



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

DELAIDE SAMPAIO DIAS LOURENÇO

**DETECÇÃO DA INFECCÃO SUBCLÍNICA DE *MYCOBACTERIUM LEPRAE* EM
MENORES DE QUINZE ANOS, CONTACTANTES DE HANSENIANOS,
FORTALEZA - CEARÁ**

FORTALEZA

2016

DELAIDE SAMPAIO DIAS LOURENÇO

**DETECÇÃO DA INFECÇÃO SUBCLÍNICA DE *MYCOBACTERIUM LEPRAE* EM
MENORES DE QUINZE ANOS, CONTACTANTES DE HANSENIANOS,
FORTALEZA – CEARÁ**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia. Área de concentração: Patologia.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Cristiane Cunha Frota.

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- L933d Lourenço, Delaide Sampaio Dias.
Detecção da infecção subclínica de *Mycobacterium leprae* em menores de quinze anos, contactantes de hansenianos, Fortaleza - Ceará / Delaide Sampaio Dias Lourenço. – 2016.
95 f. : il. color.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Programa de Pós-Graduação em Patologia, Mestrado em Patologia, Fortaleza, 2016.
Área de Concentração: Patologia.
Orientação: Profª. Dra. Cristiane Cunha Frota.
1. Hanseníase. 2. *Mycobacterium leprae*. 3. Imunocromatografia. 4. Mucosa Nasal. 5. Reação em Cadeia da Polimerase. I. Título.

CDD 616.998

DELAIDE SAMPAIO DIAS LOURENÇO

**DETECÇÃO DA INFECCÃO SUBCLÍNICA DE *MYCOBACTERIUM LEPRAE* EM
MENORES DE QUINZE ANOS, CONTACTANTES DE HANSENIANOS,
FORTALEZA - CEARÁ**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia. Área de concentração: Patologia.

Aprovada em: 18/02/2016.

BANCA EXAMINADORA

Cristiane Cunha Frota
Prof. Dra. (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Cibele Barreto Mano de Carvalho
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Max Victor Carioca Freitas
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Heitor de Sá Gonçalves
Centro de Dermatologia Dona Libânia / SESA - CE

A todos os participantes desse estudo, adultos, vítimas da hanseníase, e principalmente às crianças e adolescentes, que na sua inocência, sofrem com a família o preconceito diário frente a essa patologia.

A todos os professores, que me concederam as ferramentas necessárias para a realização desse trabalho.

Aos meus pais, meus primeiros mestres, cuja lição maior foi sempre respeitar o próximo.

Ao meu filho Lucas, que apesar dos seus afazeres, estava sempre disposto a dar sua contribuição.

Ao meu esposo Edivar, pela compreensão e apoio, em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, e por todas as oportunidades que Ele me tem concedido ao longo da minha existência.

Aos meus pais, Dionísio Gonçalves e Araci Sampaio, que me deram condições de buscar o conhecimento e tornar-me uma profissional realizada.

Ao meu filho Lucas, que embora em um ano de grandes desafios na sua vida escolar, muito me auxiliou.

Ao meu esposo Edivar Lourenço, pelo incentivo, companheirismo, e paciência durante todo esse período, dividido entre estudos e trabalho no hospital.

À minha irmã Degmar, por estar presente em todos os momentos, principalmente nos mais difíceis, torcendo pela minha vitória.

Aos meus irmãos Danilo e Dailton, pela preocupação com o meu bem estar.

À Aninha, minha amiga e fiel auxiliar de casa, pela dedicação e carinho.

À minha querida orientadora, Professora Doutora Cristiane Frota, grande exemplo de profissional, que acreditou na minha capacidade de realização, e que com sua simplicidade, sempre conduziu de forma leve todo o desenvolvimento desse estudo.

Ao Professor Doutor Paulo César de Almeida, que incansavelmente contribuiu com a construção dessa dissertação.

Aos Professores Doutores José Ajax e Cibele Barreto pelas contribuições valiosas na qualificação desse trabalho.

Aos Doutores participantes da banca examinadora: Heitor Gonçalves, Cibele Barreto, Max Victor, Paulo César de Almeida e Cristiane Frota.

À Universidade Federal do Ceará, que tornou possível a realização deste sonho – o Mestrado.

Ao CDERM, na pessoa do Doutor Heitor de Sá Gonçalves, que proporcionou recursos físicos e humanos para a realização desse projeto.

Ao CNPq, pelo apoio na aquisição dos insumos necessários à realização desse estudo.

À Coordenação do Mestrado, pelo acompanhamento durante toda essa jornada.

A todos os professores do Mestrado pela construção do saber.

Às secretárias do Mestrado em Patologia, Paula e Valéria, pelo apoio ao longo dessa caminhada.

Aos meus colegas do Laboratório de Micobactérias da UFC, Thales Alves e Gizele Almada, que muito me auxiliaram nas análises de PCR molecular, e Socorro, pela preparação do material de trabalho, e o cafezinho nos intervalos.

À Doutora Luana Nepomuceno, pesquisadora do Instituto Evandro Chagas, por ter colaborado com as análises de Sequenciamento desse estudo.

Aos meus colegas de Mestrado, turma 2014, pela amizade, reflexões, críticas e sugestões durante todo o curso, especialmente Joselito e Roberta.

Aos profissionais do Centro de Dermatologia Dona Libânia: César, Clébio, Márcia, Marina, Valmor, Socorro, Doutores Heitor Gonçalves, Araci Pontes, Irismar Silveira, Zilvanira, Mont'alverne, Gilva, Anchieta, Marcelo (in memoriam), Regina, Amanda, Suziane Franco, Cláudia, Virgínia e demais profissionais que contribuíram para a construção deste trabalho.

Aos meus colegas do Laboratório de Patologia Clínica, do Hospital de Messejana, em especial, minha chefe e amiga Doutora Rosélia Coelho, pela compreensão durante os meus momentos de ausência.

À bibliotecária Rosane Costa, pelo auxílio na formatação e revisão bibliográfica.

Aos amigos Josias Vale e Eliene Vale, pela contribuição durante a fase burocrática do projeto e apoio logístico.

A todos os demais que, de alguma forma, nos auxiliaram nesta jornada.

“Deixem as crianças vir a mim. Não lhes proíbam, porque o Reino de Deus pertence a elas. Eu garanto a vocês: quem não receber como criança o Reino de Deus, nunca entrará nele” (Lc 18, 16-17).

RESUMO

A hanseníase é uma doença infecto-contagiosa, causada pelo *Mycobacterium leprae*, bacilo intracelular obrigatório. Devido o aumento na incidência de casos novos em menores de 15 anos e ao potencial incapacitante da doença, principalmente em pacientes paucibacilares e com formas neurais, é necessário o emprego de ferramentas de detecção da presença do bacilo, visando ao diagnóstico no início da doença ou detecção de infecção subclínica em contactantes de casos. Este estudo teve como objetivo investigar a possibilidade de infecção subclínica nos contactantes ≥ 5 e < 15 anos de casos novos, detectados no Centro de Dermatologia Dona Libânia, no município de Fortaleza-Ceará. Participaram deste estudo, 69 casos índices e 101 contactantes menores de 15 anos. Até o momento, nenhum estudo buscou a detecção subclínica da infecção em contatos de casos novos de hanseníase, atendidos em uma Unidade de Referência. O material coletado foi analisado através de três técnicas: determinação do Índice Baciloscópico, de acordo com o Guia de Procedimentos Técnicos de Baciloscopia em Hanseníase do Ministério da Saúde-2010; detecção molecular de DNA de *M. leprae*, em secreção nasal, colhidas com *swabs* previamente umedecidos em tampão Tris-EDTA. A extração do DNA foi realizada utilizando o *Dneasy Blood and Tissue kit* Qiagen, mantido a -20°C , para posterior amplificação. Foram utilizados os iniciadores RLEP-R1 e RLEP-R2 para a região específica RLEP. A reação de PCR ocorreu em termociclador utilizando o kit *Ilustra™ Pure Taq Ready-to-go PCR beads* GE HEALTHCARE; análise de *ML-Flow*, teste imunocromatográfico para a detecção da IgM para PGL-1, na qual foi adotada a técnica de coleta do sangue total, fazendo-se uma punctura no dedo indicador esquerdo ou direito. Avaliando a positividade das três técnicas usadas no estudo, obtivemos frequência de 16,1% para PCR de DNA, 1,98% para Índice Baciloscópico na secreção nasal e 33,7% para *ML-Flow*. A PCR de DNA de *M. leprae* aliada à sorologia de anticorpos anti-PGL-1 se mostram como ferramentas sensíveis e específicas, podendo auxiliar no monitoramento dos contatos com maior risco de desenvolver a doença, principalmente na infância. A detecção do *M. leprae* na mucosa nasal reflete a presença do bacilo neste sítio, que pode tornar-se uma fonte de infecção ou transmissão. Esta informação aliada à investigação da soropositividade ao anti-PGL-1 reforçam o diagnóstico de infecção subclínica, inclusive com a possibilidade da presença do bacilo em outros sítios, como por exemplo, pele e/ou nervos.

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

ABSTRACT

Leprosy is an infectious disease caused by *Mycobacterium leprae*, obligate intracellular bacillus. Due to the increase in the incidence of new cases in juveniles under 15 years and the debilitating potential of the disease, especially in paucibacillary patients and neural forms, it is necessary to use detection tools of the presence of the bacillus, in order to diagnose the onset of the disease or subclinical infection detection contacts of cases. This study aimed to investigate the possibility of subclinical infection in contacts ≥ 5 and < 15 years of new cases, detected in Dona Libania Dermatology Centre, in Fortaleza-Ceara. Participated in this study, 69 index cases and 101 contacts under 15 years. Until now, no study sought subclinical detection of contacts of new leprosy cases treated at a Reference Unit. The collected material was analyzed using three techniques: determination of bacterial index, according to the Procedural Guidelines of Bacilloscopy Technical Leprosy of the Ministry of Health-2010; molecular detection of *M. leprae* DNA in nasal secretion, collected with pre-humidified swabs in Tris-EDTA buffer. The DNA extraction was performed using the *DNeasy Blood and Tissue Kit Qiagen*, held at -20°C , for subsequent amplification. The RLEP-R1 e RLEP-R2 primers were used for the specific region RLEP. The PCR reaction occurred in a thermocycler using the *kit Illustra™ Pure Taq Ready-to-go PCR beads GE HEALTHCARE*; ML-Flow analysis, immunoassay for the detection of IgM PGL-1, which was adopted collection technique of whole blood, making up a puncture on the right or left forefinger. Measuring the positivity of the three techniques used in the study, we obtained the frequencies of 16.1% for PCR DNA, 1.98% for bacterial index in nasal secretion and 33.7% for ML-Flow. The *M. leprae* DNA PCR combined with serology of anti-PGL-1 antibodies show how sensitive and specific tools, which can assist in monitoring contacts at greater risk of developing the disease, especially in childhood. The detection of *M. leprae* in the nasal mucosa reflects the presence of this site bacillus, which can become a source of infection or transmission. This information combined with the investigation of seropositivity anti-PGL-1 strengthen the diagnosis of subclinical infection, including the possibility of the presence of bacillus in other sites, for example, skin and/or nerves.

Keywords: Leprosy. *Mycobacterium leprae*. Immunochromatography. Nasal mucosa. Polymerase Chain Reaction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Distribuição da prevalência da hanseníase no mundo em 2012	22
Figura 2	– Prevalência da hanseníase por estado da Federação.....	23
Figura 3	– Coeficiente de detecção geral de casos de hanseníase e em menores de 15 anos, Ceará 2001 a 2013.....	25
Figura 4	– Regionais de Fortaleza com seus bairros.....	26
Figura 5	– Coloração de Ziehl-Neelsen. Bacilos Álcool-Ácido Resistentes corados com a fucsina (vermelho) agrupados em globias adjacentes a macrófagos (Ziehl-Neelsen <i>stain</i> x 1000).....	28
Figura 6	– Estrutura esquemática do envoltório celular do <i>Mycobacterium leprae</i>	29
Figura 7	– Estrutura circular esquemática do genoma do <i>Mycobacterium leprae</i>	30
Figura 8	– Representação da Imunidade Inata.....	32
Figura 9	– Representação da Imunidade Adquirida.....	33
Figura 10	– Classificação de Ridley e Jopling & aspectos bacteriológicos e imunológicos.....	36
Figura 11	– Resultados dos Índices Baciloscópicos, segundo Ridley & Jopling.....	37
Figura 12	– Fluxograma para captação de contactantes e ensaios laboratoriais.....	44
Figura 13	– Demonstração da coleta de raspado nasal.....	45
Figura 14	– Demonstração da coleta de sangue.....	46
Figura 15	– Representação de esfregaço contendo raspado nasal em lâmina.....	48
Figura 16	– Representação do teste <i>ML-Flow</i>	50
Figura 17	– Coloração de Ziehl-Neelsen. Bacilos Álcool-Ácido Rcorados com a fucsina (vermelho). (Ziehl-Neelsen <i>stain</i> x 1000).....	58
Figura 18	– Interpretação de resultados do teste de fluxo lateral <i>ML-Flow</i>	59
Figura 19	– Demonstração do gel de eletroforese exibindo as bandas.....	62

Figura 20 – Demonstração em gel de agarose de amostras inibidas pela não amplificação do Controle Interno da PCR do gene NRAMP.....	63
Figura 21 – Alinhamento por BLAST da região <i>M. leprae</i> RLEP3 com a amostra 19, sequenciamento realizado no equipamento ABI 3130 Genetic Analyze (Applied biosystems®) e alinhamento realizado com o programa BioEdi Sequence Alignment Editor.....	64
Figura 22 – Eletroferograma da amostra 19, evidenciando a qualidade do DNA e seu alinhamento com a sequência padrão <i>M. leprae</i> RLEP 3 (X17153 DNA) Programa Bio Edit Sequence Alignment Editor.....	65
Quadro 1 – Cálculo do IB médio do paciente. IB = Média aritmética dos IBs analisado: em cada esfregaço.....	48
Quadro 2 – Iniciadores para amplificação do DNA de <i>M. leprae</i> relativo a região RLEP 3.....	52

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Casos de hanseníase por distrito de residência informado, Fortaleza-Ceará, 2001 a 2015.....	26
Gráfico 2 – Taxa de detecção de casos de hanseníase/10.000 habitantes no município de Fortaleza, 2001 a 2014.....	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Distribuição dos casos com hanseníase, no CDERM, biênio 2014/2015.....	55
Tabela 2	– Distribuição dos contactantes segundo as características, CDERM, Fortaleza – Ceará, 2014/2015.....	57
Tabela 3	– Determinação do Índice Baciloscópico (IB) em amostras de <i>swab</i> nasal.....	58
Tabela 4	– Teste <i>ML-Flow</i> para detecção de anticorpos IgM anti-PGL-1, específicos para <i>M. leprae</i> em amostras de sangue, de contactantes menores de quinze anos de pacientes portadores de hanseníase.....	59
Tabela 5	– Associação entre o teste <i>ML-Flow</i> e as características dos contactantes, CDERM, Fortaleza – Ce, 2014/2015.....	60
Tabela 6	– Frequência da PCR convencional para detecção de <i>M. leprae</i> na secreção nasal de contactantes menores de quinze anos, incluindo-se todas as amostras, CDERM, Fortaleza – Ce, 2014/2015.....	61
Tabela 7	– Frequência da PCR convencional para detecção de <i>M. leprae</i> na secreção nasal de contactantes menores de quinze anos, excluindo-se as amostras inibidas e não realizadas.....	61
Tabela 8	– Quantificação do DNA extraído das 100 amostras de secreção nasal com medidas estatísticas de acordo com a inibição da PCR.....	64
Tabela 9	– Associação entre o teste RLEP PCR e as características dos contactantes, CDERM, Fortaleza – Ce, 2014/2015.....	66
Tabela 10	– Tabela de contingência entre o ensaio <i>ML-Flow</i> (anti-PGL-1) e RLEP PCR em <i>swab</i> nasal de contactantes de casos novos de hanseníase, diagnosticados no CDERM, 2014/2015.....	67
Tabela 11	– Tabela de contingência entre a positividade ao RLEP PCR e o ensaio <i>ML-Flow</i> (anti-PGL-1) e Índice Baciloscópico (IB), CDERM, Fortaleza - Ce, 2014/2015, excluindo-se as amostras de PCR inibidas.....	68
Tabela 12	– Tabela de contingência entre o ensaio <i>ML-Flow</i> (anti-PGL-1) e o Índice Baciloscópico (IB), CDERM, Fortaleza - Ce, 2014/2015.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP's	Áreas Particulares
BAAR	Bacilo álcool - ácido resistente
BB	Forma Boderline-Boderline
BCG	Bacillus Calmette – Guérin (vacina contra a tuberculose)
BL	Forma clínica Boderline-Lepromatoso
BLAST	Do inglês “ <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> ”
BSA	Albumina de soro bovino
BT	Forma Boderline-Tuberculoide
CDERM	Centro de Dermatologia Dona Libânia
CD4 ⁺	Linfócito T auxiliar, do inglês: “ <i>Cluster of differentiation</i> ” 4
CD8 ⁺	Linfócito T citotóxico, do inglês: “ <i>Cluster of differentiation</i> ” 8
Ce	Ceará
CEVEP	Comissão Executiva de Vigilância Epidemiológica
CLO	Clofazimina
DCs	Células dendríticas
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DPS	Sulfona sintética
EDTA	Ácido Etilenodiamino-tetracético
HIV	Vírus da imunodeficiência Adquirida, do inglês “ <i>Human Immunodeficiency Virus</i> ”
I	Forma clínica Indeterminada
IB	Índice Baciloscópico
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
IDO	Indoleamina 2 3 – dioxigenase
IFN - Y	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL - 2	Interleucina 2
IL - 4	Interleucina 4
IL - 5	Interleucina 5
IL - 6	Interleucina 6

IL - 10	Interleucina 10
IL - 12	Interleucina 12
IL - 13	Interleucina 13
IL - 17	Interleucina 17
IL - 22	Interleucina 22
iNOS	Óxido Nítrico Sintetase induzido
LAM	Lipoarabinomanana
LILR's	Receptores de leucócitos do tipo imunoglobulina
LL	Forma Lepromatosa, virchowiana
LM	Lipomanana
Mb	Megabase
MB	Forma Multibacilar
ML-Flow	Ensaio de fluxo lateral
<i>M. leprae</i>	<i>Mycobacterium leprae</i>
MS	Ministério da Saúde
NCBI	Do inglês “ <i>National Center for Biotechnology Informmation</i> ”
ND	Narina Direita
NE	Narina Esquerda
NRAMP	Do inglês “ <i>Natural Resistance Associated Macrophage Protein</i> ”
NT	Natural Trissacarídeo
OMS	Organização Mundial da Saúde
PB	Forma Paucibacilar
pb	Pares de base
PCR	Proteína C Reativa
PCR	Reação em cadeia de polimerase, do inglês: “ <i>Polymerase chain reaction</i> ”
PGL-1	Glicolípídeo fenólico 1
PIM	Fosfatidilinositol
PMN	Polimorfonucleares
PNL	Hanseníase (Lepra) neural pura
PQT	Poliqumioterapia
PRR	Receptores de reconhecimento de padrões
PUFA's	Ácidos graxos poli-insaturados
RFP	Rifampicina

RLEP3	Do inglês “ <i>repetitive element</i> ” da região 3
RNAm	Ácido Ribonucléico mensageiro
SER’s	Secretarias Executivas Regionais
SESA	Secretaria da Saúde do Ceará
sIL-6R	Receptor solúvel de interleucina 6
SIMLEP	Do inglês “ <i>Simulation Model for Leprosy</i> ”
SINAN	Sistema de Informação de Agravos e Notificação
SMS	Secretaria Municipal de Saúde
SNP	Do inglês “ <i>single nucleotide polymorphism</i> ”
SPSS	Do inglês “ <i>Statistical Package for the Social Sciences</i> ”
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TAM	Termo de Assentimento para o Menor
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCR	Receptores de células T
Th 1	Linfócitos T auxiliares 1, do inglês “ <i>T helper 1</i> ”
Th 2	Linfócitos T auxiliares 2, do inglês “ <i>T helper 2</i> ”
Th 17	Linfócitos T auxiliares 17, do inglês “ <i>T helper 17</i> ”
TLRs	Receptores <i>Toll-like</i>
TMM	Monomicolato trealose
TNF	Fatores de necrose tumoral
TT	Forma Tuberculoide
UBS	Unidade Básica de Saúde
UFC	Universidade Federal do Ceará
Vit. D	Vitamina D
VP ⁻	Valor Preditivo Negativo
VP ⁺	Valor Preditivo Positivo
WHO	<i>World Health Organization</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

μm	Micrômetro
%	Porcentagem
β	Beta
o	Orto
α	Alfa
Υ	Gama
μl	Microlitro
μM	Micromol
®	Marca Registrada
nm	Nanômetro
ml	Mililitro
mM	Milimol
ng	Nanograma
°C	Graus Centígrados
p	p de Quiquadrado ou p de Razão de Verossimilhança
k	Índice de concordância (kappa)
E	Especificidade
S	Sensibilidade

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	Aspectos Gerais.....	21
1.2	Epidemiologia.....	22
1.2.1	Hanseníase no mundo.....	22
1.2.2	Hanseníase no Brasil.....	23
1.2.3	Hanseníase no Ceará.....	24
1.2.4	Hanseníase em Fortaleza.....	25
1.3	<i>Mycobacterium leprae</i>.....	27
1.3.1	Aspectos Morfológicos e Fisiológicos.....	27
1.3.2	Aspectos Genéticos.....	29
1.3.3	Aspectos Imunológicos.....	31
1.4	Transmissão.....	34
1.5	Classificação Clínica e Operacional.....	35
1.6	Diagnóstico.....	37
1.7	Tratamento.....	39
2	JUSTIFICATIVA.....	41
3	OBJETIVOS.....	42
3.1	Objetivo Geral.....	42
3.2	Objetivos específicos.....	42
4	METODOLOGIA.....	43
4.1	Tipo e local de estudo.....	43
4.2	Aspectos éticos.....	43
4.3	Critérios de inclusão e exclusão.....	43
4.4	População de estudo.....	44
4.5	Coleta de raspado nasal.....	45
4.6	Punção sanguínea da polpa digital.....	46
4.7	Técnicas de Análises.....	47
4.7.1	Baciloscopia.....	47
4.7.2	<i>ML-Flow</i>.....	49
4.7.3	PCR.....	51
4.7.4	Sequenciamento.....	52

4.8	Análise estatística.....	53
5.0	RESULTADOS.....	54
5.1	Caracterização dos casos.....	54
5.2	Caracterização dos contactantes.....	56
5.3	Análise da baciloscopia de <i>swab</i> nasal, para detecção do <i>M. leprae</i> (IB).....	58
5.4	Ensaio <i>ML-Flow</i>	59
5.4.1	Associação da soropositividade do teste <i>ML-Flow</i> em relação a faixa etária dos contactantes, sexo, classificação operacional do caso índice, aglomeração e cicatriz vacinal (TABELA 5).....	60
5.5	Amplificação da região RLEP3 específica do <i>M. leprae</i>	61
5.5.1	Associação da sensibilidade da PCR em relação a faixa etária dos contactantes, sexo, classificação operacional do caso índice, aglomeração e cicatriz vacinal.....	65
5.6	Associação da positividade do teste <i>ML-Flow</i> em relação a PCR convencional para o <i>M. leprae</i>	66
5.7	Associação da positividade da RLEP PCR em relação ao <i>ML-Flow</i> e ao Índice Baciloscópico.....	67
5.8	Associação da positividade do teste <i>ML-Flow</i> e o Índice Baciloscópico em secreção nasal.....	68
6	DISCUSSÃO.....	69
7	CONCLUSÕES.....	76
	REFERÊNCIAS.....	77
	APÊNDICE A – INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS.....	87
	ANEXOS.....	91

1 INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos Gerais

Os estudos sobre hanseníase são milenares e em meados de 1800 surgiram os trabalhos pioneiros de Daniel Danielssen, que acreditava ser uma doença hereditária (TAN; GRAHAM, 2008). É relatada a detecção de DNA de *Mycobacterium leprae* em múmias humanas de nove mil anos em Israel (HERSHKOVITZ *et al.*, 2008). Armauer Hansen, médico norueguês, a partir de suas pesquisas, caracterizou a hanseníase como uma doença infecciosa. Em 1873, evidenciou-se a presença de microrganismos em tubérculos hansênicos, posteriormente denominados *Mycobacterium leprae* (TAN; GRAHAM, 2008). No Brasil, a partir de 1970, a doença recebeu o nome de seu descobridor, passando a ser conhecida como Hanseníase (BRASIL, 2008).

