p>Menos de metade dos dias do ano</p> <p>Anualmente ou pouco mais</p> <p>Outra</p>	

	<p><i>“Outra”, especificar este tipo de contato no espaço “Digite o parentesco com essa pessoa” que aparece logo após.</i></p>		
17.	<p>Que tipo de contato você tinha com esta(s) pessoa(s)?</p> <p><i>Informar o tipo de contato que o paciente entrevistado estabelecia com pessoas com hanseníase. No caso de assinalar a opção “outro contato”, informar o tipo de contato.</i></p> <p><i>Entrevistados CONTROLE pular para a questão 20.</i></p>	<p>Dormia na mesma cama/rede 1. Sim 2. Não</p> <p>Dormia no mesmo quarto 1. Sim 2. Não</p> <p>Usavam as mesmas roupas 1. Sim 2. Não</p> <p>Usavam a mesma toalha de banho 1. Sim 2. Não</p> <p>Cuidava dela (banho, alimento) 1. Sim 2. Não</p> <p>Namorava 1. Sim 2. Não</p> <p>Trabalhava junto 1. Sim 2. Não</p> <p>Outro contato 1. Sim 2. Não</p> <p>Especificar _____</p>	
18.	<p>Como você acha que pegou hanseníase?</p> <p><i>Busca a hipótese do paciente entrevistado (CASO) sobre como se contaminou. Formular resposta concisa conforme</i></p>	<p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p>	

	<p><i>relato.</i></p> <p><i>Esta pergunta não será realizada para os entrevistados CONTROLE.</i></p>	
19.	<p>Quando você acha que pegou hanseníase?</p> <p><i>Tentar estipular uma data com o paciente de quando ele acha que contraiu hanseníase.</i></p> <p><i>Buscar uma data com o maior nível de exatidão possível.</i></p> <p><i>Embora os pacientes possam não se recordar da data exata, muitas vezes costumam associar a algum evento, como aparecimento de sintomas, ou mesmo estipulam o período conforme as informações fornecidas pelos médicos (“Você deve ter contraído a doença há uns dois anos etc.”)</i></p>	<hr/> <hr/> <hr/> <hr/>

	<i>Esta pergunta não será realizada para os entrevistados CONTROLE.</i>		
20.	<p>CASO</p> <p>Você já tinha ouvido falar de hanseníase antes do seu diagnóstico?</p> <p>CONTROLE</p> <p>Você já tinha ouvido falar de hanseníase?</p> <p><i>Verificar se o paciente já possuía algum conhecimento prévio dos sintomas, tipos de manifestação, tratamento, transmissão ou alguma outra informação sobre a hanseníase.</i></p>	<p>Sim 1</p> <p>Não 2</p>	
21.	<p>Qual sua idade?</p> <p><i>Informar a idade do paciente.</i></p>	_____anos	

	<i>No caso de ser um sujeito-caso, verificar se ele se encontra na faixa etária de inclusão na pesquisa (entre 5 e 65 anos)</i>		
22.	Qual sexo? <i>Marcar o sexo do paciente</i>	Masculino Feminino	1 2
23.	Cor da pele <i>Perguntar ao paciente de que cor ele considera a sua pele</i>	Branca Parda Negra Amarela Não respondeu	1 2 3 4 -9
24.	Qual seu estado civil? <i>Perguntar ao paciente qual o seu estado civil.</i>	Solteiro Casado/Junto/amigado Divorciado/Desquitado/separado Viúvo Não respondeu	1 2 3 4 -9
25.	Você estudou até que série? <i>Perguntar ao paciente o seu grau de instrução. Caso não se recorde, tentar estipular juntamente com ele.</i>	Não freqüentei a escola Primeiro grau incompleto Primeiro grau completo Segundo grau incompleto Segundo grau completo Superior Superior incompleto	1 2 3 4 5 6 7 8