A hanseníase é uma doença infecto-contagiosa causada pelo *M. leprae*, bacilo intracelular obrigatório com tropismo por macrófagos e células de Schwann, somente encontradas nos nervos periféricos (BRITTON; LOCKWOOD, 2004; PINHEIRO *et al.*, 2011). Essa doença afeta frequentemente a mucosa nasal e pode acometer nervos, independente da forma clínica, mesmo antes do aparecimento de lesões na pele ou em outras partes do corpo (BRAZ, 2010).

Essa enfermidade é influenciada por vários fatores: genética do hospedeiro, ambiente, estado nutricional, vacinação com BCG, grau de exposição ao *M. leprae* (MORAES *et al.*, 2006). A resposta imunológica é de fundamental importância para a defesa do organismo frente à exposição ao bacilo. A hanseníase caracteriza-se por apresentar alta infectividade e baixa patogenicidade, sendo a maioria da população, mais de 95% dos indivíduos, naturalmente imune (TALHARI; NEVES, 1997; VAN BRAKEL, 2000).

A doença continua sendo um problema grave de Saúde Pública nos países em desenvolvimento. Na América Latina, o Brasil é o único país que não atingiu a meta de eliminação, dada pela redução do coeficiente de prevalência a menos de um caso a cada dez mil habitantes (IMBIRIBA *et al.*, 2008). Durante séculos a inexistência de terapêutica eficaz contribuiu para a permanência dessa doença. Essa enfermidade é uma das mais importantes causas de invalidez nos países em desenvolvimento, principalmente quanto mais tardio for o diagnóstico e tratamento. Além disso, o estigma ou preconceito social que a ela se associa, contribui para o agravamento do problema (SCOLLARD *et al.*, 2006).

Para o enfrentamento da eliminação dessa doença, é fundamental a utilização de

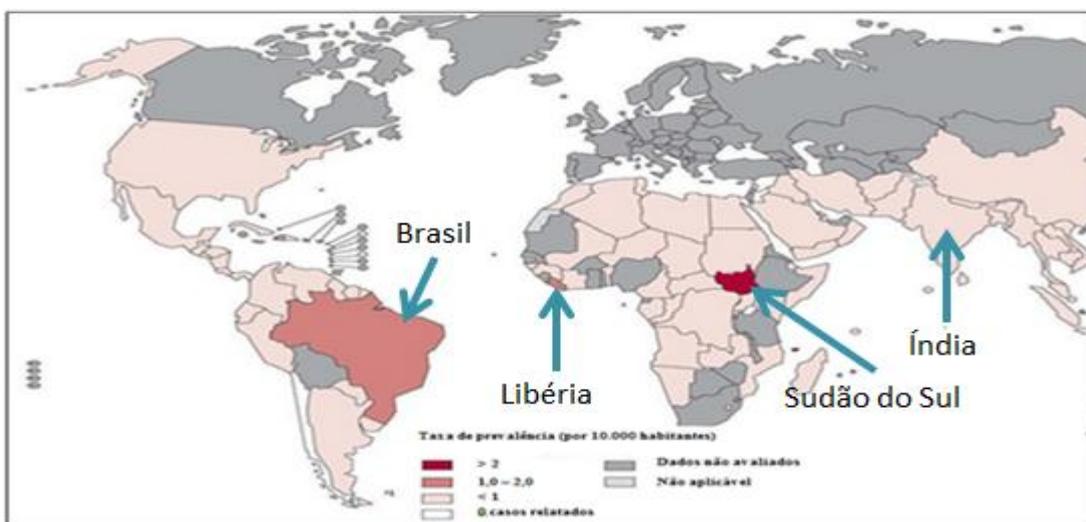
ferramentas e estratégias disponíveis, que já obtiveram sucesso em alguma localidade. O Ministério da Saúde manteve o compromisso de eliminação da hanseníase como problema de saúde pública até 2015, ou seja, alcançar menos de 1 caso por 10.000 habitantes (BRASIL, 2013). Infelizmente, essa meta não foi atingida. Porém, hoje, o coeficiente de prevalência é considerado como principal indicador de eliminação da taxa de detecção anual de casos novos.

1.2. Epidemiologia

1.2.1. Hanseníase no mundo

Em 2000, a Organização Mundial da Saúde declarou que a hanseníase tinha sido eliminada como problema de saúde pública em escala global. No entanto, de acordo com relatórios oficiais vindos de 105 países e territórios ao longo de 2012, a prevalência global situou-se em 181.941 casos, enquanto o número de casos novos detectados durante 2011 foi de 219.075 (WHO, 2012). De acordo, com a figura 1, a eliminação da hanseníase foi alcançada na maioria dos países que a apresentavam no passado como doença endêmica. O problema agora está restrito a poucos países em que a eliminação no nível estadual e municipal ainda está sendo procurada, além de focos de alta endemicidade que ainda permanecem em Angola, Brasil, República Centro Africano, Índia, Madagascar, Nepal e República Unida da Tanzânia.

Figura 1: Distribuição da prevalência da hanseníase no mundo em 2012



Fonte: WHO, 2012.

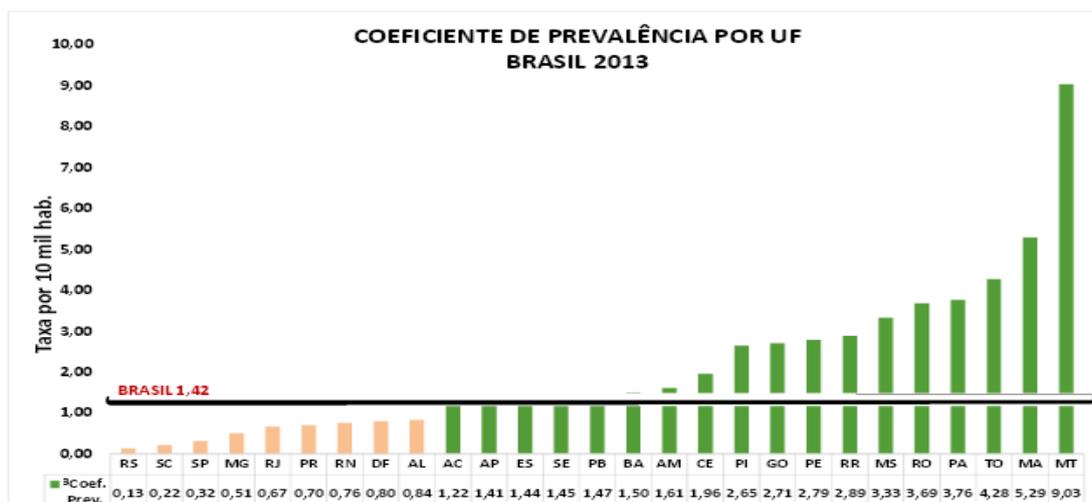
1.2.2. Hanseníase no Brasil

O Brasil ocupa o segundo lugar no mundo em número absoluto de casos de hanseníase, sendo o primeiro lugar das Américas (WHO, 2011). A doença é endêmica em todo o território nacional, embora com distribuição irregular. As regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste são as que apresentam as maiores taxas de detecção (incidência) e prevalência da doença.

O Brasil teve 24.612 novos casos de hanseníase em 2014. Na população menor de 15 anos, foram identificados 1.793 novos casos. A medição, neste caso, é considerada estratégica porque uma criança doente sinaliza que há um adulto não tratado transmitindo hanseníase, indicando a endemicidade do bacilo na população (BRASIL, 2015). Esses dados indicam uma incidência de 12,14 por 100 mil habitantes. Em 2003, o Brasil registrou 51.900 casos de hanseníase, uma incidência de 29,37 por 100 mil habitantes. Apesar da melhora, o Brasil, em números absolutos, como já foi referido anteriormente, é o segundo país com mais casos novos por ano no mundo, atrás apenas da Índia, que tem aproximadamente 150 mil casos novos ao ano (BRASIL, 2012).

A prevalência da doença no país, que inclui casos novos e o total de pessoas com casos já contabilizados em anos anteriores e em tratamento, aumentou de 2013 para 2014. Em 2013, o índice foi de 1,42 casos por 10 mil habitantes, enquanto em 2014, os dados indicam 1,56 casos por 10 mil habitantes (Figura 2) (BRASIL, 2015).

Figura 2: Prevalência da hanseníase por Estado da Federação



Fonte: SINAN/SVS-MS, 2014.

Desde 2007, o Brasil utiliza e prioriza como indicador de acompanhamento da endemia o coeficiente de casos de hanseníase em menores de 15 anos. Os dados do Ministério da Saúde do Brasil revelam a necessidade de focalizar e agilizar o diagnóstico da hanseníase em menores de 15 anos, que podem ser os contactantes de casos ainda não assistidos e não identificados pelo sistema de saúde.

Para fins operacionais, é considerado contato intradomiciliar toda e qualquer pessoa que resida ou tenha residido com o doente de hanseníase nos últimos 5 (cinco) anos (BRASIL, 2010).

Algumas das estratégias adotadas pelo Ministério da Saúde para tentar eliminar a hanseníase são ampliar a oferta de serviços de diagnóstico e tratamento e intensificar a busca de casos em crianças nas áreas com maior incidência da doença, como Mato Grosso, Maranhão, Tocantins, Rondônia, Pará e Goiás (BRASIL, 2014).

A doença é considerada extinta em estados como o Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Paraná, Rio Grande do Norte e Alagoas, além do Distrito Federal (BRASIL, 2014).

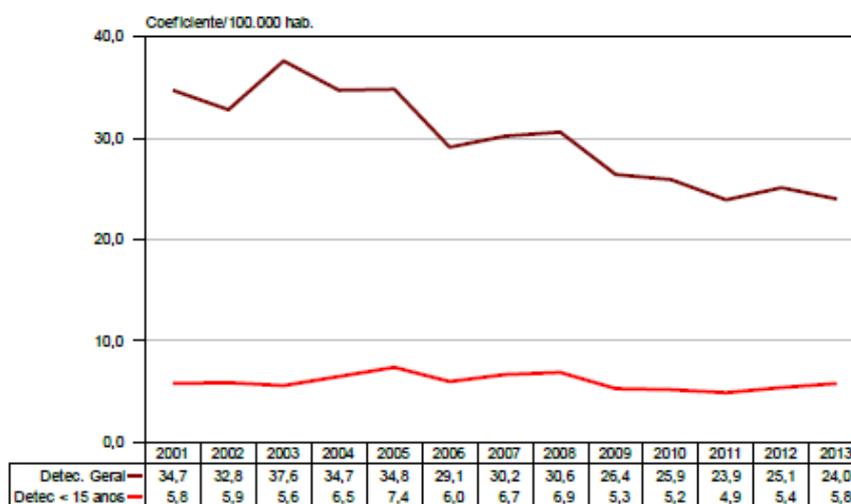
1.2.3. Hanseníase no Ceará

Ao analisar a evolução da endemia hanseníase no Ceará, percebe-se uma tendência de redução. Essa afirmação baseia-se diante dos coeficientes de detecção.

Dados da Secretaria da Saúde do Ceará mostram que no período de 2001 a 2013 as taxas de detecção foram flutuantes. No ano de 2001 foram notificados 2.619 casos de hanseníase, com uma taxa de detecção de 34,7/100.000 habitantes, enquanto que em 2013 foram notificados 2.069 casos novos, com uma taxa de detecção de 24/100.000 habitantes. Houve uma redução de 35%, aproximadamente, na taxa de detecção geral. Ainda assim, segundo parâmetros da OMS/MS, essa taxa é considerada muito alta, e o Ceará permanece em 4º lugar no Nordeste, só superado pelos estados do Maranhão, Piauí e Sergipe. No *ranking* nacional ocupa o 13º lugar em número de casos novos da doença (CEARÁ, 2014).

Como mostrado na figura 3, não houve variação no coeficiente de detecção em menores de 15 anos no período de 2001 a 2013. Em 2013, o coeficiente de detecção nessa faixa etária foi 5,8/100.000 habitantes, o que é considerado muito alto. Esse achado pode indicar a existência de focos de transmissão ativos e manutenção da cadeia de transmissão da doença (CEARÁ, 2014).

Figura 3: Coeficiente de detecção geral de casos de hanseníase e em menores de 15 anos, Ceará, 2001 a 2013



Fonte: SESA – CE, 2014.

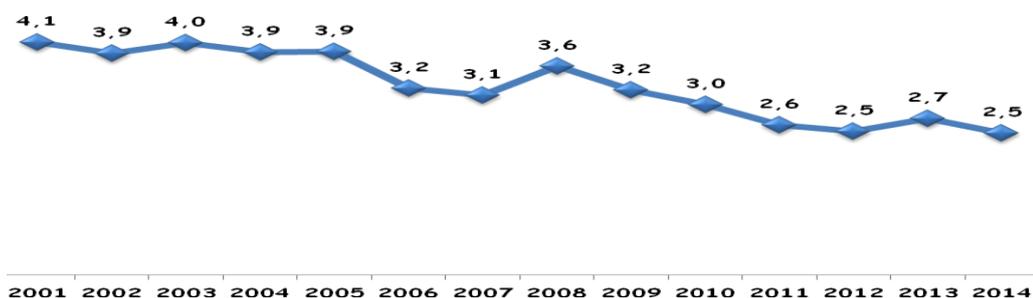
1.2.4. Hanseníase em Fortaleza

O município de Fortaleza é dividido em sete Secretarias Executivas Regionais (SER's): I, II, III, IV,V, VI e Centro. Cada SER é subdividida em várias Áreas Particulares (AP's), de acordo com a figura 4. A SER V é responsável pelo maior número de casos de hanseníase em Fortaleza (Gráfico 1) (MONTEZUMA, 2011).

A SER V possui 570 mil habitantes e abrange 18 bairros: Conjunto Ceará, Siqueira, Mondubim, Conjunto José Walter, Granja Lisboa, Granja Portugal, Bom Jardim, Genibaú, Canindezinho, Vila Manoel Sátiro, Parque São José, Parque Santa Rosa, Maraponga, Jardim Cearense, Conjunto Esperança, Presidente Vargas, Planalto Ayrton Senna e Novo Mondubim. Segundo a Secretaria Municipal do Desenvolvimento Econômico (FORTALEZA, 2015), o Índice de Desenvolvimento Humano (IDH), nessa regional, varia de 0,1352 a 0,3953, semelhante aos países mais pobres da África, como por exemplo, Niger, cujo IDH é 0,348.

A capital cearense registrou 635 casos novos de hanseníase em 2014, com um coeficiente de detecção geral igual a 2,5/10.000 habitantes, considerado como um parâmetro muito alto pela Secretaria da Saúde do Ceará (Gráfico 2) (BRASIL, 2015).

Gráfico 2 - Taxa de detecção de casos de hanseníase/10.000 habitantes no município de Fortaleza, 2001 a 2014.



Fonte: SINAN/SMS/CEVEP, 2015.

1.2. *Mycobacterium leprae*

Pertence ao gênero *Mycobacterium*, a ordem Actinomycetales e à família Mycobacteriaceae (van INGEN *et al.*, 2012).

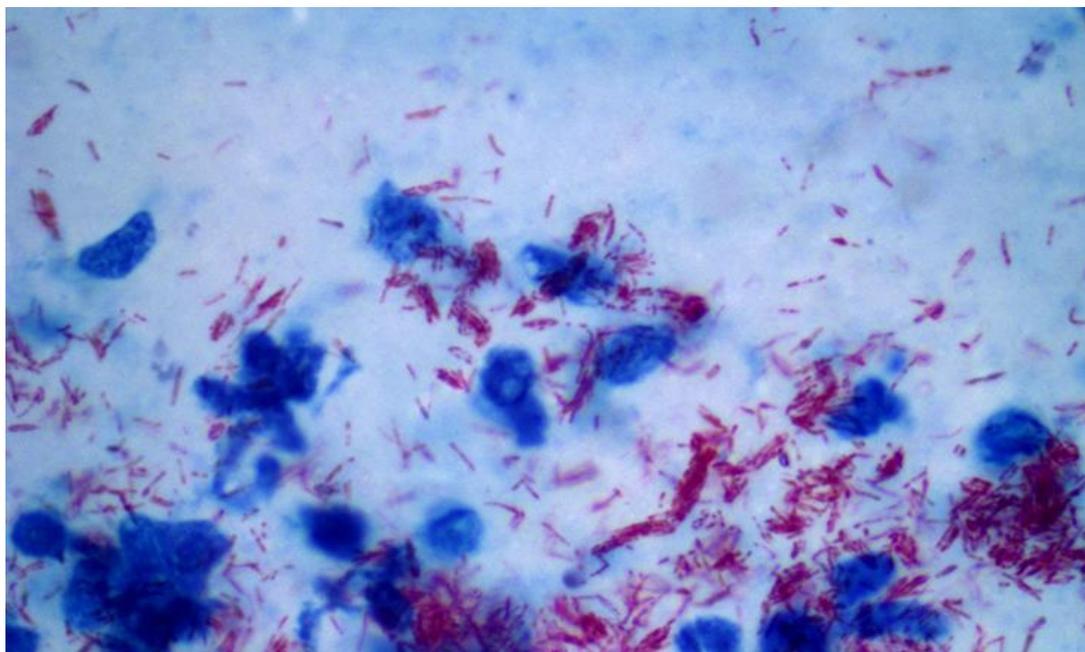
O gênero *Mycobacterium* compreende até a data 29 de setembro de 2015, 172 espécies (EUZÉBY, 1997), que podem ser classificadas como micobactérias de crescimento rápido ou de crescimento lento.

O *M. leprae* tem crescimento lento, fazendo divisão binária, e a cada 12 a 21 dias, é que as globias podem ser visualizadas, sendo a única espécie do gênero que não é cultivável *in vitro* (GRANGE, 1996). Todavia, o seu cultivo pode ser observado em tatus (*Dasypus novemcinctus*) ou no coxim plantar de camundongos (SCOLLARD *et al.*, 2006).

1.3.1. Aspectos Morfológicos e Fisiológicos

Quanto à morfologia, o *M. leprae* consiste em uma bactéria intracelular, imóvel, não formadora de esporos e microaerófila. Cora-se em vermelho pela fucsina e é considerada um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR), ou seja, não se descora pela lavagem com solução álcool-ácida. Ao microscópio, apresenta-se com formato de bacilos ligeiramente curvos ou retos de 1,5 a 8µm de comprimento e 0,2 a 0,5µm de largura (RESS, 1985; SCOLLARD *et al.*, 2006).

Figura 5: Coloração de Ziehl-Neelsen. Bacilos álcool-ácido resistentes corados com a fucsina (vermelho) agrupados em globias adjacentes a macrófagos (Ziehl-Neelsen stain x 1000)



Fonte: Próprio autor (2015). Fotomicrografia de lâmina cedida pelo Laboratório CDERM, IB = 6.

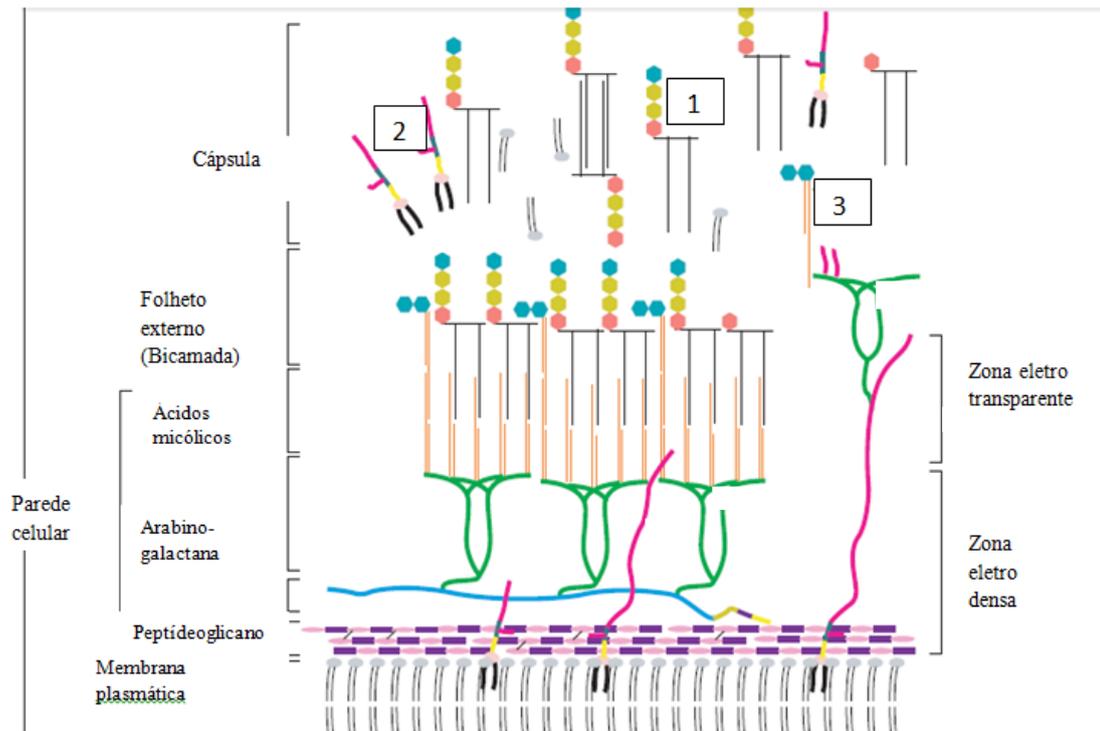
A parede celular do *M. leprae* possui cerca de 20nm de espessura e sua estrutura química é constituída de peptidoglicanos entrelaçados e ligados a cadeias polissacarídicas, que servem de suporte para os ácidos micólicos. Estes são responsáveis pela natureza hidrofóbica da micobactéria, sendo importantes para a sobrevivência, crescimento e patogenicidade da mesma. O seu papel na permeabilidade da parede celular contribui para a sua resistência intrínseca aos antibióticos, desidratação e ao dano químico (SCHERR & NGUYEN, 2009).

A camada de arabinogalactano é esterificada em ácidos micólicos ligados covalentemente a camada de peptidoglicano. O conjunto desempenha papel na imunogenicidade e permeabilidade aos antibióticos (SCHERR & NGUYEN, 2009).

A camada externa é composta por polissacarídeos livres, fosfolipídeos e glicolipídeos, tais como lipoarabinomanana (LAM), lipomanana (LM), monomicolato trealose (TMM), assim como monosídeos fosfatidilinositol (PIM). Todos estão relacionados em processos importantes com o sistema imune do hospedeiro (SCHERR & NGUYEN, 2009).

Além da parede celular, o bacilo apresenta uma estrutura mais externa, denominada cápsula lipídica. O lipídeo dominante na parede celular que dá especificidade imunológica ao *M. leprae* é o glicolipídeo fenólico 1 (PGL-1) (VISSA & BRENNAN, 2001).

Figura 6: Estrutura esquemática do envoltório celular do *Mycobacterium leprae*



Fonte: VISSA; BRENNAN, 2001. Esse modelo mostra que a membrana plasmática é coberta por uma camada de parede celular, formada por peptidoglicano, arabinogalactano e um folheto exterior composto por ácidos micólicos. A camada arabinogalactana – peptidoglicano forma a área eletro-densa. A bicamada forma a área de pseudo-elétrons transparentes. Uma cápsula presumivelmente composta em grande parte de glicolipídios, fosfolipídios e lipoglicanos envolvem a bactéria. 1: PGL-1 (Glicolipídeo fenólico 1), 2: PIMs (Monossídeos fosfatidilinositol), 3: TMM (Monomicolato trealose).

1.3.2. Aspectos genéticos

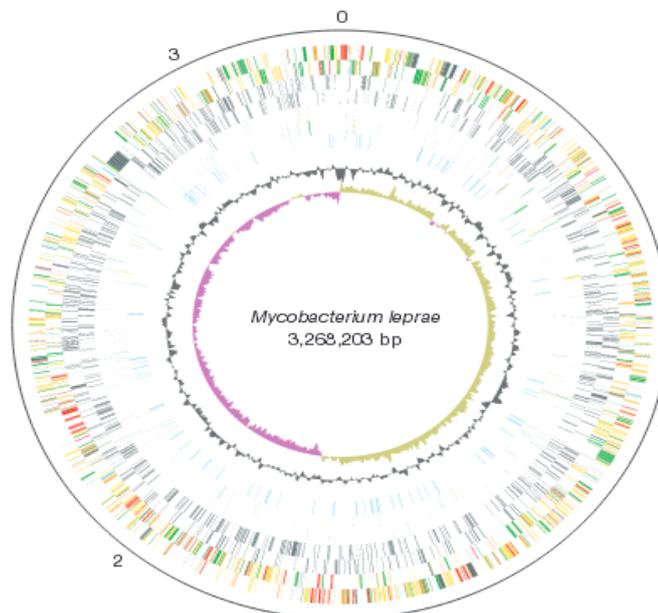
O genoma completo do *M. leprae* foi sequenciado, pela primeira vez, por Cole e colaboradores em 2001.

Os valores do tamanho do genoma do *M. leprae* (3,27 Mb) e a proporção de G e C (57,8%) são muito inferiores, quando comparados ao genoma do *M. tuberculosis* (4,41 Mb e 65,6%), respectivamente (COLE *et al.*, 2001).

A constituição do genoma do *M. leprae* é de: 49,5% de genes codificadores de proteínas; 27% de pseudogenes, considerados como inativos; 23,5% não parecem ser de codificação, podendo corresponder a sequências reguladoras de genes ou mesmo restos de genes mutados (COLE *et al.*, 2001).

A taxa de crescimento lento das micobactérias é justificada pela complexidade da parede celular e elevada biossíntese lipídica (BAEK *et al.*, 2011), e sua incapacidade de crescer *in vitro*, pode ser explicada pela evolução reductiva extensa, com quase metade de seu genoma ser ocupado por pseudogenes (1133), diferente do *M. tuberculosis*, que apresenta em seu genoma, apenas 6 pseudogenes (MONOT *et al.*, 2005).

Figura 7: Estrutura circular esquemática do genoma do *Mycobacterium leprae*



Fonte: COLE *et al.*, 2001. Estrutura circular indicando a posição e orientação dos genes conhecidos, pseudogenes e sequências repetitivas. De fora para dentro: círculos 1 e 2 (sentido horário e anti-horário) os genes das fitas – e +, respectivamente; círculos 3 e 4, pseudogenes; 5 e 6, genes específicos do *M. leprae*; 7, sequências de repetição; 8, conteúdo G + C; 9 $(G + C) / (G - C)$ desvio do conteúdo G/C. Os genes são codificados por cores representando categorias funcionais. A escala em Mb é indicada pelos números (0 a 3) do lado de fora do genoma.

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. O tamanho pequeno do genoma do *M. leprae* foi, principalmente, devido a eventos de

recombinação entre estas sequências repetitivas. O RLEP, do inglês “repetitive element” 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, 1990).

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).

1.3.3. Aspectos Imunológicos

A hanseníase é uma doença cuja patogenia está vinculada à resposta imunológica. Esta, por sua vez, está associada com o desenvolvimento de formas clínicas distintas, onde o predomínio da resposta celular está relacionado à forma clínica mais branda da patologia (tuberculóide) e a ausência da resposta celular, com a forma clínica mais grave (virchowiana) (RIDLEY; JOPLING, 1966).

A imunidade inata combinada com a baixa virulência do *M. leprae*, está associada à resistência para o desenvolvimento da hanseníase (SCOLLARD *et al.*, 2006). Além de barreiras mecânicas e químicas, a resposta imune inata consiste em células, tais como os leucócitos polimorfonucleares (PMN) e da linhagem monócito/macrófago (de SOUZA *et al.*, 2015) (Figura 8).

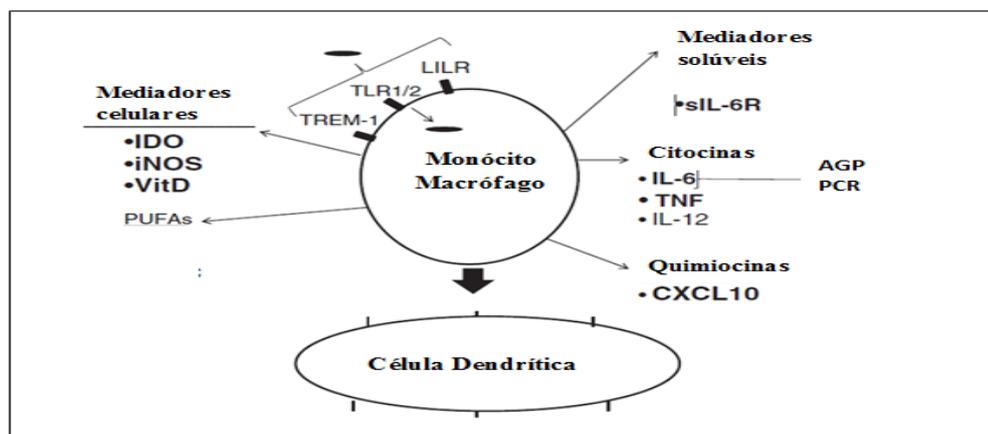
Em um primeiro momento, receptores das células do hospedeiro reconhecem padrões moleculares das micobactérias, os chamados receptores de reconhecimento de padrões (PRR), como por exemplo, os receptores Toll-like-I (TLRs), essenciais para o reconhecimento de patógenos pelos macrófagos e pelas células dendríticas (DCs) durante a resposta da imunidade inata (BRIGHTBILL *et al.*, 1999).

As células fagocitárias responsáveis pela resposta imunológica inata ao *M. leprae* são: neutrófilos, macrófagos e DCs. Estas últimas são também responsáveis pela apresentação de antígenos (IYER, 2009).

As DCs são as primeiras células a capturarem o *M. leprae* no local da infecção. Elas produzem IL-10 e IL-12, sendo fundamentais no direcionamento da resposta Th 1 ou Th 2 contra o *M. leprae*. As DCs oriundas de macrófagos têm apresentado alta efetividade na apresentação de antígenos (MIRA *et al.*, 2004; MODLIN, 2010).

O sistema complemento também faz parte da imunidade inata e possui as vias de ativação clássica, alternativa e de lecitina. Vários mecanismos atuam na defesa do organismo contra o *M. leprae*, tais como, a opsonização, a formação de imunocomplexos, o recrutamento de leucócitos e a resposta inflamatória. Vários experimentos corroboram para confirmar que o sistema complemento pode ser ativado por complexos imunes circulantes, isolados do soro de pacientes com hanseníase (NOORDEN, 1991), sendo que foram observados, principalmente nas formas LL, grande quantidade de imunocomplexos (BROWNE, 1970; CALLEGARO FILHO *et al.*, 2010).

Figura 8: Representação da Imunidade Inata



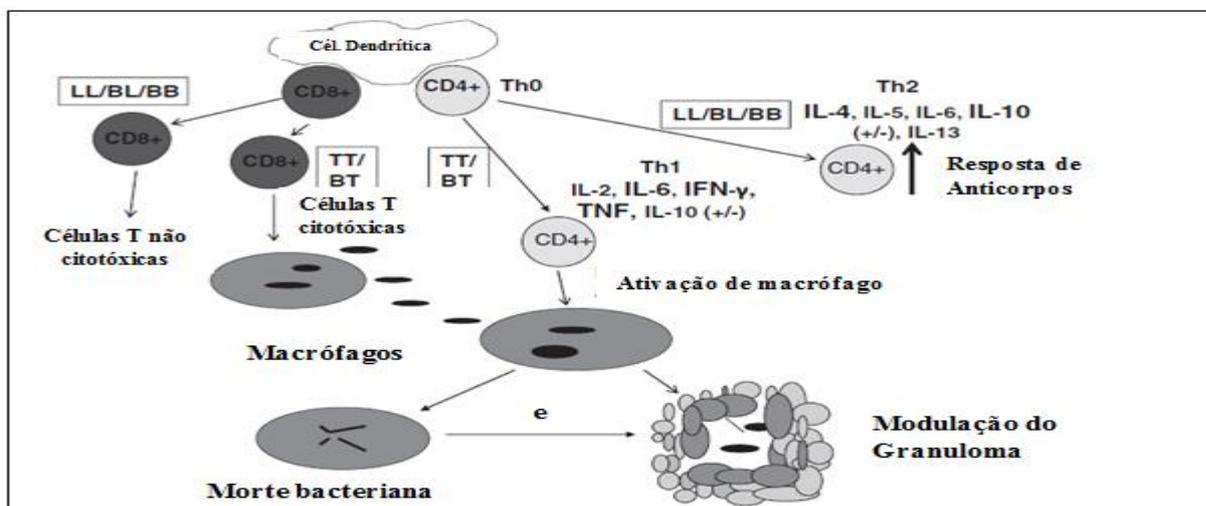
Fonte: Adaptado de de SOUZA *et al.*, 2016. Biomarcadores de resposta inata ao *M. leprae*: AGP: A Alfa 1 glicoproteína ácida, IDO: Indoleamina 2,3-dioxigenase; IL-6: Interleucina 6; IL-12: Interleucina 12; iNOS: Óxido nítrico sintetase induzido; LILR's: receptores de leucócitos do tipo imunoglobulina; PCR: Proteína C Reativa; PUFA's: Ácidos graxos poli-insaturados; sIL-6R: Receptor solúvel de interleucina-6; TLR: Toll-like receptor; TNF: Fatores de necrose tumoral; TREM-1: Receptor de desencadeamento solúvel expresso em células mielóides 1; Vit D: Vitamina D.

A resposta imune adquirida (Figura 9) começa com células dendríticas (DC's), potentes apresentadoras de antígenos. Estas funcionam como uma ponte entre os braços da imunidade inata e adquirida, migrando do local da infecção e apresentando o antígeno às células T. Dependendo do seu grau de maturação, as DC's podem estimular as células T e estas se diferenciam em subpopulações efetoras distintas $CD4^+$ e $CD8^+$ (de SOUZA *et al.*, 2015).

Células T $CD4^+$ são dominantes em ambas as fases de indução e efetoras da resposta imune. Na interação de antígenos por seus receptores de células T (TCR), elas podem se diferenciar para (a) T *helper* 1 (Th 1), secretando interleucina-2 (IL-2) e interferon gama (IFN- γ), resultando na ativação macrófagica; ou (b) T *helper* 2 (Th 2), secretando interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5) e interleucina-13 (IL-13), que estimula a produção de anticorpos e inibe a ativação de macrófagos, (LIPSCOMB e MASTEN, 2002) ou (c) em 17 células T *helper* (Th 17) que produz interleucina-17 (IL-17) e interleucina-22 (IL-22); estas estão envolvidas na inflamação e autoimunidade (HARRINGTON *et al.*, 2006).

Resumindo, a imunidade adaptativa é dividida em celular ou do tipo 1, e humoral ou do tipo 2. A capacidade dos linfócitos auxiliares ($CD4^+$), também conhecidos como linfócitos T *helper* (Th), em induzir as respostas celular ou humoral está relacionada com os tipos de citocinas secretadas e proporcionará o desenvolvimento das respostas Th 1 ou Th 2. O predomínio da imunidade celular, frente à infecção pelo bacilo, pode influenciar a evolução da doença para a forma clínica TT, enquanto a imunidade humoral está associada à forma clínica LL (MORAES *et al.*, 2006).

Figura 9: Representação da Imunidade Adquirida



Fonte: Adaptado de de SOUZA *et al.*, 2016.

1.4. Transmissão

A principal fonte de infecção do *M. leprae* é o ser humano. Um outro importante reservatório nas Américas são os tatus (*Dasypus novemcinctus*), mais conhecidos como tatu-galinha (TRUMAN *et al.*, 2011; FROTA *et al.*, 2012).

A transmissão da hanseníase ocorre por ocasião de contato íntimo e duradouro com o doente que apresenta a forma multibacilar (MB), e que, estando sem tratamento, elimina o bacilo por meio das vias respiratórias (secreções nasais, tosses, espirros), podendo assim, infectar outras pessoas suscetíveis (NOORDEEN, 1994).

Vale salientar que o bacilo de Hansen tem capacidade de infectar grande número de pessoas, mas poucas pessoas adoecem, ou seja, é de alta infectividade, mas baixa patogenicidade.

O ambiente também parece exercer papel importante na transmissão do *M. leprae* (LAVANIA *et al.*, 2008). Segundo esse autor, análises de amostras do solo do peridomicílio de hansenianos em região endêmica da Índia, detectaram a presença de DNA e RNAm de *M. leprae*.

Do mesmo modo, foi relatada a presença do DNA do *M. leprae* na água, em estudos realizados na Indonésia (MATSUOKA *et al.*, 1999).

Outros estudos, utilizando a reação em cadeia de polimerase (PCR), detectaram a presença do *M. leprae* na pele de pacientes hansenianos, não tratados, bem como na secreção nasal de indivíduos multibacilares (JOB *et al.*, 2008; ARAÚJO *et al.*, 2012).

Diversos estudos (de WIT *et al.*, 1993a; ALMEIDA *et al.*, 2004; KLATSER *et al.*, 1993; PATROCINIO *et al.*, 2005) utilizando PCR de DNA de *M. leprae* demonstraram que a cavidade nasal está envolvida no transporte e disseminação de *M. leprae*, sendo esta, a principal via de entrada dos bacilos.

O risco relativo de desenvolver hanseníase em contatos domiciliares é de 8 a 10 vezes para a forma lepromatosa e 2 a 4 para a forma tuberculóide (PINHEIRO *et al.*, 2011).

A ocorrência de hanseníase em crianças pode ser considerada um indicador de prevalência da doença na população geral e sua detecção é importante para determinar o nível de transmissão. Essa enfermidade é considerada própria dos adultos, pelo longo período de incubação. No entanto, as crianças também são suscetíveis a essa doença. Portanto, em áreas endêmicas e quando ocorrem casos na família, o risco de crianças adoecerem aumenta (IMBIRIBA *et al.*, 2008).

No Brasil, o objetivo da política de controle da hanseníase é diagnosticar, tratar e

curar todos os casos. Quando a doença é confirmada em um indivíduo, o serviço de saúde local examina também os parentes e as pessoas com quem o portador tem ou teve contato para identificar outros casos existentes. Dessa forma, é possível reduzir as fontes de transmissão (BRASIL, 2010).

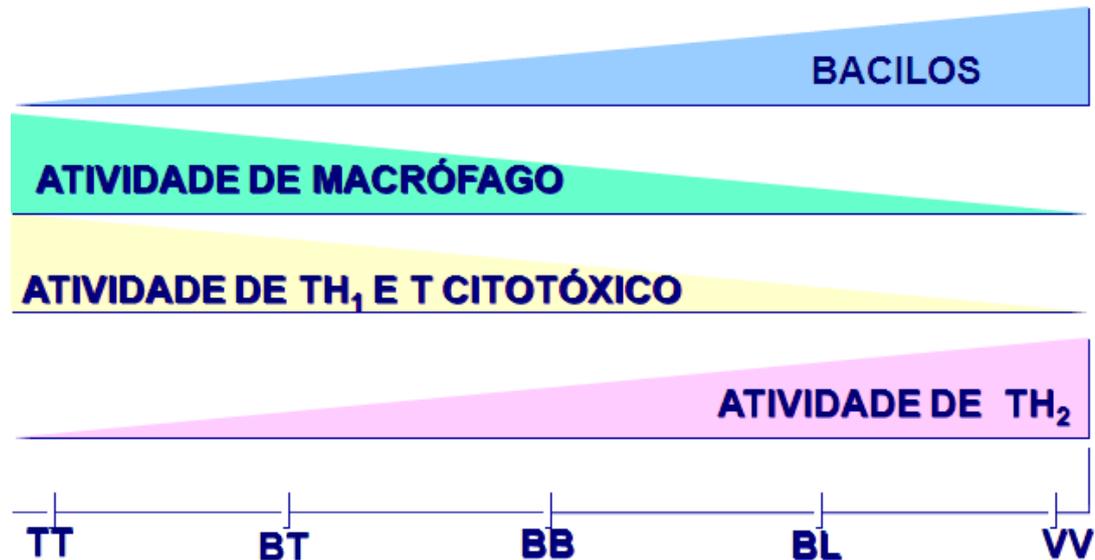
1.5. Classificação Clínica e Operacional

A hanseníase é uma doença que pode evoluir de maneiras diversas, dependendo da resposta imunológica do hospedeiro. A doença expressa uma ampla apresentação clínica, sendo classificada de acordo com os parâmetros imunopatológicos e de carga bacilar (BRASIL, 2010) que podem ser classificadas segundo: a) Classificação de Madri (CONGRESSO INTERNACIONAL DE LEPROLOGIA, 1953 *apud* SOUZA, 1997), b) Classificação de Ridley & Jopling (RIDLEY E JOPLING, 1966) e c) Classificação operacional adotada pela OMS (BRASIL, 2002).

Segundo a classificação de Madri, as formas clínicas da doença podem ser divididas nas formas polares, tuberculoide e virchowiana ou lepromatosa; na forma inicial da enfermidade, indeterminada e na forma instável e intermediária, *boderline* ou dimorfa. Essa maneira de classificação considera quatro grandes critérios para definir a forma clínica: clínico, bacteriológico, imunológico e histológico (CONGRESSO INTERNACIONAL DE LEPROLOGIA, 1953 *apud* SOUZA, 1997).

Em 1966, Ridley e Jopling introduziram um sistema de classificação da doença baseado em achados histopatológicos e na resposta imune, estabelecendo cinco grupos. Dois polares e três intermediários, classificando-os em polo tuberculoide-tuberculoide (TT), podendo permanecer limitado ou evoluir para formas disseminadas ou intermediárias da doença, que constituem o grupo *boderline*, e em pólo lepromatoso-lepromatoso (LL). O grupo *boderline* se subdivide em *boderline*-tuberculoide (BT), *boderline*-*boderline* (BB) e *boderline*-lepromatoso (BL), de acordo com a evolução da doença (RIDLEY & JOPLING, 1966) (Figura 10).

Figura 10: Classificação de Ridley e Jopling & aspectos bacteriológicos e imunológicos



Fonte: Adaptado de Heitor Gonçalves, 2014. TT – forma polar Tuberculóide (estável): elevada atividade celular, resposta imunológica Th 1, poucos bacilos; VV – forma polar Virchowiana (estável): resposta imunológica Th 2, muitos bacilos; BT, BB, BL – formas instáveis.

No polo tuberculóide da doença os pacientes possuem um alto grau de imunidade celular mediada por células e hipersensibilidade tardia, exibindo um perfil Th 1 de resposta imune ao *M. leprae* (SCOLLARD *et al.*, 2006; PINHEIRO *at al.*, 2011). No polo Virchowiano, os pacientes exibem resposta imunológica do tipo Th 2 e títulos elevados de anticorpos anti- PGL-1. A imunidade celular é praticamente ausente e apresenta um grande número de bacilos, isolados e/ou agrupados em forma de globias. A maioria dos pacientes encontra-se no grupo das formas instáveis (SCOLLARD *et al.*, 2006; BRITTON; LOCKWOOD, 2004; RIDLEY; JOPLING, 1966; PINHEIRO *et al.*; 2011).

A aplicação da taxonomia de Ridley e Jopling na prática da clínica mostrou-se difícil e demorada, retardando o início da terapêutica, fazendo com que, em 1988, a Organização Mundial de Saúde (OMS) sugerisse apenas duas formas clínicas - paucibacilar (PB) e multibacilar (MB) - em concordância com o índice baciloscópico e pelo número de lesões (BRASIL, 2002). De acordo com esta, o Ministério da Saúde (MS) do Brasil classificou a hanseníase para fins operacionais de tratamento quimioterápico imediato em: paucibacilar (PB), aqueles com até cinco lesões e/ou apenas um tronco nervoso acometido e multibacilar (MB), os com mais de cinco lesões e/ou mais de um tronco nervoso acometido. A

baciloscopia positiva classifica o paciente como multibacilar, independentemente do número de lesões (ARAÚJO, 2003; BRASIL, 2002).