		Pós-graduação	-9
		Não respondeu	
26.	<p>Em qual dessas faixas de renda a sua família se enquadra?</p> <p><i>Calcular juntamente com o paciente quantos salários mínimos os componentes da família ganham e assinalar em qual das opções de faixa de renda a família se enquadra.</i></p> <p><i>O valor atual do salário mínimo é de R\$ 415,00</i></p>	<p>Sem rendimento</p> <p>Menos de um salário mínimo</p> <p>1 a <4 salários mínimos</p> <p>4 a <8 salários mínimos</p> <p>8 a <12 salários mínimos</p> <p>12 ou + salários mínimos</p> <p>Não sei</p> <p>Não respondeu</p>	<p>1</p> <p>2</p> <p>3</p> <p>4</p> <p>5</p> <p>-3</p> <p>-9</p>
27.	<p>Qual o grau de instrução do chefe da sua família?</p> <p><i>Verificar qual o nível de instrução do chefe da família. O chefe da família pode ser o próprio paciente entrevistado ou algum parente, normalmente identificado com</i></p>	<p>Não freqüentei a escola</p> <p>Primeiro grau incompleto</p> <p>Primeiro grau completo</p> <p>Segundo grau incompleto</p> <p>Segundo grau completo</p> <p>Superior incompleto</p> <p>Superior</p> <p>Pós-graduação</p>	<p>1</p> <p>2</p> <p>3</p> <p>4</p> <p>5</p> <p>6</p> <p>7</p> <p>8</p> <p>-9</p>

	<i>o provedor financeiro</i>	Não respondeu						
28.	<p>Quantos destes itens você possui em sua casa?</p> <p>Automóvel <i>Considere como automóvel somente carros. Não inclua motos.</i></p> <p>Banheiro <i>Inclua o número de banheiros que a pessoa informar possuir em sua residência</i></p> <p>Empregada Mensalista <i>Informe o número de empregadas que trabalham diariamente e recebem um salário mensal.</i></p> <p>Freezer ou Geladeira duplex. <i>Informe a soma do número de freezers e de geladeiras duplex, popularmente conhecidas por “geladeira de duas portas”;</i></p> <p>Geladeira simples <i>Informe o número de geladeiras com compartimento de congelamento interno</i></p>	<p><i>Para todos os itens mencionados você pode marcar as quantidades descritas abaixo (um, dois, três ou mais de quatro itens). Também existem as opções “Não sei informar” (NS), assinalada caso o paciente não saiba precisar a quantidade de itens existentes em sua residência, ou “Não respondeu” (NR), caso o paciente não queira responder a pergunta formulada.</i></p> <p>0 1 2 3 4+ NS NR</p>						

	Máquina. de lavar roupa <i>Informe a quantidade de máquinas de lavar roupa</i>	0	1	2	3	4+	NS	NR	
	Rádio <i>Informe o número de rádios que o paciente entrevistado afirma possuir.</i>	0	1	2	3	4+	NS	NR	
	TV em cores <i>Informe a quantidade de televisões em cores.</i>	0	1	2	3	4+	NS	NR	
	Videocassete/DVD <i>Informar a soma do número de videocassetes e dvds que o paciente entrevistado afirma possuir.</i>	0	1	2	3	4+	NS	NR	
29.	Você sempre teve comida suficiente para a família? <i>Questionar se a pessoa considera sempre ter possuído alimentação suficiente para toda a família; se já "passou fome".</i>							Sim Não Não sei Não respondeu	1 2 -3 -9
30.	Você já passou por grandes dificuldades financeiras durante sua vida?							Sim Não Não sei Não respondeu	1 2 -3 -9

31.	<p>Você já tomou BCG? <i>BCG é a vacina utilizada para imunização contra a tuberculose. Pode deixar uma pequena cicatriz no local da aplicação.</i></p>	<p>Sim Não Não Sei Não respondeu</p>
32.	<p>Presença de cicatriz no braço direito? <i>Se existe a cicatriz resultante da aplicação de BCG</i></p>	<p>Sim Não Não verificado</p>
33.	<p>Você fuma?</p>	<p>Sim Não (Pule para a 36) Não respondeu (pule para a 36)</p>
34.	<p>Se sim, quanto cigarros/dia?</p>	<p>< 1 maço/dia 1 maço/dia Mais de 1 maço/dia</p>
35.	<p>Com que frequência você consome bebidas alcoólicas?</p>	<p>Nunca (pule para o item "cidade de nascimento") Uma vez por mês ou menos 2 a 4 vezes por mês 2 a 3 vezes por semana 4 ou mais vezes por semana</p>