Existem mais duas formas clínicas dessa doença, hanseníase neural pura (PNL) e hanseníase de forma indeterminada. Na hanseníase neural pura, o *M. leprae* apresenta-se como único patógeno bacteriano capaz de infectar os nervos periféricos (TRUMAN; KRAHENBUHL, 2001). Na forma Indeterminada (I), as primeiras lesões cutâneas podem se apresentar como infiltrados perineurais inespecíficos, nos quais se encontram raros bacilos. Esta é uma forma transitória e pode evoluir para uma das cinco formas clínicas já mencionadas nesse tópico (MARTINEZ *et al.*, 2011).

1.6. Diagnóstico

O diagnóstico clínico é usado em regiões de alta endemicidade e que não dispõem de recursos laboratoriais (MARTINEZ, 2009a), baseando-se no número de lesões, perda de sensibilidade e espessamento de nervos (WALKER; LOCKWOOD, 2006).

O diagnóstico laboratorial pode ser obtido através de técnicas microbiológicas (pesquisa do bacilo, através da microscopia), imunológicas (sorologia) e moleculares (PCR).

Rotineiramente e como padrão ouro de diagnóstico laboratorial, o diagnóstico da hanseníase faz-se através da pesquisa do bacilo em raspado intradérmico, conforme recomendação do Ministério da Saúde, utilizando a técnica de coloração de Ziehl-Neelsen e a quantificação dos bacilos efetuada pela Escala Logarítmica de Ridley, que varia de 0 a 6+ (RIDLEY, 1964: 620; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010) (Figura 11). Esta quantificação da densidade de *M. leprae* em esfregaços de linfa tem como objetivo avaliar a carga bacteriana e para a classificação da resposta ao tratamento (PINHEIRO, 2011).

Figura 11: Resultados dos Índices Baciloscópicos segundo Ridley & Jopling

IB	Leitura
0	Ausência de bacilos em 100 campos examinados
1+	Presença de 1 a 10 bacilos, em 100 campos examinados
2+	Presença de 1 a 10 bacilos, em cada 10 campos examinados
3+	Presença de 1 a 10 bacilos, em média, em cada campo examinado
4+	Presença de 10 a 100 bacilos, em média, em cada campo examinado
5+	Presença de 100 a 1.000 bacilos, em média, em cada campo examinado
6+	Presença de mais de 1.000 bacilos, em média, em cada campo examinado

Fonte: Ridley & Jopling, 1962.

Entre as novas ferramentas de apoio ao diagnóstico precoce ou de valor preditivo para esse grupo, em especial, temos a sorologia com teste rápido, que detecta anticorpos IgM contra o antígeno PGL-1, específico do *M. leprae* (DOUGLAS & WORTH, 1984; BÜHRER-SÉKULA, 1998, BÜHRER-SÉKULA, 2000; CALADO, 2005). O antígeno PGL-1 está presente na parede celular de *M. leprae*. Esse antígeno é específico para o bacilo de Hansen, levando à formação de anticorpos das classes IgG e IgM. Nos estudos sorológicos, no entanto, se pesquisam os títulos de IgM por estarem correlacionados com a forma clínica e a atividade da doença.

Pela característica da forma virchowiana, esses pacientes apresentam níveis elevados do anti- PGL1, os quais tendem a diminuir com o tratamento específico (SANTOS *et al.*, 2005; MOURA, 2008; BAZAN-FURINI, 2011). Por outro lado, na hanseníase tuberculóide não há resposta expressiva desses anticorpos (BARROS *et al.*, 2000; BAZAN-FURINI, 2011). De acordo com Britton e Lockwood, 40 a 50% dos pacientes com doença paucibacilar e 1 a 5% de indivíduos saudáveis apresentam positividade ao antígeno PGL-1, o que sugere a ocorrência de infecção subclínica (BRITTON & LOCKWOOD, 2004).

Infecção subclínica ou estado de portador, segundo (CASADEVALL e PIROFSKI, 2000) é a presença do microorganismo, seguido de sua multiplicação com interação da resposta imune, porém sem sinais e sintomas, que pode levar à eliminação, ou à progressão aguda ou crônica.

Como exemplo de testes sorológicos, temos o *ML Flow* que é um ensaio sorológico de fluxo lateral, imunocromatográfico, que detecta anticorpos IgM contra PGL-1 do *M. leprae*. Foi desenvolvido pelo Instituto Real Tropical na Holanda. É rápido, de fácil execução e leitura, não necessitando de laboratório nem de equipamento especial (BÜHRER-SÉKULA *et al.*, 2003).

Estudos indicam que a sorologia é mais sensível que a baciloscopia e, que pode ser utilizada para classificar os casos em PB e MB, assim como identificar os contatos que possuem maior risco de desenvolver hanseníase (ANDRADE *et al.*, 2008).

A técnica da reação da polimerase em cadeia (do inglês “*polymerase chain reaction*”, PCR) tem sido bastante utilizada em vários estudos, para detecção de várias regiões do DNA do *M. leprae* em quase todos os tipos de amostras clínicas, incluindo linfa, sangue, secreção nasal, biópsias da concha nasal inferior, lesões de pele e biópsia do nervo (SANTOS; DE MIRANDA *et al.*, 1993; ALMEIDA; MARTINEZ *et al.*, 2004; de WIT, DOUGLAS *et al.*, 1993a; PATROCÍNIO; GOULART *et al.*, 2005; MARTINEZ; LAHIRI *et al.*, 2009b;RUDEEANEKSIN; SRISUNGNGAM *et al.*, 2008).

Assim, consiste em uma ferramenta útil que pode fornecer um diagnóstico preciso, o que é fundamental para a gestão da hanseníase, a prevenção de deficiências motoras, assim como para estudos epidemiológicos (GOULART, CARDOSO *et al.*, 2007; JOB, JAYAKUMAR *et al.*, 1997).

A maior vantagem da PCR é a sua sensibilidade e especificidade elevada, sem a necessidade de uma cultura bacteriana. Isto é muito importante na detecção do DNA de *M. leprae*, uma vez que o cultivo do bacilo não é possível (GOULART & GOULART, 2008).

1.7. Tratamento

Atualmente, os princípios básicos para o controle da hanseníase consistem em diagnóstico precoce e tratamento com poliquimioterapia (PQT). Além da poliquimioterapia específica, o tratamento deve compreender a supressão dos surtos reacionais, prevenção de incapacidades físicas, bem como a reabilitação física e psicossocial.

A PQT foi adotada como estratégia terapêutica oficial da OMS para hanseníase em 1982. Alguns países, como o Brasil, em princípio, decidiram pela não expansão da PQT para a rede de serviços básicos de saúde, por considerar eficiência não demonstrada, riscos de parafiteiros, custos, disponibilidade de drogas e decorrentes alterações estigmativas da pele. Entretanto, foi cedendo às pressões internacionais em direção à implementação do novo tratamento.

As drogas mais utilizadas na PQT são: rifampicina (RFP), clofazimina (CLO) e dapsona (DPS). A RFP é o principal antibiótico contra a hanseníase e seu efeito bactericida advém da ação sobre a subunidade beta da RNA polimerase. A CLO, por sua vez, é imunofenazida bactericida e, em menor extensão, anti-inflamatória, que possui muitos mecanismos de ação ainda não esclarecidos. Por fim, a DPS é sulfona sintética que atua como inibidor competitivo do ácido paraminobenzóico na síntese do folato pela bactéria. Resistências relacionadas a mutações no gene *folP* foram verificadas e devem-se ao emprego da monoterapia sulfônica (MATSUOKA, 2010).

O contato com os serviços de saúde e a ingestão da medicação vigiada por profissional devem ser encorajados para garantir qualidade (JI B, 2002).

O tratamento das formas PB é composto por uma dose mensal supervisionada de 600mg de RFP, mais 100mg de DPS, realizado em 6 doses e concluído em até 9 meses, e uma dose diária em casa de 100mg de DPS.

Nas formas MB o tratamento é composto por uma dose mensal supervisionada de 600mg de RFP, 100mg de DPS e 300mg de CLO, realizado em 12 doses e concluído em até 18 meses, e uma dose diária, em casa, de 100mg de DPS e 50mg de CLO.

Na tentativa de avaliar o impacto da PQT sobre transmissão e controle da hanseníase, foi desenvolvido programa de computador, o SIMLEP (*Simulation Model for Leprosy*), capaz de fazer projeções e estimativas acerca de indicadores epidemiológicos. Previsões otimistas munidas desse artifício apontam para 5 milhões de casos detectados até 2020 (MEIMA *et al.*, 2004).

A resistência medicamentosa, inicialmente com a dapsonaterapia, já é registrada para os demais fármacos do esquema da OMS. O seguimento dos pacientes após alta por cura é indispensável para verificação de recidivas, reações e reinfecções, e subsequente avaliação dos resultados terapêuticos (CRESPO; GONÇALVES, 2014).

Segundo Goulart & Goulart, 2008, a quimioprofilaxia deve ser iniciada para aqueles com testes *ML-Flow* positivo e Mitsuda negativo.

O tratamento irregular e o abandono têm constituído como um dos principais impasses para o controle da doença. Os motivos apontados pelos pacientes por não comparecerem regularmente à Unidade Básica de Saúde (UBS) foram classificados em intrínsecos e extrínsecos. Para os intrínsecos destacou-se o fato de não comparecer ao serviço de saúde apenas para buscar a medicação e do desejo de faltar. Como fatores extrínsecos foram evidenciados: ausência dos sintomas, outros problemas de saúde, não aceitação da doença, pensamento de cura religiosa e constrangimento relacionado às idas mensais a UBS (de SOUSA *et al.*, 2013).

Segundo de Sousa *et al.*, 2013, a hanseníase continua sendo uma doença repleta de estigmas e preconceitos, em que o paciente, na maioria das vezes, esconde o diagnóstico e o medo de ser descoberto leva-o a interromper o tratamento.

2 JUSTIFICATIVA

Devido o aumento na incidência de casos em menores de 15 anos e ao potencial incapacitante da doença, principalmente em pacientes paucibacilares e com formas neurais, é necessário o emprego de ferramentas de detecção da presença do bacilo, visando ao diagnóstico no início da doença ou detecção de infecção subclínica em contactantes de casos.

A detecção do *M. leprae* na mucosa nasal reflete a presença do bacilo nesse sítio, que pode tornar-se uma fonte de infecção ou transmissão. Esta informação aliada à investigação da IgM ao anti-PGL-1, indicando a resposta imune ao bacilo, reforçam o diagnóstico de infecção subclínica, bem como, a possibilidade da presença do bacilo em outros sítios, como por exemplo, pele e/ou nervos.

Este estudo se propõe, portanto a validar instrumento de detecção para infecção subclínica de *M. leprae*, visando evitar incapacitações, nos contactantes menores de 15 anos, de casos novos diagnosticados no Centro de Dermatologia Dona Libânia, no município de Fortaleza-Ceará, no biênio 2014/2015.

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Detectar infecções subclínicas em contactantes menores de 15 anos de casos novos de hanseníase da região metropolitana de Fortaleza-Ceará, empregando técnicas imunológicas, moleculares e microbiológicas.

3.2. Objetivos específicos

- Analisar os dados demográficos, sócio-econômicos, clínicos e laboratoriais dos contactantes menores de 15 anos através de questionário semi-estruturado.
- Pesquisar os bacilos álcool-ácidos resistentes (BAAR) no raspado da mucosa da cavidade nasal dos contactantes menores de 15 anos .
- Pesquisar o anticorpo IgM anti-PGL-1 de *M. leprae* empregando o teste *ML-Flow* nos contactantes menores de 15 anos.
- Pesquisar o DNA da região genômica RLEP3 específico de *M. leprae* obtido da secreção nasal nos contactantes menores de 15 anos.
- Correlacionar os resultados obtidos com os três métodos diagnósticos (microbiológico, imunológico e molecular) para investigação de infecção subclínica e de portadores na população em estudo.
- Propor políticas de Saúde Pública.

4 METODOLOGIA

4.1. Tipo e local de estudo

Trata-se de um estudo transversal, realizado em amostras de raspado nasal e sangue em indivíduos menores de quinze anos, contactantes de casos novos de hanseníase, atendidos na Unidade de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária Dona Libânia, mais conhecida como Centro Dermatologia Dona Libânia (CDERM), localizada em Fortaleza-Ceará, durante o período abril/2014 a junho/2015.

4.2. Aspectos éticos

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará, via Plataforma Brasil, e aprovado pelo parecer sob o número 507.836 em 08/01/2014 (ANEXO A). Todos os responsáveis legais pelos menores participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (ANEXO B) e todos os menores assinaram ou colocaram a digital do polegar direito no Termo de Assentimento para o Menor - TAM (ANEXO C). As análises microbiológicas e imunológicas foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas do CDERM, enquanto os ensaios moleculares foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Micobactérias, localizado no Bloco de Biomedicina da Universidade Federal do Ceará (UFC). Foi aplicado um questionário semi-estruturado aos contactantes e casos índices, contendo informações demográficas, sócio-econômicas, clínicas e laboratoriais (APÊNDICE A). As informações clínicas foram obtidas em consultas aos prontuários dos pacientes.

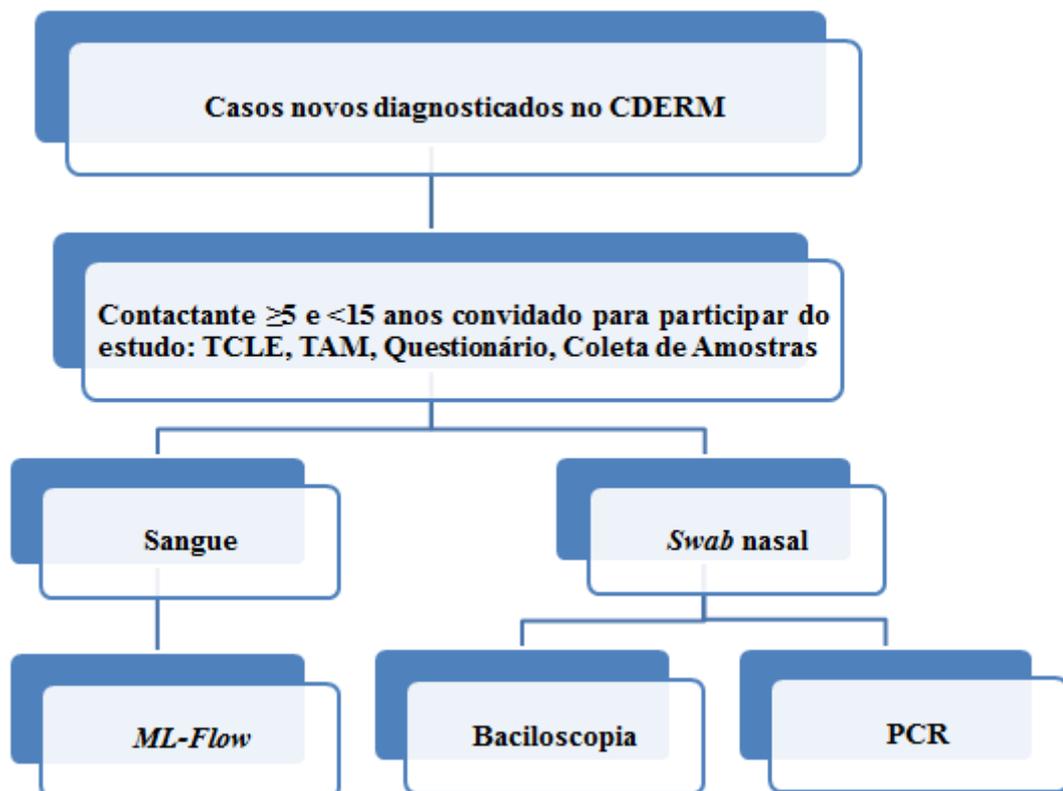
4.3. Critérios de inclusão e exclusão

Todos os contactantes menores de 15 anos de casos novos de hanseníase, sem história de tratamento anterior, até ter atingido o número máximo de 101 indivíduos, conforme o N estatístico amostral. Aos menores de 15 anos de idade foi requerido o consentimento escrito dos pais ou responsáveis legais. Foram excluídos os indivíduos abaixo de 5 anos e indivíduos HIV positivos.

4.4. População de estudo

Após a confirmação do diagnóstico para hanseníase, os casos novos, por ocasião da consulta de enfermagem, foram convidados a trazerem seus contactantes menores de quinze anos, para participar desse estudo, até termos atingido o número de 101 indivíduos. Considerou-se como contato intradomiciliar todas os menores de quinze anos que residissem ou tivessem residido com o doente nos últimos cinco anos (BRASIL, 2002). As amostras foram processadas conforme o fluxograma abaixo (Figura 12).

Figura 12: Fluxograma para captação de contactantes e ensaios laboratoriais



Fonte: Próprio autor (2015).

4.5. Coleta de raspado nasal

Foram utilizados *swabs*, previamente umedecidos em tampão Tris-EDTA (TE: Tris 10mM - EDTA 1mM, pH 8,0; esterilizado) para a coleta de raspado nasal em ambas as narinas de todos os participantes, conforme a Figura 13. Foi usado um *swab* para cada cavidade nasal.

Figura 13: Demonstração da coleta de raspado nasal



Fonte: Próprio autor, 2015.

O *swab* foi inserido contra o segmento anterior da cavidade nasal e a secreção nasal foi coletada por rotação em único sentido. Após a colheita da secreção nasal, foi feito um esfregaço em lâmina virgem e depois o mesmo *swab* foi mantido no tubo contendo o tampão Tris-EDTA (meio de transporte), o qual foi mantido a -20°C até ser conduzido ao Laboratório de Micobactérias. No laboratório, as amostras continuaram mantidas à -20°C até o processo de extração de DNA.

4.6. Punção sanguínea da polpa digital

Foi preparado o material para a coleta de sangue capilar: compressa de álcool, lanceta e curativo aderente. O sangue foi colhido para a realização do teste *ML-Flow*, que será descrito posteriormente.

Inicialmente a cada contato foi explicado como o procedimento seria realizado. Foi utilizado compressa de álcool para antissepsia da ponta digital do indicador esquerdo (da mão direita, se o indivíduo fosse canhoto). Foi realizada uma punctura no dedo com a lanceta e, sendo a lanceta descartada dentro da embalagem para descartáveis perfurocortantes. Foi utilizado uma gota de sangue capilar, aproximadamente 50 μ l, imediatamente, para fazer o teste de *ML-Flow*. Após a coleta foi realizado nova antissepsia da polpa digital com compressa de álcool e foi colocado curativo aderente, sendo realizado hemostase por compressão.

Figura 14: Demonstração da coleta de sangue



Fonte: Próprio autor, 2015.

4.7. Técnicas de Análises

4.7.1. Baciloscopia

A baciloscopia consiste em pesquisar a presença dos bacilos de *M. leprae* diretamente na amostra de secreção nasal, seguindo o mesmo protocolo, quando o material examinado é o raspado intradérmico (linfa). A seguir, descreve-se todo o procedimento.

Cada sujeito do estudo foi acomodado confortavelmente e recebeu as explicações do procedimento a que seria submetido. No caso, considerando-se que todos eram crianças, o responsável legal recebeu as explicações referentes ao referido estudo.

Foram colhidas duas amostras de secreção nasal com o auxílio de "swabs" estéreis, como descrito previamente na seção 4.5. Foi realizado esfregaço com a amostra de secreção nasal em lâmina virgem de microscopia. Para narina direita (ND), convencionou-se a marcação com caneta azul e para narina esquerda (NE), marcação com caneta vermelha. O mesmo *swab* foi introduzido em meio de transporte, cuja marcação obedeceu a critério semelhante ao das lâminas, e acondicionado a -20°C para análise de PCR.

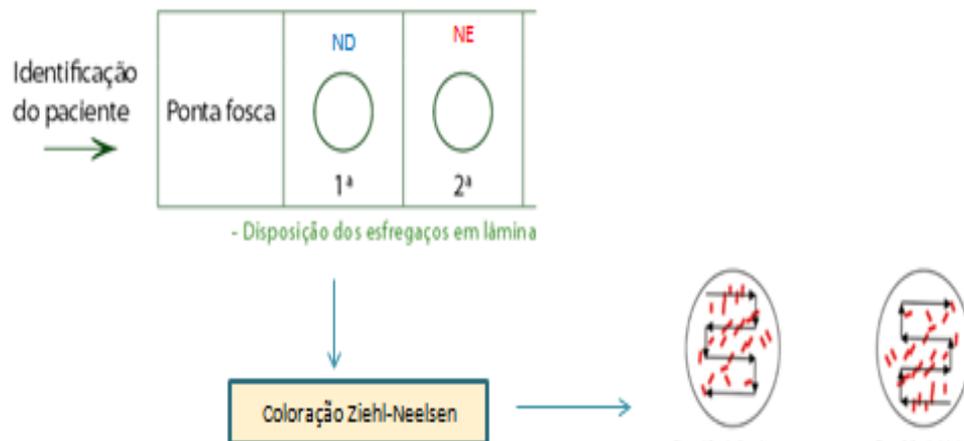
As lâminas foram identificadas com as iniciais do nome do participante e número, na ponta fosca, por ordem de chegada, antes da coleta e depois fixada ao ar durante 5 a 10 minutos. A fixação foi feita na chama do bico de gás, passando-se a lâmina 2 a 3 vezes rapidamente na chama com o esfregaço voltado para cima e nunca em contato direto com a chama.

A coloração de Ziehl-Neelsen foi realizada pelo método a frio (Anexo D). A leitura baciloscópica foi realizada em objetiva de imersão (aumento de $1000\times$). Foram contados vinte campos no sentido horizontal e vinte campos no sentido vertical. O Índice Baciloscópico (IB) foi calculado de acordo com a escala de Ridley (QUADRO I e FIGURA 15).

Quadro 1: Cálculo do IB médio do Paciente. IB = Média aritmética dos IBs analisados em cada esfregaço

	<u>Interpretação:</u>
IB=0	Ausência de bacilos em 100 campos examinados;
IB=1	Presença de 1 a 10 bacilos, em média, em 100 campos examinados;
IB=2	Presença de 1 a 10 bacilos, em média, em 10 campos examinados;
IB=3	Presença de 1 a 10 bacilos, em média, em cada campo examinado;
IB=4	Presença de 1 a 100 bacilos, em média, em cada campo examinado;
IB=5	Presença de 100 a 1000 bacilos, em média, em cada campo examinado;
IB=6	Presença de mais de 1000 bacilos, em média, em cada campo examinado.

Figura 15: Representação de esfregaço contendo raspado nasal em lâmina



Fonte: Guia de Procedimentos Técnicos de Baciloscopia em Hanseníase do Ministério da Saúde-2010.

4.7.2. *ML-Flow*

Consiste em um ensaio imunocromatográfico realizado em uma só etapa, onde o ouro coloidal é utilizado no reagente de detecção da reação. O método se fundamenta na imobilização do antígeno específico do *M. leprae*, formando uma linha característica na área do teste. O reagente de detecção é composto por anticorpo anti-IgM humana, marcado por partículas móveis de ouro coloidal vermelho e inserido dentro do dispositivo (BÜHRER-SÉKULA *at al.*, 2003).

Foi utilizado para a realização do teste *ML-Flow*, o antígeno semi-sintético, trissacarídeo natural, ligado à albumina de soro bovino (NT - P - BSA) 3, 6 - di - *o* - methyl - β - D - glucopyranosyl - (1 \rightarrow 4) - 2, 3 - di - *o* - methyl - α - L - rhamnopyranosyl - (1 \rightarrow 2) - 3 - *o* - methyl - α - L - rhamnopyranose. O anticorpo IgM humano foi colocado como a segunda linha paralela à linha de antígeno para servir como o controle reagente. A placa porosa é composta de nitrocelulose. Estas foram armazenadas em temperatura ambiente e a solução tampão sob refrigeração.

O teste *ML-Flow* foi realizado com sangue total, após punctura digital, conforme descrição feita no tópico de coleta. O dispositivo de teste foi removido do invólucro protetor e colocado na posição horizontal sobre uma bancada com o receptáculo redondo para a amostra, e o visor quadrado do dispositivo de teste para cima.

Observação: O visor retangular localizado no centro do dispositivo de teste contém duas faixas: uma faixa do antígeno (T), situada mais próxima do receptáculo para a amostra e uma faixa de controle (C).

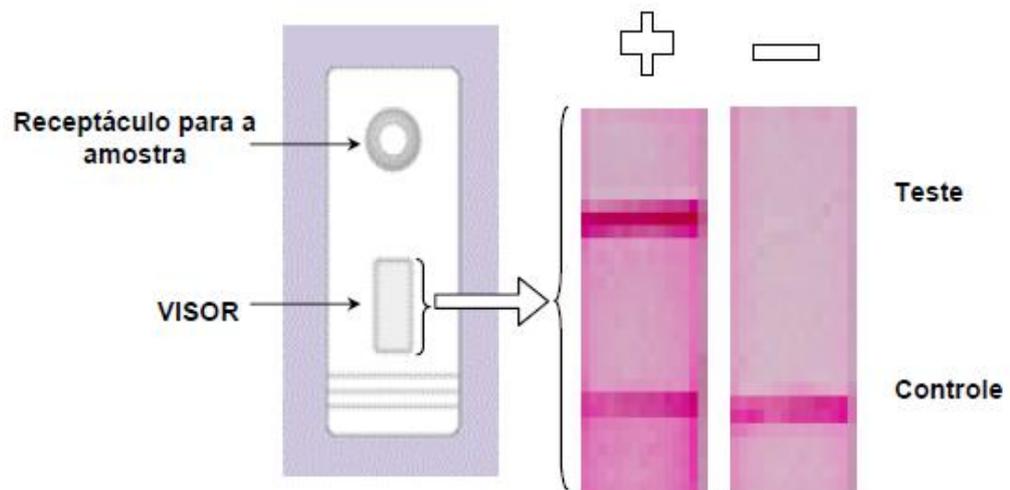
Foram colocados 50 μ l de sangue no receptáculo redondo destinado à amostra e foi adicionado, logo após, quatro gotas (ou 200 μ l) da solução tampão no mesmo receptáculo. O cronômetro foi acionado até marcar o tempo de 5 minutos. O frasco contendo a solução tampão foi novamente fechado e armazenado à temperatura de 4-8°C para uso posterior. A leitura do resultado foi feita após 5 minutos.

Em alguns ensaios, após a introdução da solução tampão no receptáculo onde foi colocada a amostra de sangue, apareceu uma cor movendo-se através das zonas de teste e controle. Isto mostrou que o teste estava funcionando. Na maior parte dos ensaios, o resultado foi negativo, indicado pela ausência de uma linha na zona de teste e a presença de uma linha na zona de controle. A zona de controle foi corada em todos os casos. O aparecimento da faixa de controle corada garantiu a integridade do reagente de detecção; porém não nos deu um controle sobre a qualidade da amostra. Se a faixa de controle não tivesse corado, o teste teria

tido inválido.

Um resultado positivo é indicado pela presença de uma linha moderada ou acentuada na zona de teste e por uma linha na zona de controle (Figura 16). No caso do resultado positivo, significa que a amostra contém anticorpo específico para a hanseníase e ao se ligar com o antígeno, surge a linha vermelha na zona de teste. A pigmentação da faixa de antígeno revela a presença na amostra de anticorpos IgM específicos para o *M. leprae*. A intensidade de um resultado positivo varia de 1 a 4+. A intensidade 4+ equivale à tonalidade obtida na linha de controle ou, às vezes, ultrapassando-a (BÜHRER-SÉKULA *at al.*, 2003).

Figura 16: Representação do teste *ML-Flow*



Fonte: Andrade, 2007.

Todas as fitas de *ML-Flow* desse estudo foram identificadas e armazenadas em folhas protegidas por invólucro plástico, seguindo esse procedimento: para abrir o teste, dobrou-se o cartucho para trás. Com um lenço de papel secou-se o excesso de solução tampão corrente pressionando no topo do filtro de papel, onde a gota de sangue foi depositada. As iniciais e a data de nascimento do paciente foram escritas imediatamente na fita teste. Deixou-se o teste secar. O teste foi fixado com fita adesiva dupla face ou cola branca na folha de resultados de exame do participante, e armazenado em invólucro plástico, para protegê-lo da umidade.

4.7.3. PCR

a) Extração de DNA de *M. leprae* a partir do muco nasal:

A ponta do swab envolvida pelo algodão foi cortada com lâmina de bisturi estéril dentro de uma placa de Petri e transferida para um tubo de 2,0mL juntamente com o líquido remanescente. Todo o processo de extração do DNA foi realizado com o *Dneasy Blood and Tissue kit* (Qiagen, Alemanha) conforme as recomendações do fabricante (ANEXO E). Ao final, o DNA foi solubilizado em 30µl de tampão de eluição (AE) e mantido a -20 °C para posterior amplificação do DNA.

b) Amplificação da região RLEP específica do *M. leprae*:

Os oligonucleotídeos iniciadores para a PCR foram baseados na região genômica *M. leprae repetitive element*, RLEP3, depositadas no *GenBank* (Acesso n°. X17153) e sintetizados pela Invitrogen, EUA (Quadro 2). Foram utilizados iniciadores para amplificação por PCR de um produto de 372pb específico do genoma de *M. leprae* (PATROCÍNIO *et al.*, 2005; YOON *et al.*, 1993).

A reação que compõe a PCR foi realizada em um termociclador utilizando o kit Illustra™ Pure Taq Ready-to-go PCR beader (GE Healthcare, EUA), cujas reações individuais consistiram em um volume total de 25µl, composta de 3µl do material clínico extraído (DNA); 1µl de cada iniciador (25pmol), total 4µl e 18µl de água; adicionou-se a *Ready-To-Go PCR Beads* (1U Taq DNA polimerase, 1,5mM MgCl₂ e 200µM dNTP mix). Para a PCR foram utilizados os iniciadores RLEP-R1 e RLEP-R2.

Como controle positivo, foi incluído, para cada reação, DNA de *M. leprae* extraído de biópsia de caso de hanseníase, na concentração de 20ng/µl. Como controle negativo foi substituído o DNA por H₂O. Também foi incluído em cada reação de amplificação um Controle Interno de Positividade a fim de avaliar amostras com inibição de PCR, sendo empregado iniciadores para o gene constitutivo humano NRAMP1 (*natural resistance associated macrophage protein 1* - NRAMP1). O gene da NRAMP1 localiza-se na região 2q35 do cromossoma 2 e a proteína codificada por ele é detectada no compartimento lisossomal de macrófagos, monócitos e leucócitos periféricos, como também no fígado, baço e pulmões.

O produto amplificado do gene NRAMP1 (*GenBank* AJ535670) foi de 200pb e teve os seguintes oligonucleotídeos: (NRAMP-F:5'-CTCGCATTAGGCCAACGA-3' e NRAMP-R: 5'-TTCTGTGCCTCCCAAGTTAGC-3') (GOULART, 2002).

As condições de amplificação da primeira reação foram desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos a 95°C por 1 minuto, anelamento a 58°C por 40 segundos e 72°C por 40 segundos para a extensão. Após os 30 ciclos ocorreu um período de extensão final a 72°C por 10 minutos. O produto gerado pela PCR foi de 372pb.

Quadro 2 - Iniciadores para amplificação do DNA de *M. leprae* relativo a região RLEP3

Iniciadores	Sequência (5'-3')
RLEP-R1	CGG CCG GAT CCT CGA TGC
RLEP-R2	GCA CGT AAG CTT GTC GGT GG

Fonte: Próprio autor, 2015.

A partir do produto amplificado foi feita a confirmação do tamanho dos fragmentos por eletroforese em gel de agarose 1,5% e coloração com brometo de etídio. A visualização e digitalização foi realizada em no sistema *ImageQuant 300* (GE Healthcare).

4.7.4. Sequenciamento

Esse procedimento foi realizado no Instituto Evandro Chagas, na cidade de Belém, no estado do Pará.

Com a finalidade de confirmar a PCR, foi realizada o sequenciamento do produto amplificado da região RLEP-3, empregando os mesmos primers. Os produtos de PCR foram purificados utilizando o Kit QIAquick PCR Purification antes do sequenciamento no equipamento ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®), com a utilização dos kits BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems®) e BigDye XTerminator Purification (Applied Biosystems®). As sequências foram analisadas com o software SeqScape v2.7 (Applied Biosystems) e BioEdit Sequence Alignment Editor Copyright © 1997-2013 Tom Hall, com posterior realização de BLAST no site da NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) utilizando um ciclo de BigDye Terminator Kit de sequenciação. A seqüência de referência RLEP3 (*GenBank* acesso X17153) foi usada para alinhar as seqüências.

4.8. Análise estatística

Após o armazenamento dos dados no Programa *Microsoft® Excel* 2010, foi realizada a análise descritiva.

Os dados foram organizados em tabelas simples e cruzadas. Para se avaliar a associação entre RLEP PCR e *ML-Flow* com as características dos pacientes e de RLEP PCR com IB e *ML-Flow*, foram utilizados os testes de Qui-Quadrado e de razão de verossimilhança. As análises estatísticas cujos valores de $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significantes. Os dados foram processados no SPSS 20, licença N°. 10101131007.

5 RESULTADOS

5.1. Caracterização dos Casos

Foram analisadas as variáveis individuais de sessenta e nove portadores de hanseníase que participaram desse estudo (TABELA 1). Esses participantes são os casos índices, que além de terem respondido a algumas perguntas específicas do questionário, apresentaram os contactantes que se enquadravam no perfil dessa pesquisa.

De um modo geral a maioria 88,4% (61/69) dos casos conhecia alguém que teve hanseníase, e dentre estes 79,7% (55/69) eram parentes com quem conviviam. A média de idade dos casos foi de 39,5 anos (\pm 12,8), variando de 5 a 76 anos. Houve predominância do gênero masculino 58% (40/69). O primeiro grau incompleto representou a escolaridade do grupo 73,9% (51/69), e 2,6 salários mínimos foi a renda média, com desvio padrão de 0,66. Quanto a detecção dos casos, 81,2% (56/69) foram encaminhados de uma unidade básica de saúde a um serviço especializado (TABELA 1).

Avaliando os aspectos clínicos, especificamente em relação a classificação operacional da hanseníase, a forma Paucibacilar foi predominante 56,5% (39/69), e considerando a classificação de Ridley e Jopling, a forma boderline foi a mais frequente 44,9% (31/69). Vale salientar que 55,1% (38/69) não necessitaram de exames complementares para o diagnóstico da hanseníase (TABELA 1). O número de lesões foi em média 2,2/caso, com desvio padrão 0,8. No entanto, a baciloscopia e o exame histopatológico foram auxiliares valiosos em alguns casos. Todos os casos, independentemente, de apresentarem ou não, alguma incapacidade física, iniciaram o tratamento, logo após o diagnóstico clínico.

A tabela abaixo apresenta a análise descritiva das variáveis individuais dos Casos Índices da pesquisa, com análise univariada de 69 portadores de hanseníase que participaram desse estudo, no CDERM, no biênio 2014/2015.

Tabela 1: Distribuição dos casos com hanseníase, no CDERM, biênio 2014/2015

Características	N	%	Média	± DP
Conviviam com outros doentes				
Sim	61	88,4		
Não	08	11,6		
Quem era				
Parente	55	79,7		
Outro	06	8,7		
Não informou	08	11,6		
Modo de detecção				
Encaminhamento	56	81,2		
Demanda espontânea	07	10,1		
Exame de coletividade	01	1,4		
Exame de contatos	01	1,4		
Outros	04	5,8		
Sexo				
Feminino	29	42,0		
Masculino	40	58,0		
Idade				
5-15	03	4,3		
25-40	40	58,0	39,5	12,8
41-59	21	30,5		
60-76	05	7,2		
Escolaridade				
Não estudou	04	5,8		
1º G incompleto	51	73,9		
1º G completo ou maior nível	14	20,3		
Renda (SM: salário mínimo)				
Sem renda	04	5,8		
< 1,0	20	29,0	2,6	0,66
1,0 – 3,9	42	60,9		
4,0 – 7,9	03	4,3		
Número de lesões				
Única	18	26,5		
2 – 5	17	25,0	2,2	0,8
>5	33	48,5		
Classificação Operacional				
Paucibacilar	39	56,5		
Multibacilar	30	43,5		
Classificação Clínica				
Indeterminada	04	5,8		
Tuberculóide	20	29,0		
Virchowiana	13	18,8		
Dimorfa BT	11	15,9		
Dimorfa BB	08	11,6		
Dimorfa BL	12	17,4		
Neural pura	01	1,4		
Incapacidades				
Ausência	59	85,5		
Presença	10	14,5		
Índice Baciloscópio				
0 (Negativo)	42	60,9		
≥ 1,0 (Positivo)	27	39,1		
Exame confirmatório para hanseníase				
Sim	31	44,9		
Não	38	55,1		

Próprio autor (2015).

5.2. Caracterização dos Contactantes

Crianças e adolescentes integraram esse estudo (n=101), agora, denominados contactantes. Dentre estes, 60,4% (61/101) pertenciam a faixa etária de 5 a 10 anos e 39,6% (40/101) de 11 a 15 anos incompletos. A média de idade foi 9,3 anos com desvio padrão 3,3. Houve um predomínio do gênero feminino 56,4% (57/101) (TABELA 2).

Somente 1% dos contactantes afirmou que não compartilhava o mesmo cômodo para dormir. Os demais dividiam o mesmo ambiente, com, pelo menos, uma pessoa, sendo a média de compartilhamento equivalente a 2,6 pessoas com desvio padrão 1,3. Além do compartilhamento do cômodo, 63,4% (64/101) dividiam a mesma cama ou rede, em média, com 1,4 pessoas para dormir, apresentando desvio padrão 0,5 (TABELA 2).

Avaliando-se a higiene da roupa de cama usada pelos contactantes em estudo, 56,4% (57/101) afirmaram que lençóis e/ou rede eram lavados com uma frequência de uma vez por semana.

Investigamos quais contactantes haviam tomado a vacina BCG, e verificamos que 96% (97/101) haviam sido imunizados. Todavia, um percentual menor, 90,1% (91/100) apresentava a cicatriz vacinal no braço direito.

Questionamos sobre a presença de animais no domicílio e verificamos que 70,3% (71/101) criavam algum tipo de animal. Destes, os mais frequentes eram cães 54,9% (39/101), gatos 28,2% (20/101) e pássaros 12,7% (9/101).

Tabela 2: Distribuição dos contactantes segundo as características, CDERM, Fortaleza – Ceará, 2014/2015

Características	N	%	Média	± DP
Idade (anos)				
5 - 10	61	60,4	9,3	3,3
11 - 15	40	39,6		
Sexo				
Feminino	57	56,4		
Masculino	44	43,6		
Número de pessoas no dormitório				
0				
1	01	1,0		
>1	20	20,4	2,6	1,3
Não respondeu	77	78,6		
	03			
Compartilhamento de cama e/ ou rede				
Sim				
Não	64	63,4	1,4	0,5
	37	36,6		
BCG (imunização)				
Sim	97	96,0		
Não	04	4,0		
Cicatriz BCG				
Sim	91	90,1		
Não	10	9,9		
Frequência lavagem lençóis e/ou rede				
1 x/mês	04	4,0		
1 x/15 dias	14	13,9		
1 x/ semana	57	56,4		
Diariamente	14	13,9		
Outro	12	11,9		
Cria animal				
Sim	71	70,3		
Não	30	29,7		
Animal				
Cachorro	39	38,6		
Gato	20	19,8		
Pássaro	09	8,9		
Galinha	03	3,0		
Outros	30	29,7		

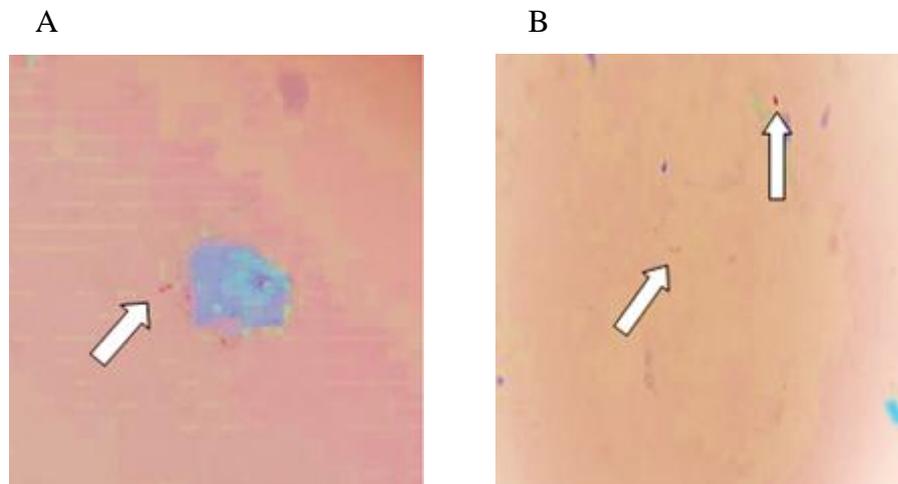
Fonte: Próprio autor (2015).

5.3. Análise da baciloscopia de *swab* nasal, para detecção do *M. leprae* (IB)

Todas as amostras de secreção nasal, dos contactantes em estudo, foram submetidas a análise baciloscópica, seguindo o protocolo estabelecido na metodologia.

As amostras positivas tiveram Índice Baciloscópico (IB) = 1, cujos esfregaços apresentaram bacilos, classificados morfologicamente como, fragmentados e íntegros (FIGURA 17).

Figura 17: Coloração de Ziehl-Neelsen. Bacilos álcool-ácido resistentes corados com a fucsina (vermelho). (Ziehl-Neelsen stain x 1000)



Fonte: Próprio autor (2015). Fotomicrografias: A – raspado intradérmico (portador de hanseníase); B – lâmina de secreção nasal (contactante, nesse estudo, de caso novo de hanseníase).

Os resultados foram descritos como positivo e negativo e apresentados abaixo, na TABELA 3.

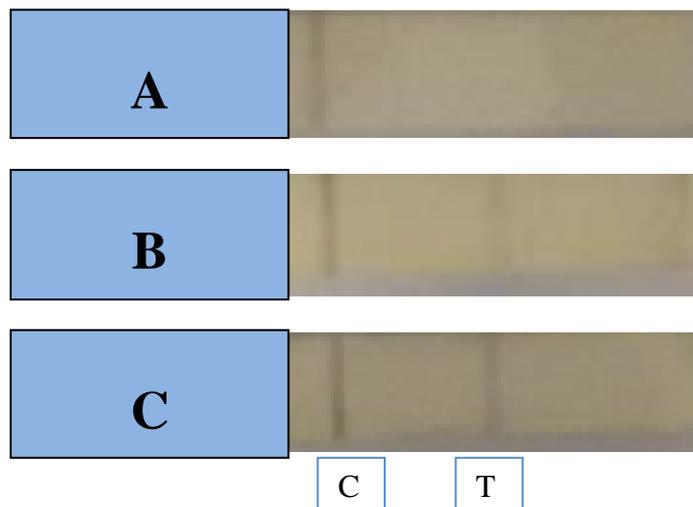
Tabela 3: Determinação do Índice Baciloscópico (IB) em amostras de *swab* nasal

Resultado IB	N	(%)
Positivo	02	(1,98)
Negativo	99	(98,02)
Total	101	(100,0)

Fonte: Próprio autor (2015).

5.4. Ensaio *ML-Flow*: Todos os contactantes menores de quinze anos, de pacientes portadores de hanseníase foram submetidos ao teste de fluxo lateral (*ML-Flow*), conforme descrito na metodologia, a partir de amostras de sangue, colhidas por punctura digital. Os resultados foram descritos como positivo ou negativo (FIGURA 18) e distribuídos segundo a sensibilidade (TABELA 4).

FIGURA 18: Interpretação dos resultados do teste de fluxo lateral *ML-Flow*



Fonte: Próprio autor (2015). C: Controle, T: Teste; Resultados - **A**: Negativo, **B**: Positivo (+), **C**: Positivo (++)

Tabela 4: Teste *ML-Flow* para detecção de anticorpos IgM anti-PGL-1, específicos para *M. leprae* em amostras de sangue, de contactantes menores de quinze anos de pacientes portadores de hanseníase

Resultado <i>ML-Flow</i>	N	(%)
Positivo	34	(33,7)
Negativo	66	(65,3)
Não Realizado	01	(1,0)
Total	101	(100,0)

Fonte: Próprio autor (2015).

O ensaio mostrou sensibilidade de 33,7% (34/101), sendo que um contactante, por motivo pessoal, não realizou o referido teste.

5.4.1. Associação da soropositividade do teste *ML-Flow* em relação a faixa etária dos contactantes, sexo, classificação operacional do caso índice, aglomeração e cicatriz vacinal (TABELA 5).

Entre os casos positivos dos 100 contactantes de hanseníase submetidos ao teste *ML-Flow*, 39,5% (17) eram do sexo feminino; 34,4% (21) eram contatos de casos PB e 32,2% (29) apresentavam uma cicatriz de BCG.

Tabela 5: Associação entre o teste *ML-Flow* e as características dos contactantes, CDERM, Fortaleza - CE, 2014/2015

Características	<i>ML-Flow</i> N(%)		p
	Positivo	Negativo	
Faixa etária (ano)			
5 - 10	19 (31,7)	41 (68,3)	0,546
11 - 15	15 (37,5)	25 (62,5)	
Sexo			
Masculino	17 (29,8)	40 (70,2)	0,310
Feminino	17 (39,5)	26 (60,5)	
Classificação Operacional (Caso Índice)			
Multibacilar			0,910
Paucibacilar	13 (33,3)	26 (66,7)	
	21 (34,4)	40 (65,6)	
Nº pessoas no dormitório			
Até 1 pessoa			0,482
2 a 5 pessoas	6 (28,6)	15 (71,4)	
	28 (36,8)	48 (63,2)	
Cicatriz vacinal			
Presença	29 (32,2)	61 (67,8)	0,260
Ausência	5 (50,0)	5 (50,0)	

Fonte: Próprio autor (2015). p de Qui-quadrado.