36.	<p>Quantas doses de álcool você consome num dia normal?</p> <p><i>Entende-se por dia normal, os dias em que a pessoa costuma beber, podendo ser durante a semana ou nos fins-de-semana</i></p> <p><i>Vale ressaltar que uma dose de álcool significa: 1 lata de cerveja; 1 dose de conhaque ou uísque; 1 taça de vinho; 1 dose de aperitivo; 1 copinho de pinga, cachaça ou caipirinha)</i></p>	<p>0 ou 1 dose</p> <p>2 ou 3 doses</p> <p>4 ou 5 doses</p> <p>6 ou 7 doses</p> <p>8 doses ou mais</p>
37.	<p>Com que frequência você consome cinco ou mais doses em uma única ocasião?</p> <p><i>Informar a frequência com que o paciente ingere cinco ou mais doses numa única ocasião de consumo</i></p>	<p>Nunca</p> <p>Menos de uma vez por mês</p> <p>Uma vez por mês</p> <p>Uma vez por semana</p> <p>Quase todos os dias</p>

34. LOCAL DE NASCIMENTO

Cidade: _____ Estado: |_|_|

35. HISTORIA DE VIDA

1) LOCAIS ONDE MOROU

*ENDEREÇO COM O MÁXIMO DE INFORMAÇÕES DO MAIS RECENTE PARA O MAIS ANTIGO**Informar os endereços em que o paciente residiu, do período mais recente ao período mais antigo.**É muito importante que os endereços registrados sejam os mais fidedignos possíveis. Na impossibilidade do paciente lembrar o número da residência, informar um cruzamento entre ruas próximo de onde ele habitava e um ponto de referência conhecido.**A utilização do mapa é bastante útil, pois visualizando uma avenida próximo de onde moravam, muitas vezes, os entrevistados conseguem localizar no mapa a rua onde residiam**Como frequentemente os pacientes se confundem sobre a ordem cronológica dos endereços que habitaram, é interessante tentar organizar os endereços primeiramente no papel, checando com o paciente se a ordem está correta, para posteriormente responder as questões no PocketPc*

<u>M1</u> <i>Período (anos)</i> <i>Colocar o ano de início e de fim do período que residiu neste endereço</i>	Cidade	Bairro <i>Utilizar o mapa, caso o paciente não se recorde do Bairro.</i>
	Endereço: _____ Complemento: _____ Ponto de referência: _____	N°

		<i>Informar ruas próximas ou pontos de referências, para que se possa atribuir coordenadas específicas aos locais de residência.</i>	
--	--	--	--

2) LOCAIS ONDE ESTUDOU

Neste tópico devem ser inseridas as escolas que o paciente entrevistado frequentou durante o ensino regular, como também as instituições de cursos profissionalizantes, de línguas estrangeiras, entre outros. Deve-se seguir, durante o preenchimento das perguntas, a ordem cronológica de realização dos cursos, do mais recente para o mais antigo.

No caso do ensino regular (ensino fundamental, médio, superior), verificar se o total de anos dos períodos mencionados condiz com o total de anos de escolaridade.

Importante informar o endereço com o maior número de informações e a maior precisão possível, para que possam ser estabelecidas coordenadas geográficas específicas para cada local de estudo. A utilização do mapa auxilia a encontrar bairros e ruas.

Caso o entrevistado pareça confuso sobre a ordem cronológica dos locais em que estudou, pode-se anotar as informações em papel, organizá-las juntamente com o paciente e posteriormente responder às perguntas no PocketPC

<u>E1</u>	Cidade	Bairro
<i>Período (anos)</i>		
<i>Inserir o ano em se iniciou e finalizou o período de estudo</i>		

<i>neste local</i>		
		Nome da escola
		Endereço: <i>Informar o endereço com a maior precisão possível. Caso o paciente não recorde o nome da rua, mesmo com o auxílio do mapa, inserir locais de referência, nomes de grandes avenidas ou cruzamento de ruas onde a escola se encontrava.</i>
		Endereço:
		Endereço:

3) LOCAIS ONDE TRABALHOU

Listar do mais recente para o mais antigo, preenchendo o campo do endereço com o máximo de informações possíveis. Aqui também é interessante utilizar o recurso de anotar previamente em um papel os diferentes locais onde o entrevistado trabalhou, para auxiliá-lo na organização cronológica.

Em que ano você começou a trabalhar? |__|__|__|__|

Informar o ano em que o entrevistado trabalhou pela primeira vez

<u>T1</u> Período <i>Informar o ano em que o entrevistado ingressou e o ano em que saiu desta empresa</i>	Cidade	Bairro
		Empresa ou tipo de atividade: <i>Informar o nome da empresa ou o tipo de atividade a qual a empresa se dedicava</i>
		Endereço: <i>Inserir o endereço mais fidedigno possível, com o auxílio do mapa. Caso o paciente não consiga recordar, indagar sobre pontos de referências e avenidas ou ruas próximas para que coordenadas geográficas possam ser estabelecidas posteriormente.</i>

4) LOCAIS DE LAZER

Locais de Lazer que você freqüentou nos últimos 10 anos (endereço com o máximo de informações)

Informar as quatro atividades de lazer que o paciente realiza mais freqüentemente. Caso o entrevistado realize uma mesma atividade em lugares diferentes, registrar os lugares que ele costuma freqüentar para realizar aquela atividade.

Ex: O entrevistado escolheu "Praia" como sua primeira opção de lazer. Deve-se listar as barracas de praia que ele costumeiramente freqüentava.

Seguem algumas sugestões:

1. Praia
2. Cinema
3. Tomar banho ou nadar em lagoas, rios, cacimba ou outras coleções de água
4. Visitar parentes ou amigos
5. Conversar com vizinhos na calçada
6. Visitar pessoas e/ou parentes que estão na prisão
7. Pescar
8. Caçar
9. Caminhar/Correr/Cooper
10. Esporte (futebol; vôlei; basquete, etc)
11. Forró ou locais de dança
12. Bares
13. Igreja
14. Clubes
15. Compras (shopping, supermercado, padaria, açougue, banco)
16. Outras

<u>L1</u>	Cidade	Bairro
	Local: <i>Nome do local onde a pessoa realiza determina atividade costumeira</i>	
	Endereço: <i>Endereço mais fidedigno possível do local onde realiza determinada atividade. Caso o paciente não se recorde do endereço, inserir pontos de referência para que possam ser atribuídas coordenadas geográficas posteriormente.</i>	

36. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES – TRABALHO /ESTUDO /LAZER (EM RELAÇÃO AO ÚLTIMO 30 DIAS)

Caso as atividades listadas nas perguntas anteriores, incluindo as de trabalho, estudo e lazer, tenham sido realizadas nos últimos 30 dias, as seguintes perguntas devem ser efetuadas.

Tempo de permanência (horas/dia) <i>Por quanto tempo perdura aquela atividade diariamente</i>	Área	Quantidade de pessoas com quem compartilha a área de atividade ao dia	Frequência da atividade por dias da semana <i>Quantas vezes na semana, o entrevistado realiza aquela atividade</i>	Rotina antes/ depois do diagnóstico	Tempo que exerce a atividade Anos Meses Preencher os campos, de acordo com o tempo relatado pelo entrevistado. Ex. Caso a pessoa informe 10 meses, preencher com 0 no campo “anos” e 10 no campo “meses”. Proceder do mesmo modo quando o entrevistado possuir anos de
	1 Aberta 2 Fechada			Informar, conforme as opções, se a rotina do entrevistado modificou-se ou não após o diagnóstico. <i>Esta pergunta não será feita para entrevistados CONTROLE.</i> 1 antes do diagnóstico <i>Assinalar esta opção caso o paciente realizasse a atividade somente antes do diagnóstico; se após o diagnóstico, o paciente tenha cessado este tipo de atividade.</i> 2 depois do diagnóstico mas antes do término do tratamento <i>Assinalar esta opção caso a atividade tenha se iniciado depois do diagnóstico, mas antes do término do tratamento de hanseníase</i>	