5.5. Amplificação da região RLEP3 específica do *M. leprae*

Todos os contactantes menores de quinze anos, de pacientes portadores de hanseníase foram submetidos à amplificação por PCR convencional da região 372pb da sequência RLEP3 específica da espécie de *M. leprae* a partir de amostras de secreção nasal. O ensaio mostrou positividade de 16,1% (14/87), excluindo-se as análises perdidas 14 (101) (TABELA 6) e (TABELA 7).

Tabela 6: Frequência da PCR convencional para detecção de *M. leprae* na secreção nasal de contactantes menores de quinze anos, incluindo-se todas as amostras, CDERM, Fortaleza – CE, 2014/2015

Resultado da PCR	N	(%)
Positiva	14	(13,9)
Negativa	73	(72,2)
Inibida ^a	13	(12,9)
Não Realizada	1	(1,0)
Total	101	(100,0)

Fonte: Próprio autor (2015). ^a PCR negativo para o gene NRAMP.

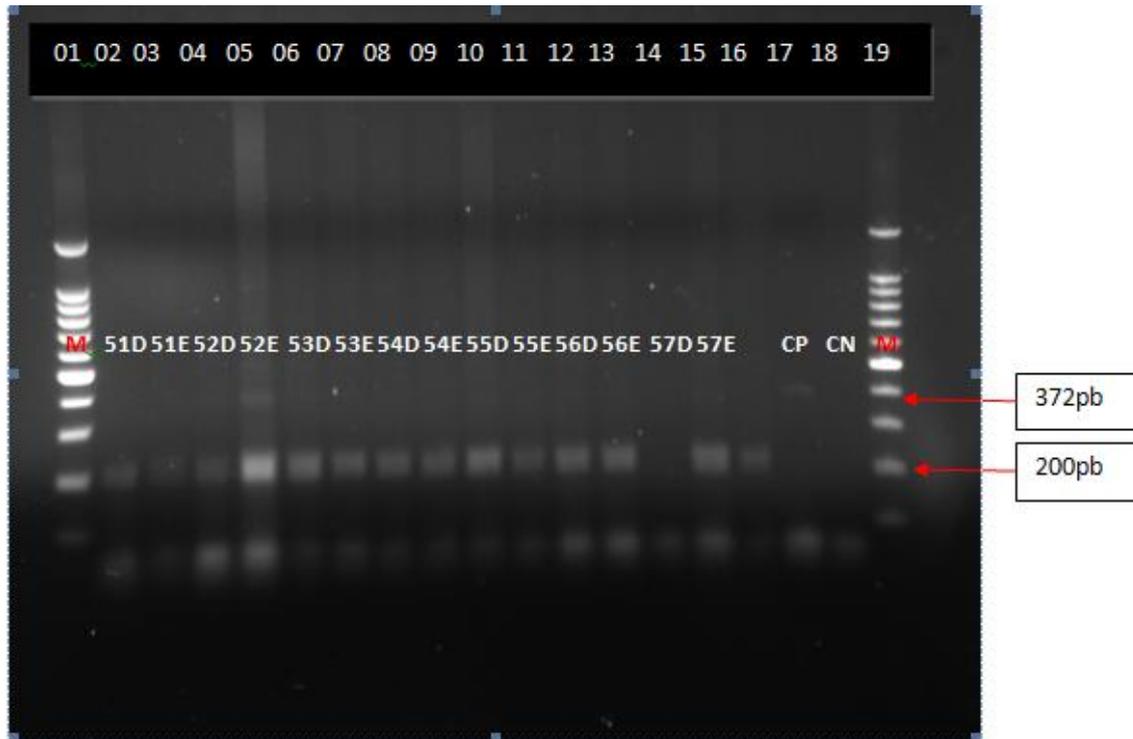
Tabela 7: Frequência da PCR convencional para detecção de *M. leprae* na secreção nasal de contactantes menores de quinze anos, excluindo-se as amostras inibidas e não realizadas

Resultado da PCR	N	(%)
Positiva	14	(16,1)
Negativa	73	(83,9)
Total	87	(100,0)

Fonte: Próprio autor (2015).

O fragmento amplificado de 372pb foi confirmado, sendo observado por eletroforese em gel de agarose 1,5% (FIGURA 19).

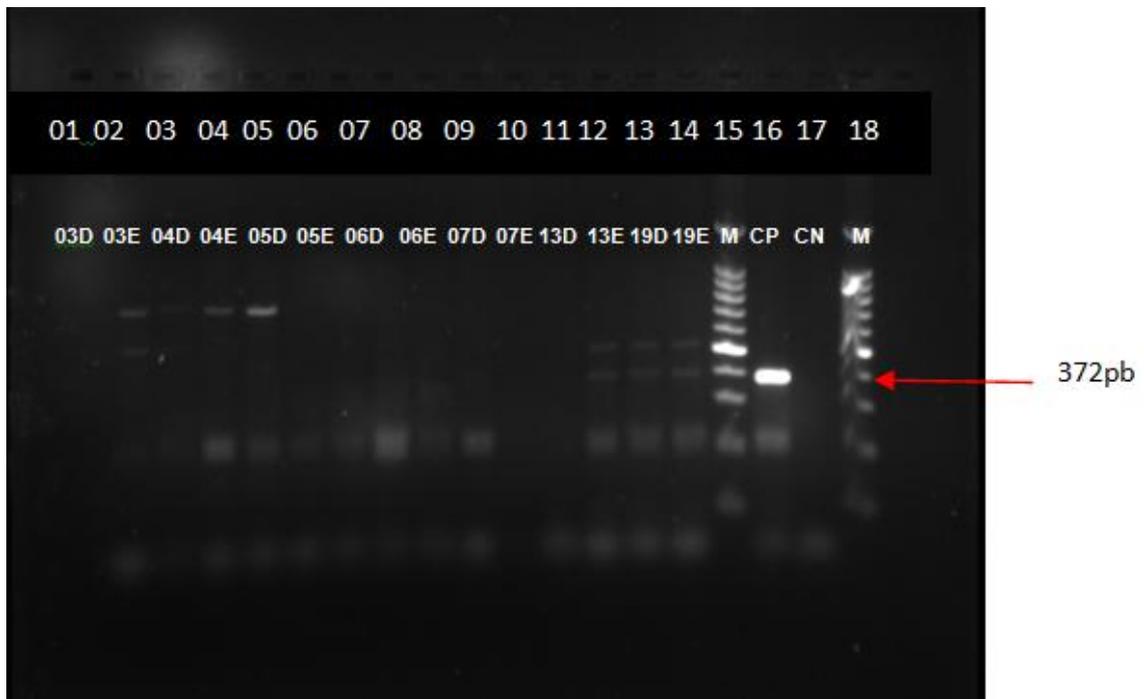
Figura 19: Demonstração do gel de eletroforese exibindo as bandas



Fonte: Próprio autor (2015). Gel de agarose 1,5% de produtos de amplificação da região RLEP3 do *M. leprae* (372pb) e do controle interno gene NRAMP1 (200pb). Poços 1 e 19: marcadores 100pb; poços 2 a 4, 6 a 13 e 15 representam amostras negativas; poço 5: amostra positiva; poço 14: amostra inibida; poço 17: controle positivo de *M. leprae* e poço 18: controle negativo.

Infelizmente, algumas amostras de secreção nasal, submetidas a amplificação por PCR convencional, se apresentaram como inibidas pela ausência de amplificação da região de 200pb do gene NRAMP1, e portanto, não pudemos verificar sua positividade ao *M. leprae*, conforme mostram os poços 9 e 11 (FIGURA 20).

FIGURA 20: Demonstração em gel de agarose de amostras inibidas pela não amplificação do Controle Interno da PCR do gene NRAMP



Fonte: Próprio autor (2015). Gel de agarose 1,5%, de produtos de amplificação da região RLEP3 do *M. leprae* (372pb) e do controle interno gene NRAMP1 (200pb). Poços 10 e 11: amostras inibidas; poços 1, 4, 7, 8, 12, 13 e 14: amostras positivas; poços 2, 3, 5, 6 e 9: amostras negativas; poços 15 e 18: marcadores 100pb; poço 16: controle positivo e poço 17: controle negativo.

Todos os extratos de DNA das 100 amostras de secreção nasal, foram quantificados em Nanodrop 1000 Spectrophotometer, seguindo instruções do fabricante, para verificarmos os valores das razões das Absorbâncias a 260/280 (que verifica a qualidade do DNA) e a concentração de DNA na amostra estudada (TABELA 8).

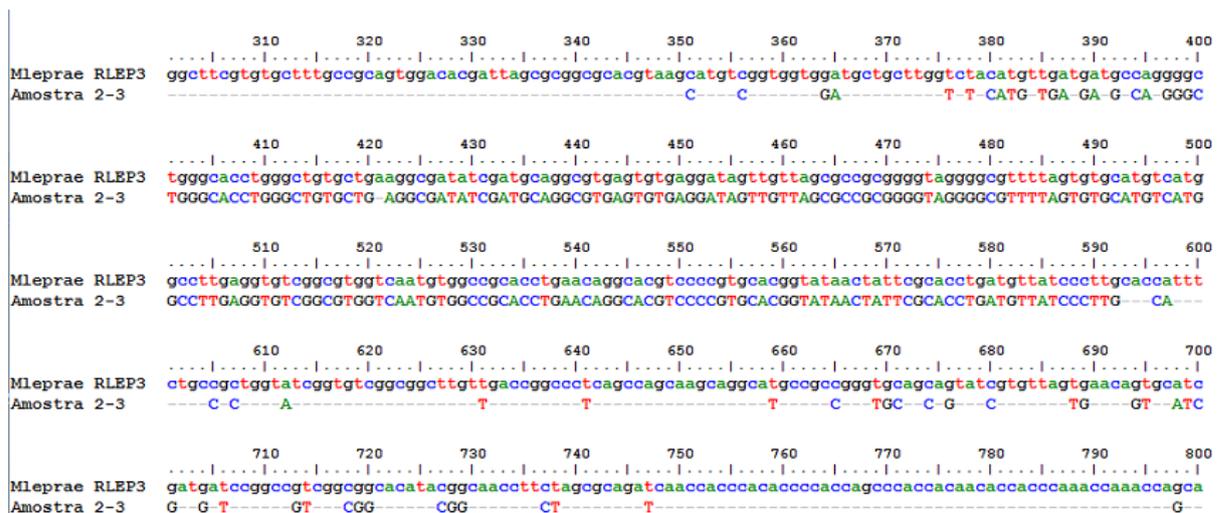
Tabela 8: Quantificação do DNA extraído das 100 amostras de secreção nasal com medidas estatísticas de acordo com a inibição da PCR

Amostras quanto a PCR	MEDIDAS ESTATÍSTICAS	RAZÃO 260/280	CONCENTRAÇÃO em ng/μl
Não Inibido N= 87	Média	1,9	10,8
	Mediana	1,8	7,3
	Desvio Padrão	0,7	10,7
Inibido N= 13	Média	2,0	5,3
	Mediana	1,7	5,1
	Desvio Padrão	1,1	3,3

Fonte: Próprio autor (2015). Amostras quantificadas no Nanodrop 1000 Spectrophotometer, cujo valor de referência da razão 260/280 deve ficar entre 1,8 e 2,0.

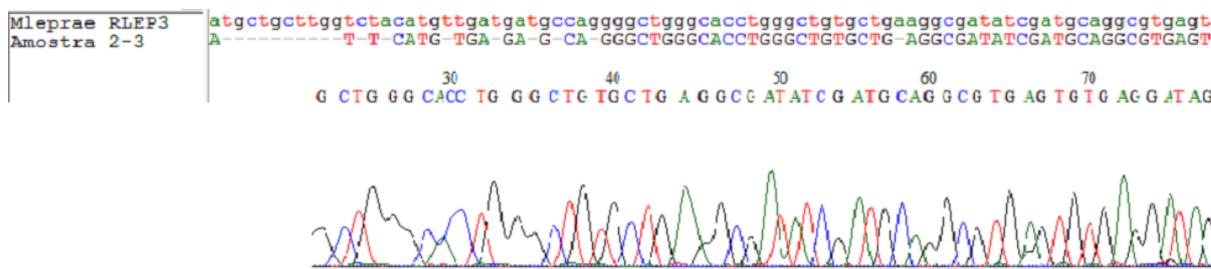
Para confirmar o produto de amplificação por PCR da região RLEP3 de *M. leprae*, nas amostras de secreção nasal analisadas nesse estudo, foi realizado o sequenciamento das amostras positivas para PCR, **19D** (narina direita) e **19E** (narina esquerda), obtendo-se resultado de confirmação positiva (FIGURAS 21 e 22).

Figura 21: Alinhamento por BLAST da região *M. leprae* RLEP3 com a amostra 19, sequenciamento realizado no equipamento ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®) e alinhamento realizado com o Programa BioEdit Sequence Alignment Editor



Fonte: Instituto Evandro Chagas, 2015.

Figura 22: Eletroferograma da amostra 19, evidenciando a qualidade do DNA e seu alinhamento com a sequência padrão *M. leprae* RLEP3 (X17153 DNA). Programa BioEdit Sequence Alignment Editor.



Fonte: Instituto Evandro Chagas, 2015.

5.5.1. Associação da sensibilidade da PCR em relação a faixa etária dos contactantes, sexo, classificação operacional do caso índice, aglomeração e cicatriz vacinal

Avaliamos os resultados dos produtos de amplificação por PCR da região RLEP3 de *M. leprae*, em relação a faixa etária, excluindo as amostras inibidas, pois estas, poderiam ser positivas ou negativas. Dos 56 contactantes que pertenciam a faixa etária de 5 – 10 anos, 3,6% (2/87) tiveram resultado positivo para PCR, enquanto na faixa etária de 11 – 15 anos incompletos, com a participação de 31 contactantes, a positividade para PCR foi mais expressiva, 38,7% (12/87), com $p < 0,0001$, configurando significância estatística (TABELA 9).

Analisando-se a sensibilidade da PCR em relação ao sexo, houve um predomínio de positividade no gênero masculino 16,7% (8/87), com $p=0,871$ (TABELA 9).

Relacionando o resultado do produto de amplificação por PCR da região RLEP3 de *M. leprae*, de amostras de secreção nasal, com a classificação operacional do caso índice, observamos que não houve diferença significativa entre os dois grupos, com $p= 0,752$ (TABELA 9).

Avaliamos também, se no domicílio havia aglomeração de pessoas, principalmente no período noturno, especificamente no cômodo usado pelo contactante para dormir. Desse modo, foi determinada a frequência da positividade da PCR nasal para detecção do *M. leprae*, em relação ao número de pessoas que o contactante dividia o mesmo cômodo para dormir, verificamos $p=0,138$ (TABELA 9).

Tabela 9: Associação entre o teste RLEP PCR e as características dos contactantes, CDERM, Fortaleza - CE, 2014/2015

Características	RLEP PCR N(%)		p
	Positivo	Negativo	
Faixa etária (ano) ⁽¹⁾			
05 - 10	2 (3,6)	54 (96,4)	< 0,0001
11 - 15	12 (38,7)	19 (61,3)	
Sexo ⁽¹⁾			
Masculino	8 (16,7)	40 (83,3)	0,871
Feminino	6 (15,4)	33 (84,6)	
Classificação Operacional ⁽²⁾ (Caso Índice)			
Multibacilar	6 (43,0)	28 (38,0)	0,752
Paucibacilar	8 (57,0)	45 (62,0)	
Nº pessoas no dormitório ⁽¹⁾			
Até 1 pessoa	5 (26,3)	14 (73,7)	0,138
2 a 5 pessoas	8 (12,3)	57 (87,7)	
Cicatriz vacinal ⁽²⁾			
Presença	13 (93,0)	68 (93,0)	0,968
Ausência	1 (7,0)	5 (7,0)	

Fonte: Próprio autor (2015). p de Qui-quadrado. (1) % em relação às linhas; (2) % em relação às colunas.

5.6. Associação da positividade do teste *ML - Flow* em relação a PCR convencional para o *M. leprae*

Observando todas as amostras submetidas a amplificação da região RLEP3, incluindo as amostras inibidas, não foi observado diferença significativa entre a positividade da PCR e positividade ao IgM anti-PGL-1 (TABELA 10).

Tabela 10: Tabela de contingência entre o ensaio *ML-Flow* e RLEP PCR (incluindo amostras inibidas) em *swab* nasal de contactantes de casos novos de hanseníase, diagnosticados no CDERM, Fortaleza - CE, 2014/2015

RLEP PCR	<i>ML - FLOW</i>	
	Positivo N (%)	Negativo N (%)
Positivo	7 (50,0)	7 (50,0)
Negativo	22 (30,6)	50 (69,4)
Inibidas	5 (38,5)	8 (61,5)
TOTAL	34 (34,3)	65 (65,7)

Fonte: Próprio autor (2015). p de Qui-quadrado = 0,354.

5.7. Associação da positividade da RLEP PCR em relação ao *ML-Flow* e ao Índice Baciloscópico

Em relação a positividade da PCR das amostras não inibidas com a positividade ao anti-PGL-1, novamente não houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0,159$) (TABELA 11). Todavia, quando comparamos a positividade da PCR com a positividade no Índice Baciloscópico, foi observado diferença estatística, $p = 0,006$ (TABELA 11).

Tabela 11: Tabela de contingência entre a positividade ao RLEP PCR e o ensaio *ML-Flow* (anti-PGL-1) e Índice Baciloscópico (IB), excluindo-se as amostras de PCR inibidas, CDERM, Fortaleza - CE, 2014/2015

		RLEP PCR							
		Positivo	Negativo	p	k	S	E	VP⁺	VP⁻
		N (%)	N (%)			(%)	(%)	(%)	(%)
ML-FLOW				0,159 ¹	0,14	50,0	69,4	24,1	87,7
Positivo		7(24,1)	22 (75,9)						
Negativo		7(12,3)	50 (87,7)						
IB				0,006 ²	0,22	14,3	100,0	100,0	85,9
Positivo		2(100,0)	---						
Negativo		12(14,1)	73 (85,9)						

Fonte: Próprio autor (2015). (1) p de Qui-quadrado; (2) p de razão de verossimilhança. K - índice de concordância (kappa); S - sensibilidade; E - Especificidade; VP⁺ - Valor Preditivo Positivo; VP⁻ - Valor Preditivo Negativo.

5.8. Associação da positividade do teste *ML-Flow* e o Índice Baciloscópico em secreção nasal

Em relação a frequência da positividade ao anti-PGL-1 pela técnica *ML-Flow* e da positividade quanto a baciloscopia direta do *M. leprae* na secreção nasal, também não obtivemos diferença estatística, $p = 0,638$ (TABELA 12).

Tabela 12: Tabela de contingência entre o ensaio *ML-Flow* (anti-PGL-1) e o Índice Baciloscópico (IB), CDERM, Fortaleza – CE, 2014/2015

		ML - FLOW						
IB	Positivo	Negativo	k	S	E	VP⁺	VP⁻	
	N (%)	N (%)						(%)
			0,02	2,9	98,5	50,0	66,3	
Positivo	1 (50,0)	1 (50,0)						
Negativo	33(33,7)	65 (66,3)						
TOTAL	34(34,0)	66 (66,0)						

Fonte: Próprio autor (2015). $p = 0,638$ (razão de verossimilhança).

6 DISCUSSÃO

Analisando os casos índices, observamos que houve o predomínio de pessoas do sexo masculino 58%. Esse dado está de acordo com estudos de outros autores (SEHGAL *et al.*, 1988; IMBIRIBA *et al.*, 2005), onde relatam que a hanseníase em adultos é mais frequente no sexo masculino e o risco de exposição é determinante dessa diferença. Vale salientar que a maioria fazia parte da população economicamente ativa.

A forma clínica dimorfa foi a mais frequente (44,9%), seguidas pelas formas tuberculoide (29%), virchowiana (18,8%) e indeterminada (5,8%). Neste estudo, o percentual da forma indeterminada foi inferior ao encontrado nas formas polarizadas, permitindo supor que o diagnóstico está sendo feito tardiamente. Por outro lado, a maior frequência de formas paucibacilares, 56,5% (39/69), pode indicar que as atividades que visam o diagnóstico precoce de casos estão sendo eficientes.

O encaminhamento de casos (81,2%) foi o principal modo de detecção, em uma unidade de referência em hanseníase, seguido pela demanda espontânea, o que possibilita levantar duas hipóteses: a busca ativa está ocorrendo como preconizado, ou as equipes responsáveis pela atenção básica em saúde pública estão despreparadas para efetuar o diagnóstico da hanseníase.

A população de maior risco de desenvolver hanseníase são os contatos dos doentes (ANDRADE *et al.*, 2008). De acordo com nosso estudo, aproximadamente, 80% dos casos índices conviveram com pessoas portadoras de hanseníase.

A presença de incapacidades no momento do diagnóstico pode indicar que o mesmo está sendo tardio, pois elas se desenvolvem mais tardiamente, sugerindo um controle ineficaz da hanseníase (COSTA & PATRUS, 1989). Neste estudo, 85,5% dos casos índices não apresentaram nenhuma incapacidade no momento do diagnóstico, o que configura um bom indicador de qualidade do atendimento dos serviços. Entretanto, esse quadro foi analisado apenas no momento do diagnóstico e não sabemos como esses pacientes estarão ao final do tratamento específico, o que poderá ser objeto de estudo no futuro.

O nível de instrução da população acometida pela hanseníase é considerado um dos fatores de risco para o desenvolvimento das formas incapacitantes da doença (RIBEIRO & LANA, 2011). Segundo esse autores, 62,1% dos pacientes acometidos de hanseníase têm menos de oito anos de estudo. Na nossa população de estudo, esse número foi mais expressivo (73,9%), talvez pelo fato da pesquisa ter sido realizada na região Nordeste, onde

tradicionalmente, as pessoas de menor poder aquisitivo têm menos acesso aos bancos escolares.

A renda é um dos indicadores socioeconômicos que é utilizada para elaborar o IDH. Segundo o relatório divulgado pelo PNUD (Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento), o Brasil ocupa o 79º lugar no *ranking* mundial com 187 países, no ano de 2014, com um índice de 0,744, numa escala que vai de 0 a 1. Os aspectos econômicos podem influenciar as formas de enfrentamento dos problemas de saúde, bem como, ser diferentes em um mesmo indivíduo, de acordo com as etapas do processo de manutenção da saúde, juntamente com aspectos sociais e psicológicos (GERHARDT, 2006).

Neste estudo, a maioria dos casos 60,9% (42/69), tinha renda variando de 1,0 a 3,9 salários mínimos, 29% (20/69), com renda inferior a 1 salário mínimo. O baixo perfil socioeconômico imprime maior vulnerabilidade a essa população e aos seus contatos, podendo impactar negativamente no enfrentamento da hanseníase.

Quanto aos contactantes dos casos, podemos afirmar que estes representam a população de maior risco para desenvolver a hanseníase. A estratégia do exame de contatos faz parte dos programas de controle e deve ser estimulado e realizado de modo sistemático para permitir o diagnóstico e tratamento precoce da hanseníase (ANDRADE, 2008).