				<p>3. Depois da alta (término do tratamento)</p> <p><i>Assinalar esta opção caso a atividade tenha se iniciado depois do término do tratamento</i></p> <p>4. inalterado</p> <p><i>Assinalar esta opção caso a atividade tenha se iniciado antes do diagnóstico e perdure atualmente.</i></p>	atividade.
--	--	--	--	--	------------

37. A PARTIR DAS ATIVIDADES COLOCADAS NA TABELA ACIMA, QUAL O TRANSPORTE UTILIZADO PARA REALIZÁ-LAS?

Trecho:	Tipo de	Linha do	Existe mais	Tempo de	Nº médio de	Tempo de uso
1 Casa – Local	Transporte	transporte	alguma	desloca-	de pessoas que	desse transporte
2 Outro	1 ônibus	utilizada	linha	mento	viajaram no	
	2. Van/Topic	(especificar	utilizada?	(min)	transporte	
	3 carro	a linha	1 Sim			
<i>No caso da opção</i>	4 trem	principal)	2 Não			
<i>“outro”, descrever</i>	5 bicicleta	<i>Somente</i>				Anos
<i>qualquer trajeto</i>		<i>para ônibus</i>	<i>Em caso</i>			Meses
<i>diferente que o</i>		<i>e topic.</i>	<i>afirmativo,</i>			
<i>sujeito faça para</i>			<i>especificar</i>			
<i>realizar a atividade</i>						

<i>anteriormente descrita</i>	6 a pé 7 outro		<i>quais linhas.</i>			
-------------------------------	-------------------	--	----------------------	--	--	--

<p>38. Para realizar sua atividade de trabalho você precisa:</p> <p>1.Ficar em local fixo 2. Deslocar-se de um local a outro</p>
<p>39. Sua atividade de trabalho envolve contato com pacientes em ambientes de saúde (hospitais, posto de saúde, consultório médico)?</p> <p>1. Sim 2. Não</p>
<p>40. Você já esteve na prisão?</p> <p>Neste caso, a pergunta dirige-se ao paciente que já esteve preso.</p> <p>1. Sim 2. Não</p>

41. Quantas pessoas o visitam (ou	Frequência com que você recebe visitas	Tempo de permanência das visitas (em horas)
-----------------------------------	--	---

freqüentam sua casa) por semana ?	(dias por semana, mês ou ano)	
	_____ (dias)/ _____ (semana, mês, ano)	

42. Quantos lugares distintos você vai por mês?

Estipular o número de lugares diferentes que a pessoa freqüenta por mês.

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
CENTRO DE REFERÊNCIA NACIONAL EM DERMATOLOGIA SANITÁRIA DONA LIBÂNIA - CDERM

ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro do Projeto CEP/CDERM – 011/07

Título: Portadores de Hanseníase: Estudo Clínico - epidemiológico da Hanseníase em Área Endêmica do Nordeste do Brasil

Pesquisador responsável: Ligia Regina Franco Sansigolo Kerr

Proposição do (a) relator (a):

- aprovação
 aprovação com pendências
 não aprovação

Data da primeira análise pelo CEP/CDERM – 12/09/2007

Data do parecer final do projeto pelo CEP/CDERM: 12/09/2007

PARECER

Com base na Resolução CNS/MS nº 196/96, que regulamenta a matéria, o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária Dona Libânia CDERM, em sua reunião realizada em 12/09/2007, decidiu APROVAR, de acordo com o parecer do(a) Relator(a), o projeto de pesquisa acima especificado, quanto aos seus aspectos éticos.

Observações:

1. Declaramos que a Dra. Maria Araci Pontes, membro deste CEP, não participou da avaliação do projeto em questão, abstendo-se de votar, para evitar conflito de interesses.
2. O(s) pesquisador(es) deve(m) apresentar relatório final da pesquisa ao CEP/CDERM.

Fortaleza, 13 de setembro de 2007.

Lucy Landim
Dra. Lucy Maria Landim Tavares
Vice-Coordenadora do CEP/CDERM