Fizemos a avaliação da detecção de infecção subclínica por *M. leprae*, utilizando três ensaios laboratoriais: Índice Baciloscópico em secreção nasal, PCR convencional para detecção do *M. leprae* em *swab* nasal e *ML-Flow* em sangue total. O percentual de positividade do IB de secreção nasal foi 1,98% (2/101), PCR convencional 16,1% (14/87) e *ML-Flow* 33,7% (34/101).

Esse é o primeiro estudo que buscou a detecção subclínica em contatos de casos novos de hanseníase, atendidos em uma Unidade de Referência, utilizando a determinação do Índice Baciloscópico para *M. leprae* em secreção nasal, no qual foi encontrado o percentual de positividade de 1,98% (2/101). Esse é um teste laboratorial de baixa sensibilidade, por requerer, no mínimo, para sua detecção, de 10^4 microorganismos por grama de tecido (ALMEIDA *et al.*, 2004), porém, tem alta especificidade (Tabelas 11 e 12). Outro estudo mostra que foi encontrado um percentual muito baixo de *M. leprae*, em amostra de secreção nasal (4%), em contatos de casos multibacilares não tratados (JOB *et al.*, 2008).

Acredita-se ainda, que os bacilos não estejam de forma contínua na mucosa nasal e que a maioria das infecções subclínicas poderia desaparecer espontaneamente, não evoluindo para o estágio de doença (MARTINS *et al.*, 2010).

Outros trabalhos têm demonstrado o uso da sorologia para determinar o anti-PGL-I e

PCR convencional para detecção do DNA do *M. leprae* em *swab* nasal, como estratégia para identificar o alto risco de hanseníase em contatos (ARAÚJO *et al.*, 2012).

A positividade do teste *ML-Flow* nos contactantes é um indicador indireto da disseminação da infecção pelo *Mycobacterium leprae*. Na população em geral, o achado de positividade oscila entre 15,6% a 20,5% (ANDRADE *et al.*, 2008). Em crianças esse percentual cai para 13,3% (ARAÚJO *et al.*, 2012). O nosso achado de 33,7% é justificado por esse estudo ter sido realizado em uma área endêmica para hanseníase. Em um trabalho realizado em Minas Gerais, obteve-se uma soropositividade em 17,8% (ANDRADE *et al.*, 2008), enquanto na Amazônia, a soropositividade chega a 37,5% em contatos menores de 15 anos (BARRETO *et al.*, 2012). Além disso, é importante ressaltar que os levantamentos populacionais sugerem que a infecção subclínica é muito mais comum que a manifestação clínica da doença (ANDRADE *et al.*, 2008).

Alguns autores questionam a falso positividade dos resultados da sorologia, visto que, a presença de anticorpos anti-BSA (soro de albumina bovina) no soro de indivíduos saudáveis podem interferir no resultado de testes sorológicos (ROTHBERG E FARR, 1965; SJÖWALL *et al.*, 2011). Todavia em estudo mais recente foi confirmado, que o uso de HSA (soro de albumina humana) como transportador de Antígeno não aumenta, nem melhora o desempenho dos testes sorológicos de hanseníase (MOURA *et al.*, 2014). Além disso, segundo FRANKEL, 2010, o anticorpo anti-PGL-1 não é específico para *M. leprae*, como citado por SPENCER *et al.*, 2005, pelo menos no cenário Indiano, porque reage de forma cruzada com antígenos de *Leishmânia donovani*. No nosso estudo, nenhum dos contatos apresentava diagnóstico para leishmaniose.

A maior soropositividade ocorreu entre onze e quinze anos incompletos, 37,5%. Esse dado pode ser justificado pelo longo período de incubação (SELVASEKAR, 1999), visto que, o aumento da soropositividade com a idade evidencia que a carga bacilar aumenta com o passar do tempo (FERREIRA e ANTUNES, 2008) e também observado no estudo realizado no Ceará (FROTA *et al.*, 2010). Entretanto, o número de crianças infectadas entre cinco e dez anos mostra que há um contato precoce com o bacilo.

Em relação ao sexo, a maior frequência de contatos ocorreu no sexo feminino 39,5% (17/43). Esta predominância dos contatos serem do sexo feminino ao contrário do observado nos casos também já foi relatado em estudo realizado no Ceará (FROTA *et al.*, 2010). Segundo alguns autores (SEHGAL *at al.*, 1988; IMBIRIBA *at al.*, 2005), a hanseníase em adultos é mais frequente no sexo masculino. Entretanto, em relação às crianças, não há diferenças segundo o sexo (SELVASEKAR *at al.*, 1999). Não existe consenso na literatura

para esse achado. Um estudo mais recente, (BARRETO *et al.*, 2012), detectou uma taxa de 53,3% de soropositividade para anti-PGL-1 em contatos de portadores de hanseníase, na idade escolar, do sexo feminino na região amazônica.

Com relação a classificação operacional do caso índice, a maior soropositividade ocorreu entre os contatos dos casos paucibacilares, contrariando o que a maioria dos trabalhos preconiza, que os casos multibacilares são os transmissores em potencial. Não houve diferença estatística para essa variável. Alguns estudos não encontram essa diferença de soropositividade entre contatos de casos multibacilares e paucibacilares (ULRICH *et al.*, 1991; JAIN *et al.*, 2002; MARTINS *et al.*, 2010). Esse resultado aponta a importância e a inclusão da forma PB como fonte transmissora.

Observamos uma soropositividade mais expressiva em contactantes que dormiam em ambientes compartilhados com mais de uma pessoa, o que vem de encontro com a literatura, que admite ser o convívio em aglomerados, um fator significativo para a transmissão da doença (ANDRADE *et al.*, 1994; SOUSA *et al.*, 2013).

Não houve diferença da soropositividade nos contatos em relação à cicatriz de BCG ($p = 0,260$). Outros trabalhos corroboram com esse achado (FINE *et al.*, 1998; BAKKER *et al.*, 2006; BARRETO *et al.*, 2012). Esse resultado é esperado, uma vez que o ensaio de *ML-Flow* relaciona-se com a presença de anticorpos para o *M. leprae*, imunidade humoral. Entretanto, é relatado o efeito protetor da vacina BCG pois, a maioria dos contatos soropositivos vacinados desenvolve hanseníase PB com manifestações clínicas de dimorfa tuberculóide (MOURA *et al.*, 2008 e ARAÚJO *et al.*, 2015). Em indivíduos maiores de 15 anos é observado que a ausência da cicatriz da BCG é fator de risco para hanseníase (FROTA *et al.*, 2010).

A utilização de técnicas, como a PCR convencional, vem contribuir para a detecção do *M. leprae* e auxiliar os métodos tradicionais de diagnóstico da doença, como a baciloscopia e histopatologia, constituindo um grande avanço em relação ao diagnóstico clínico. Como a doença pode estar relacionada à associação de fatores genéticos e ambientais, além da exposição ao bacilo, a positividade da PCR em amostras de sangue e secreção nasal de contatos não caracteriza obrigatoriamente o adoecimento (ALMEIDA *et al.*, 2004).

A avaliação extensiva dos testes em estudos de campo, baseados em PCR têm mostrado uma especificidade de 100% e uma sensibilidade variando de 34% a 80% em pacientes com formas PB da hanseníase, para uma maior de 90% em pacientes com formas MB (SCOLLARD *et al.*, 2006).

Nesse estudo, o ensaio de PCR convencional, em *swab* nasal de contactantes de

portadores de hanseníase, teve uma positividade de 16,1 %. Outros trabalhos mostram frequências que variam de 1,6% a 19,35% (CARDONA *et al.*, 2008; MARTINEZ *et al.*, 2011; MARTINS *et al.*, 2010), como por exemplo, 4% (JOB *et al.*, 2008), 4,7% (ARAÚJO *et al.*, 2012), 9,8% (PATTYN *et al.*, 1993), 8,9% (CABRAL *et al.*, 2013), 12,8% (GUERRERO *et al.*, 2002) e 19% (de WIT *et al.*, 1993). Quando incluímos as amostras inibidas o percentual se reduz a 13,9% (14/101). Assim, nossos resultados ficaram dentro do intervalo de positividade encontrado na literatura.

Quantificamos todas as amostras de DNA extraído e as agrupamos de acordo com os resultados das análises de PCR convencional, em inibidas e não inibidas. Observamos que, de acordo com medidas estatísticas, as razões da medida da absorbância 260/280nm, em ambos os grupos, ficaram dentro do intervalo que caracteriza uma boa qualidade do material genético (1,8 – 2,0). Verificamos, contudo, que as amostras que se apresentaram como inibidas tinham uma concentração baixa de DNA, em relação as não inibidas. Esse último achado parece justificar os resultados de RLEP PCR inibidos.

Em relação a confirmação da especificidade da PCR, duas amostras RLEP PCR positivas (19D e 19E), foram confirmadas por sequenciamento da região de interesse com os mesmos iniciadores empregados na amplificação. Deste modo, o produto sequenciado foi comparado com seqüência referência RLEP3 (*GenBank* acesso X17153), confirmando assim a positividade das amostras analisadas.

Segundo a análise descritiva dos dados, houve diferença estatisticamente significante, quanto a positividade da RLEP PCR em relação a faixa etária, com destaque para o intervalo de 11 a 15 anos incompletos com percentual mais expressivo 38,7%. Como na análise do teste *ML-Flow*, esse dado pode ser justificado pelo longo período de incubação da patologia. Entretanto, crianças entre cinco e dez anos também manifestaram um contato precoce com o bacilo 3,6%. Assim, a presença do DNA do *M. leprae*, na mucosa nasal dos contactantes menores de quinze anos, reflete a presença do bacilo no nariz, o qual deve ser a fonte de entrada e saída (ARAÚJO *et al.*, 2012).

Ao contrário do *ML-Flow*, a positividade para RLEP PCR foi levemente mais elevada no sexo masculino em relação ao sexo feminino. Todavia esses dados não configuram diferença estatística.

Com relação a classificação operacional do caso-índice, a maior positividade para RLEP PCR ocorreu entre os contactantes dos casos PB. Esse achado não teve significância estatística, porém, sugere que os casos PB também podem ser agentes transmissores.

Segundo Lobato *et al.*, 2011, indivíduos sem a cicatriz de BCG têm um alto risco de

desenvolver hanseníase. No nosso estudo, os resultados não tiveram significância estatística para essa variável, quando fizemos a análise de positividade RLEP PCR em relação a presença e ausência de cicatriz de BCG nos contactantes.

A presença do DNA do *M. leprae* na mucosa nasal dos contactantes reflete a presença do bacilo nesse sítio, não determinando infecção, mas pode ser uma fonte de infecção ou transmissão (ARAÚJO *et al.*, 2012). Cruzando-se os resultados de RLEP PCR com *ML-Flow*, entendemos que o bacilo estimulou a resposta imune e pode indicar infecção subclínica. Vale salientar que todos os casos de baciloscopia positiva tiveram resultado positivo para RLEP PCR, confirmando a presença do bacilo na mucosa nasal dos contactantes desse estudo.

Avaliando-se a associação do teste *ML-Flow* em relação a RLEP PCR, observamos que os percentuais obtidos não tiveram significância estatística, visto que 12,9% do ensaio RLEP ficaram inibidas. O mesmo aconteceu em relação a associação da sensibilidade do *ML-Flow* e o IB em secreção nasal, possivelmente devido a baixa frequência de positividade do IB, de 2 casos somente.

A concordância entre RLEP PCR e *ML-Flow*, bem como, entre RLEP PCR e IB secreção nasal foi considerada fraca, kappa= 0,14 e 0,22, respectivamente. Não houve associação entre RLEP PCR e *ML-Flow*, p=0,159. Encontramos uma sensibilidade de 50% e especificidade equivalente a 69,4% para *ML-Flow*. Mesmo não encontrando associação entre esses testes, a detecção de anticorpos Anti-PGL-1 pode auxiliar na detecção subclínica da hanseníase (BÜHRER-SEKULA *at al.*, 2000). Entretanto, as pesquisas sorológicas não refletem infecção em todos os indivíduos, já que a maioria das pessoas expressa resistência ao *M. leprae* e, mesmo adoecendo, apresenta baixa carga bacilar (PB) e conseqüentemente, baixos níveis de imunoglobulina do tipo IgM reagindo contra o PGL-1. (MARTINS *et al.*, 2010).

Encontramos associação entre RLEP PCR e IB secreção nasal, p=0,006. Nos nossos resultados, todos os contactantes com IB positivo, tiveram RLEP PCR positiva. Todavia, a baciloscopia de secreção nasal em contatos apresentou baixa sensibilidade em relação a RLEP PCR e em relação a *ML-Flow*. Este fato pode ser explicado, devido a técnica de IB em secreção nasal requerer no mínimo 10^4 microorganismos por grama de tecido, como já foi mencionado anteriormente. Foi encontrada uma especificidade de 98,5% do IB em secreção nasal, em relação ao teste *ML-Flow*. Esse achado está de acordo com o valor encontrado por Contin *et al.*, 2011, (E=90,2%).

Supõe-se a existência de infecção subclínica transitória em contatos e que esta possa

ser consequência da descarga nasal de pacientes bacilíferos, com desenvolvimento ou não da doença. Esse fato sugere que a mucosa nasal seja o provável sítio inicial da resposta imunológica (MARTINS *et al.*, 2010). Muitos autores admitem, que não somente os doentes de hanseníase, mas também, contatos saudáveis, poderiam ser carreadores assintomáticos do *M. leprae* na mucosa nasal.

7. CONCLUSÕES

Isoladamente, os exames da secreção nasal não permitiram a detecção de infecção subclínica da hanseníase, mas com a combinação das três técnicas usadas nesse estudo, foi possível identificar os contatos que deveriam ser monitorados e que poderiam ter papel importante na transmissão da doença.

A PCR de DNA de *M. leprae* aliada à sorologia de anticorpos anti-PGL-I se mostraram como ferramentas sensíveis e específicas. Tais técnicas quando utilizadas em conjunto auxiliam no monitoramento dos contatos com maior risco de desenvolver a doença, principalmente na infância. A detecção do bacilo por PCR aliada à investigação da soropositividade ao anti-PGL-1 indica que o bacilo presente na cavidade nasal estimulou a resposta imune e pode indicar infecção subclínica, enquanto PCR positiva com *ML-Flow* negativo indica abortamento da infecção ou futuro caso PB.

A baciloscopia do raspado nasal se mostrou como técnica de baixa sensibilidade, que isoladamente não se mostrou eficaz no nosso objetivo, sendo necessário, o emprego de outras técnicas laboratoriais para a detecção de infecção subclínicas de contatos de pacientes portadores de hanseníase.

Visando o controle da epidemia, a vigilância dos contatos deve ser contínua. Os contatos domiciliares, especialmente, os menores de quinze anos, devem ser examinados sistematicamente, possibilitando, cada vez mais, diagnóstico precoce e tratamento adequado, e diminuição das fontes de infecção na população.

Este estudo sugere, portanto, a necessidade de novas políticas públicas a serem adotadas em relação aos contatos de hansenianos, principalmente em crianças. Assim, propomos como alternativas para os casos detectados com infecção subclínica, o seguinte protocolo: acompanhamento sistemático, de acordo com ANDRADE *et al.*, 2008; quimioprofilaxia, como foi proposto por GOULART *et al.*, em 2008. Adicionalmente, nós propomos o acompanhamento com repetição dos testes para os contatos PCR (+) e *ML-Flow* (-); o tratamento com esquema de quimioprofilaxia para os contatos PCR (-) e *ML-Flow* (+), e o tratamento obedecendo o esquema para PB para os contatos PCR (+) e *ML-Flow* (+), com o objetivo de se evitar que evoluam para a condição clínica da doença.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, E. C.; MARTINEZ, A. N.; MANIERON, V. C.; SALES, A. M.; DUPPRE, N. C.; SARNO, E. N.; SANTOS, A. R.; MORAES, M. O. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA by polymerase chain reaction in the blood and nasal secretion of Brazil household contacts. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 99, p. 509-511, 2004.
- ANDRADE, V. L. G.; SABROZA, P. C.; ARAÚJO, A. J. G. Factores Associated with Household and Family in Leprosy Transmission in Rio de Janeiro, Brazil. **Cad, Saúde Públ.** Rio de Janeiro, 10 (supplement 2): 281-292, 1994.
- ANDRADE, A. R. C. Soroprevalência do teste ML-Flow em contatos de hanseníase de Minas Gerais. 2007. **Dissertação (Mestrado)** – Programa de Pós – Graduação em Ciências da Saúde, Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.
- ANDRADE, A. R. C.; GROSSI, M. A. F.; BÜHRER-SÉKULA, S.; ANTUNES, C. M. F. Seroprevalence of ML FLOW test in leprosy contacts from state of Minas Gerais, Brazil. **Rev. Bras. Med. Trop.** SII, 41: 56-59, 2008.
- ARAÚJO, M. G. Hanseníase no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** 2003, 36, 3.
- ARAÚJO, S.; LOBATO, J.; REIS, E. M.; SOUZA, D. O. B.; GONÇALVES, M. A.; COSTA, A. V.; GOULART, L. R.; GOULART, I. M. B. Unveiling healthy carries and subclinical infections among household contacts of leprosy patients who play potential roles in the disease chain of transmission. **Mem. Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 107, sup. 1- Rio de Janeiro, Dec. 2012.
- ARAÚJO, S.; REZENDE, M. M.; SOUSA, D. C.; ROSA, M. R.; SANTOS, D. C.; GOULART, I. M. Risk-benefit assessment of Bacillus Calmette-Guérin vaccination, antiphenolic glycolipid I serology, and Mitsuda test response: 10-year follow-up of household contacts of leprosy patients. **Rev Soc Bras Med Trop.** 2015. Dec; 48 (6): 739-45.
- BAEK, S-H.; LI, A. H.; SASSETTI, C. M. Metabolic Regulation of Mycobacterial Growth and Antibiotic Sensitivity. **PLoS Biol** 9 (5): e 1001065. doi: 10.1371/journal.pbio. 1001065. 2011. May.
- BAKKER, M. I.; HATTA, M.; KWENANG, A.; VAN MOSSEVELD, P.; FABER, W. R.; KLATSER, P. R.; OSKAM, I. Risk factors for developing leprosy – a population-based cohort study in Indonesia. **Leprosy Review**, 77: 48-61, 2006.
- BARRETO, J. G.; GUIMARÃES, L. S.; FRADE, M. A. C.; ROSA, P. S.; SALGADO, C. G. High rates of undiagnosed leprosy and subclinical infection amongst school children in the Amazon Region. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, vol. 107, suppl. 1: 60-67 – rio de Janeiro, 2012.
- BARROS, R. P. C.; OLIVEIRA, M. L. W.; Detecção de anticorpos específicos para antígeno glicolípide fenólico -1 do *M. leprae* (anti PGL- 1 IgM): aplicações e limitações. **An, bras, dermatol**:75(6):754-753, nov.-dez. 2000.

BAZAN - FURINI, R. Detecção precoce da hanseníase por exame de contatos domiciliares, a determinação dos níveis séricos de anti-PGL-1 anticorpos e consanguinidade. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. vol. 106. nº 5. Rio de Janeiro, ago 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Área Técnica de Dermatologia Sanitária. **Guia para o controle de hanseníase**. Cadernos de Atenção Básica, nº10. Brasília, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Coordenação geral de hanseníase e doenças em eliminação**. Brasília-DF, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Coordenação geral de hanseníase e doenças em eliminação**. Brasília-DF, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portal Brasil**: www.brasil.gov.br/saude/2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº 3.125, de 7 de outubro de 2010**. Aprova as diretrizes para vigilância, atenção e controle da hanseníase 2010. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/portaria_n_3125_hanseniasse_2010.pdf . Acesso em: 29 nov. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de vigilância epidemiológica. **Hanseníase e direitos humanos**: direitos e deveres dos usuários do SUS. Brasília, 2008.

BRASIL. 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.: II – (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Ciência e Tecnologia. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. **Rev. Saúde Pública**. 2010;44:200-2.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema de informação de agravos e notificação. **Sistema nacional de vigilância em saúde**: relatório de situação, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Plano Integrado de Ações Estratégicas. **Plano de Ação 2011-2015**. Brasília-DF, 2013.

BRASIL, Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Secretaria Municipal de Saúde de Fortaleza. **Célula de Vigilância Epidemiológica de Fortaleza**. Relatório parcial de situação em Fortaleza-Ce, 2015.

BRAZ, J. Nasal mucosa study of leprosy contacts with positive serology for the phenolic glycolipid 1 antigen. **Otorhinolaryngol** 2010, 76: 579-87.

BRIGHTBILL, H. D.; LIBRATY, D. H.; KRUTZIK, S. R.; YANG, R. B.; BELISLE, J. T.;

BLEHARSKI, J. R.; MAITLAND, M.; NORGDARD, M. V.; PLEVY, S. E.; SMALE, S. T.; BRENNAN, P. J.; BLOOM, B. R.; GODOWSKI, P. J.; MODLIN, R. L. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. **Science**, v. 285, p. 732-736, 1999.

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

BROWNE, S. G. Leprosy – an imported disease. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 64, n. 2, p. 223-227, 1970.

BÜHRER, S. S.; SMITS, H. L.; GUSSENHOVEN, G. C.; VAN INGEN, C. W.; KLATSER, P. R.. 1998. A simple dipstick assay for the detection of antibodies to phenolic glycolipid-I of *Mycobacterium leprae*. **Am.J.Trop.Med.Hyg.** 58, 133-136.

BÜHRER-SÉKULA, S.; HAMERLINCK, F. F.; OUT, T. A.; BORDEWIJK, L. G.; KLATSER P.R. 2000. Simple dipstick assay for semi-quantitative detection of neopterin in sera. **Journal Immunology Methods**. 21; 238 (1-2): 55-8.

BÜHRER-SÉKULA, S.; SMITS, H. C.; GUSSENHOVEN, G. C.; VAN LEEUWEN, J.; AMADOR, S.; FUJIWARA, T.; KLATSER, P. R.; OSKAM, I. Simple and fast lateral flow test for classification of leprosy patients and identification of contacts with high risk of developing leprosy. **Journal of Clinical Microbiology**. 41(5): 1991-1995, 2003.

CABRAL, P. B. ; JÚNIOR, J. E. C. ; MACEDO, A. C. ; ALVES, A. R. ; GONÇALVES, T. B. ; CABRAL, T. C. B. ; GONDIM, A. P. S. ; PINTO, M. I. M. ; OSEKI, K. T. ; CAMARA, L. M. C. ; RABENHORST, S. H. B. ; NAGAO-DIAS, A. T. Anti-PGL1 salivary IgA/IgM, serum Ig G/IgM, and nasal *Mycobacterium leprae* DNA in individuals with household contact with leprosy. **International Journal of Infectious Diseases**. 17 (2013) e 1005-e 1010.

CALADO, K. L. S. Positividade sorológica anti PGL-1 em contatos domiciliares e peridomiciliares de hanseníase em área urbana. **An. Bras. Dermatologia**. 2005; 80 (supl 3): S 301-6.

CALLEGARO FILHO, D. ; SHRESTHA, N. ; BURDICK, A. E. ; HASLETT, P. A. A potencial role complement in immune evasion by *Mycobacterium leprae*. **J. Drugs Dermatol.**, v. 9, n. 11, p. 1373-1382, 2010.

CARDONA-CASTRO, N. ; BELTRAN-ALZATE, J. C. ; MANRIQUE-HERNANDEZ, R. Survey to identify *Mycobacterium leprae* – infected household contacts of patients from prevalent regions of leprosy in Colombia. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 2008 : 103 :332-6.

CASADEVALL, A. L.; PIROFSKI, L. A. Host-pathogen interactions: basic concepts of microbial commensalism, colonization, infection, and disease. **Infect Immun**. Dec;68(12):6511-8. 2000.

CEARÁ. Secretaria da Saúde do Ceará. Situação Epidemiológica de Hanseníase no Ceará. **Inf. Epidemiol. Hanseníase**, ago. 2014. Disponível em <http://portal.saude.ce.gov.br/saude> Acesso em: 19 fev. 2015.

COLE, S. T.; EIGLMEIER, K.; PARKHILL, J.; JAMES, K. D.; THOMSON, N. R.; WHEELER, P. R.; HONORE, N.; GARNIER, T.; CHURCHER, C.; HARRIS, D.; MUNGALL, K.; BASHAM, D.; BROWN, D.; CHILLINGWORTH, T.; CONNOR, R.; DAVIES, K. M.; DEVLIN, K.; DUTHOY, S.; FELTWELL, T.; FRASER, A.; HAMLIN, N.; HOLROYD, S.; HORNSBY, T.; JAGELS, K.; LACROIX, C.; MACLEAN, J.; MOULE, S.; MURPHY, L.; OLIVER, K.; QUAIL, M. A.; RAJANDREAM, M. A.; RUTHERFOLD, K. M.; RUTTER, S.; SEEGER, K.; SIMON, S.; SIMMONDS, M.; SKELTON, J.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; STEVENS, K.; TAYLOR, K.; WHITEHEAD, S.; WOODWARD, J. R.; BARREL, B. G. Massive gene decay in the leprosy bacillus. **Nature** 409, 1007-1011, 2001.
CONGRESSO INTERNACIONAL DE LEPROLOGIA, 1953 *apud* SOUZA, 1997.

CONTIN, L. A.; FOGAGNOLO, L.; BARRETO, J. A.; NOGUEIRA, M. E.; ALVES, C. J. M.; NASSIF, P. W.; LAURIS, J. R. P. Use of the ML-Flow test as a tool in classifying and treating leprosy. **An Bras Dermatol.** 2011; 86 (1):91-5.

COSTA, I.M.C.; PATRUS, A. O. Incapacidades físicas em pacientes de hanseníase na faixa de zero a 14 anos, no Distrito Federal, no período de 1979 a 1989. **An Bras Dermatol.** 1992;67(5):245-9.

CRESPO, M. J.; GONÇALVES, A. Avaliação das possibilidades de controle da hanseníase a partir da poliquimioterapia. **Rev Port Saúde Pública. Elsevier.** 2014; 32(1): 80-88.

de WIT, M. Y.; DOUGLAS, J. T.; MCFADDEN, J.; KLATSER, P. R. Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium leprae* in nasal swab specimens. **J. Clin. Microbiol.** 31, p. 502-506, 1993a.

DOUGLAS, J. T.; WORTH, R. M. Field evaluation of an ELISA to detect antibody in leprosy patients and their contacts. **International Journal of Leprosy and other Mycobacterial Diseases.** 1984. 52: 26-33.

de SOUSA, A. A.; OLIVEIRA, F. J. F.; COSTA, A. C. P. J.; NETO, M. S.; CAVALCANTE, E. F. O.; FERREIRA, A. G. N. Adesão ao tratamento da hanseníase por pacientes acompanhados em unidades básicas de saúde de Imperatriz – Ma. **SANARE**, Sobral, V. 12, n. 1, p. 06-12, jan./jun. 2013.

de SOUZA, V. N. B.; IYER, A. M.; LAMMAS, D. A.; NAAFS, B.; DAS, P. K. Advances in Leprosy Immunology and the Field application: A Gap to Bridge. **Clinics in Dermatology.** 34, p. 82-95. 2016.

EUZÉBY, J. P.: List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, 47, 590-592, 1997. (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. <http://www.bacterio.net>). Disponível em: < Referência: <http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.html>>Acesso em:29/Set/15.

FERREIRA, M. A. A.; ANTUNES, C. M. F. Factors associated with ML-Flow test seropositivity in leprosy patients and household contacts under the age of 18. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** 41 (Suplemento II):60-66, 2008.

FINE, P. E. M.; PONNIGHAUS, J. M.; BURGESS, P.; CLARKSON, J. A.; DRAPER, C. C. Seroepidemiological studies of leprosy in northern Malawi based on an enzyme-linked

immunosorbent assay using synthetic glycoconjugate antigen. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, 56: 243-254, 1998.

FORTALEZA. Prefeitura Municipal. Acesso em www.fortaleza.ce.gov.br>regionais, em 23 de março de 2015.

FRANKEL, R. I. Is Phenolic Glycolipid – 1 Really a Specific Antigen for Leprosy? **Clinical Infectious Diseases**. 50, 937-938. 2010.

FROTA, C. C.; FREITAS, M. V. C.; FOSS, N. T.; LIMA, L. N. C.; RODRIGUES, L. C.; BARRETO, M. L.; KERR, L. R. S. Seropositivity to anti-phenolic glycolipid-I in leprosy cases, contacts and no known contacts of leprosy in na endemic and a non-endemic area in northeast Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**.104 (2010); 490-495.

FROTA, C. C.; LIMA, L. N.; ROCHA, A. S.; SUFFYS, P. N.; ROLIM, B. N.; RODRIGUES, L. C.; BARRETO, M. L.; KENDALL, C.; KERR, L. R. Mycobacterium leprae in six-banded (*Euphractus sexcinctus*) and nine-banded armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in Northeast Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, 107, Suppl 1, p. 209-213, 2012.

GERHARDT, T. E. Itinerários terapêuticos em situações de pobreza: diversidade e pluralidade. **Cad Saúde Pública**, 2006; 22 (11): 2449-63.

GONÇALVES, H. S. Fórum: Reações hansênicas Fortaleza-Ceará. Estados reacionais na Hanseníase: enfoque diagnóstico e manejo. **Centro de Dermatologia Dona Libânia**. Junho, 2013.

GOULART & GOULART. Hanseníase: desafios diagnósticos e controle de uma doença em todo o mundo. **Arquivos de Investigação Dermatológica**. Volume 300. Issue 6, pp 269-290, Julho 2008.

GOULART, I. M.; CARDOSO, A. M.; SANTOS, M. S.; GONÇALVES, M. A.; PEREIRA, J. E.; GOULART, L. R. Detection of Mycobacterium leprae DNA in skin lesions of leprosy patients by PCR may be affected by amplicon size. **Arch. Dermatol. Res.**, v. 299, p. 267-227, 2007.

GRANGE, J.M. The biology of the genus Mycobacterium. **Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser.** 25, 1S-9S. 1996.

GUERRERO, M. I.; ARIAS, M. T.; GARCES, M. T. Developing and using a PCR test to detect subclinical *Mycobacterium leprae* infection. **Rev Panam Salud Publica**. 2002; 119 (40): 228-34.

HARRINGTON, L. E.; MANGAN, P. R.; WEAVER, C. T. Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. **Curr Opin Immunol**. 2006; 18:349 – 56.

HERSHKOVITZ, I.; DONOGHUE, H. D.; MINNIKIN, D. E.; BESRA, G. S.; LEE, O. Y.; GERNAEY, A. M.; GALILI, E.; ESHED, V.; GREENBLATT, C. L.; LEMMA, E.; BARGAL, G. K.; SPIGELMAN, M. Detection and molecular characterization of 9,000-year-old *Mycobacterium leprae* from a Neolithic settlement in the Eastern Mediterranean. **PLoS One**.

2008;3(10):e3426. doi:10.1371/journal.pone.0003426. Epub 2008. Oct 15.

IMBIRIBA, E. B.; HURTADO-GUERRERO, J. C.; GARNELO, L.; LEVINO, A.; CUNHA, M. da G.; PEDROSA, V. Perfil Epidemiológico da Hanseníase em menores de quinze anos de idade. Manaus (AM), 1998-2005. **Revista Saúde Pública**. 2008; (42)6: 1021-6.

IYER, A. M. Immunopathology of leprosy: towards the search for diagnostic and prognostic biomarkers in elucidating pathobiology and their utility in patient care. 2009. 170f. **Thesis** – Department of Pathology. Academic Medical Center, University of Amsterdam, Amsterdam, 2009.

JAIN, S.; REDDY, R. G.; OSMANI, S. N.; LOCKWOOD, D. N.; SUNEETHA, S. Childhood leprosy in an urban clinic, Hyderabad, Índia: clinical presentation and the role of household contacts. **Leprosy Review** 73: 248-253, 2002.

JI B. Accompanied MDT (AMDT)-more questions than answers. *Lepr Rev.* 2002; 73: 301-307.

JOB, C. K.; JAYAKUMAR, J.; KEARNEY, M.; GILLIS, T. P. Transmission of leprosy: a study of skin and nasal secretions of household contacts of leprosy patients using PCR. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 78, p. 518-521, 2008.

JOB, C. K.; JAYAKUMAR, J.; WILLIAMS, D. L.; GILLIS, T. P. 1997. Role of polymerase chain reaction in the diagnosis of early leprosy. **Int.J.Leprosy.Other Mycobact.Dis.** 65, 461-464.

KLATSER, P. R.; VAN, B. S.; MADJID, B.; DAY, R.; de WIT, M. Y. Detection of *Mycobacterium leprae* nasal carriers in populations for which leprosy is endemic. **J. Clin. Microbiol.** 31, p. 2947-2951, 1993.

LAVANIA, M.; KATOCH, K.; KATOCH, V. M.; GUPTA, A. K.; CHAUHAN, D. S.; SHARMA, R.; GANDHI, R.; CHAUHAN, V.; BANSAL, G.; SACHAN, P.; SACHAN, S.; YADAV, V. S.; JADHAV, R. Detection of viable *Mycobacterium leprae* in soil samples: insights into possible sources of transmission of leprosy. **Infect. Genetic. Evol.**, 8, p. 627-631, 2008.

LIPSCOMB, M. F.; MASTEN, B. J. Dendritic cells: immune regulators in health and disease. **Physiol Rev.** 2002; 82:97-130.

LOBATO, J.; COSTA, M. P.; REIS, E. M.; GONÇALVES, M. A.; SPENCER, J. S.; BRENNAN, P. I. Comparison of three immunological tests for leprosy diagnosis and detection of subclinical infection. **Lep Rev.** 2011; 82:389 - 401.

MARTINS, A. C. C.; MIRANDA, A.; OLIVEIRA, M. L. W.; BÜHRER-SÉKULA, S.; MARTINEZ, A. Nasal mucosa study of leprosy contacts with positive serology for the phenolic glycolipid 1 antigen. **Braz J Otorhinolaryngol.** 2010; 76(5): 579-87.

MARTINEZ, A. N. Detecção de *Mycobacterium leprae* através de PCR e RT-PCR em tempo real. Rio de Janeiro-RJ, 2009. 147 f. **Tese (doutorado) Instituto Oswaldo Cruz.** Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2009a.

MARTINEZ, A. N.; LAHIRI, R.; PITTMAN, T. L.; SCOLLARD, D.; TRUMAN, R.; MORAES, M. O.; WILLIAMS, D. L. 2009b. Molecular determination of *Mycobacterium leprae* viability by use of real-time PCR. **J.Clin.Microbiol.** 47, 2124-2130.

MARTINEZ, A. N.; RIBEIRO-ALVES, M.; SARNO, E. N.; MORAES, M. O. Evaluation of qPCR-based assays for leprosy diagnosis directly in clinical specimens. **PLoS. Negl. Trop. Dis.** 5, e 1354, 2011.

MATSUOKA, M.; IZUMI, S.; BUDIAWAN, T.; NAKATA, N.; SAEKI, K. *Mycobacterium leprae* DNA in daily using water as a possible source of leprosy infection. **Indian J. Lepr.** 71, p. 61-67, 1999.

MATSUOKA, M. Drug resistance in leprosy. **Jpn J Infect Dis.** 2010;63:1-7.

MEIMA, A.; SMITH, W. C.; van OORTMARSSSEN, G. J.; RICHARDUS, J. H.; HABBEMA, J. D. The future incidence of leprosy: A scenario analysis. **Bull World Health Organ.** 2004;82: 373-80.

MIRA, M. T.; ALCAÏS, A.; NGUYEN, V. T.; MORAES, M. O.; DI FLUMERI, C.; VU, H. T. *et al.* Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. **Nature**, v. 12, n. 427, p. 636-640, 2004.

MODLIN, R. L. The innate immune response in leprosy. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 22, n. 1, p. 48-54, 2010.

MONOT, M.; HONORE, N.; GARNIER, T.; ARAOZ, R.; COPPEE, J. Y.; LACROIX, C.; SOW, S.; SPENCER, J. S.; TRUMAN, R. W.; WILLIAMS, D. L.; GELBER, R.; VIRMOND, M.; FLAGEUL, B.; CHO, S. N.; JI, B.; PANIZ-MONDOLFI, A.; CONVIT, J.; YOUNG, S.; FINE, P. E.; RASOLFO, V.; BRENNAN, P. J.; COLE, S. T. On the origin of leprosy. **Science** 308, 1040-1042, 2005.

MONTESUMA, B. O. X. Subpopulações de linfócitos em pacientes com formas reacionais de hanseníase atendidos no Centro de Dermatologia D. Libânia, em Fortaleza-Ce. **Dissertação (Mestrado)** – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

MORAES, M. O.; CARDOSO, C. C.; VANDERBORGHT, P. R.; PACHECO, A. G. Genetics of host response in leprosy. **Lepr. Rev.**, v. 77, n. 3, p. 189-200, 2006.

MOURA, R. S.; CALADO, K. L.; OLIVEIRA, M. L. W.; BÜHRER-SÉKULA, S. Sorologia da hanseníase utilizando PGL-I: revisão sistemática. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 41(Suplemento II): 11-18, 2008.

MOURA, R. S.; PENNA, G. O.; FUJIWARA, T.; PONTES, M. A. A. P.; CRUZ, R.; GONÇALVES, H. S.; PENNA, M. L. F.; CARDOSO, L. P. V.; STEFANI, M. M. A.; BÜHRER-SÉKULA, S. Evaluation of a rapid serological test for leprosy classification using human sérum albumin as the antigen carrier. **J. of Immunological Methods.** 412, 35-41. 2014.

NOORDEEN, S. K. Leprosy control through multidrug therapy (MDT). **Bull. World Health**

Organ., v. 69, n. 3, p. 263-269, 1991.

NOORDEEN, S. K. Elimination of leprosy as a public health problem. **Indian J. Lepr.**, 66, p. 1-10, 1994.

PATTYN, S. R.; URSI, D.; LEVEN, M. Detection of *Mycobacterium leprae* by the polymerase chain reaction in nasal swabs of leprosy patients and their contacts. **Int J Lepr Other Mycobact Dis.** 1993;61(3):389-93.

PATROCINIO, L. G.; GOULART, I. M.; GOULART, L. R.; PATROCINIO, J. A.; FERREIRA, F. R.; FLEURY, R. N. 2005. Detection of *Mycobacterium leprae* in nasal mucosa biopsies by the polymerase chain reaction. **FEMS Immunol.Med.Microbiol.** 44, 311-316.

PINHEIRO, R. O.; DE SOUZA, S. J.; SARNO, E. N.; SAMPAIO, E. P. 2011. *Mycobacterium leprae*-host-cell interactions and genetic determinants in leprosy: an overview. **Future.Microbiol.** 6, 217-230.

PNUD - Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento. Brasília, 2014 [acesso em 07 setembro 2015]. Disponível em www.amcham.com.br.

RESS, R. F. W. The microbiology of leprosy. In: **Hastings RC (ed) Leprosy**, 1st edition, Churchill Livingstone Inc, New York, p. 31-52, 1985.

RIBEIRO, G. C.; LANA, F. C. Hanseníase e escolaridade: influência dos anos de estudo para o desenvolvimento de incapacidades físicas na microrregião de Diamantina – Minas Gerais. **Hansen. Int.** 2011; 36 (suppl. 1):147.

RIDLEY, D. S. **Bacterial Indices**. USA: John Wright and Sons Ltd, 1964-1966.

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.

ROTHBERG, R. M.; FARR, R. S. Anti-bovine serum albumin and anti-alpha lactalbumin in the serum of children and adults. **Pediatrics.** 35, 571. 1965.

RUDEEANEK SIN, J.; SRISUNGNGAM, S.; SAWANPANYALERT, P.; SITTIWAKIN, T.; LIKANONSAKUL, S.; PASADORN, S.; PALITTAPONGARNPIM, P.; BRENNAN, P. J.; PHETSUKSIRI, B. 2008. LightCycler real-time PCR for rapid detection and quantitation of *Mycobacterium leprae* in skin specimens. **FEMS Immunol.Med.Microbiol.** 54, 263-270.

SANTOS, A. P. T. *et al.* **Imunopatologia da hanseníase**: aspectos clínicos e laboratoriais. **NewsLab**, edição 73, p.142-156, 2005.

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

SCHERR, N.; NGUYEN, L. 2009. *Mycobacterium* versus *Streptomyces* – we are different, we are the same. **Curr. Opin. Microbiol.** 12, 699-707.

SCOLLARD, D. M.; ADAMS, L. B.; GILLIS, T. P.; KRAHENBUHL, J. L.; TRUMAN, R. W.; WILLIAMS, D. L. The continuing challenges of leprosy. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 19, n.2. p. 338-381, 2006.

SEHGAL, V. N.; SEHGAL, S. Leprosy in Young urban children. **Int J Dermatol.** 1988; 27(2):112-4. DOI:10.1111/j. 1365-4362.1988. tb01284.x.

SELVASEKAR, A.; GEETHA, J.; NISHA, K.; MANIMOZHI, N.; JESUDASAN, K.; RAO, P. S. Childhood leprosy in endemic área. **Lepr Rev.** 1999; 70(1):21-7.

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

SJÖWALL, C.; KASTBOM, A.; ALMROTH, G.; WETTERÖ, J.; SKOGH, T. Beware of antibodies to dietary proteins in “antigen-specific” immunoassays/ falsely positive anticytokine antibody tests due to reactivity with bovine sérum albumin in rheumatoid arthritis (the Swedish TIRA Project). **J. Reumatol.** 38, 215. 2011.

SOUSA, L. M.; MARANHÃO, L., C.; PIRES, C. A. A.; RODRIGUES, D. M. Conhecimento sobre hanseníase de contatos intradomiciliares na atenção primária em Ananindeua, Pará, Brasil. **Rev Bras Med Fam Comunidade.** 2013, Jan-Mar, 8(26) 20.3.

SPENCER, J. S.; DOCKRELL, H. M.; KIM, H. J. identification of specific proteins and peptides in *Mycobacterium leprae* suitable for the selective diagnosis of leprosy. **J. Immunol.** 175: 7930-7938. 2005.

TALHARI, S.; NEVES, R.G. **Dermatologia tropical: hanseníase.** 3. Ed. Manaus, AM: Tropical, 1997.

TAN, S.Y.; GRAHAM, C. Armauer Hansen (1841-1912); discoverer of the cause of leprosy. **Singapore Med. J.**, v. 49, n.7, p. 520-521, 2008.

TRUMAN, R. W.; KRAHENBUHL, J. L. Viable *M. leprae* as a research reagent. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.** 69, 1-12, 2001.

TRUMAN, R. W.; SINGH, P.; SHARMA, R.; BUSSO, P.; ROUGEMONT, J.; PANIZ-MONDOLFI, A.; KAPOPOULOU, A.; BRISSE, S.; SCOLLARD, D. M.; GILLIS, T. P.; COLE, S. T. Probable zoonotic leprosy in the southern United States. **N. Engl. J. Med.** 364, p. 1626-1633, 2011.

ULRICH, M.; SMITH, P. G.; SAMPSON, C.; ZUNIGA, M.; CENTENO, M.; GARCIA, V.; MANRIQUE, X.; SALGADO, A.; CONVIT, J. Ig M antibodies to native phenolic glycolipid 1 in contacts of leprosy patients in Venezuela. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases.** 59: 405-415, 1991.

VAN BRAKEL, W. H. Peripheral neuropathy in leprosy and its consequences. **Lepr. Rev.**, v. 71, suppl., p. S146-153, 2000.

van, I. J.; BOEREE, M. J.; VAN, S. D.; ISEMAN, M. D.; HEIFETS, L. B.; DALEY, C. L. Are phylogenetic position, virulence, drug susceptibility and in vivo response to treatment in mycobacteria interrelated? **Infect. Genet. Evol.** 12, 832-837. 2012.

VISSA, V. D.; BRENNAN, P. J. The genome of *Mycobacterium leprae*: a minimal mycobacterial gene set. **Genome Biol.** v. 2, n. 8, ISSN 1465-6914, 2001.

WALKER, S. L.; LOCKWOOD, D. N. The clinical and Immunological features of leprosy. **Br. Med. Bull.** 77-78, 103-121, 2006.

WILLIAMS, D. L. 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.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global leprosy situation, 2011. **Weekly Epidemiol Rec.** 2011. Disponível em: <http://www.who.int/lep/situation/en/> ou <http://www.who.int/wer/2011/wer8636.pdf> >. Acesso em 02 de dezembro de 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global leprosy situation, 2012. **Weekly Epidemiol Rec.** 2012. Disponível em: < <http://www.who.int/wer/2012/wer8734.pdf> >. Acesso em: 06 de fevereiro de 2015.

YOON, K. H.; CHO, S. N.; LEE, M. K.; ABALOS, M. R.; CELLONA, R. V.; FAJARDO, J. R.; GUIDO, L. S.; DELA CRUZ, E. C.; WAIJH, G. P.; KIM, J. D. Evaluation of polymerase chain reaction amplification of *Mycobacterium leprae*-specific repetitive sequence in biopsy specimens from leprosy patients. **J Clin Microbiol.** 31: 895-899, 1993.

APÊNDICE A – INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS

QUESTIONÁRIO

**DETECÇÃO DA INFECÇÃO SUBCLÍNICA DE *MYCOBACTERIUM LEPRAE* EM
MENORES DE QUINZE ANOS, CONTACTANTES DE HANSENIANOS,
FORTALEZA - CEARÁ**

Recusa	Caso () Contactante ()
Dados sócio-demográficos	1.Idade ___ anos Estado Civil _____ Estudou até que série _____ série Poderia dizer o motivo da recusa? _____ <p align="right">Parar o questionário aqui</p>
Questionário No	
Indivíduo No	Nome do CONTACTANTE (CRIANÇA)
2.Cor da pele	1()Branca 2()Parda 3()Amarela 4()Outra
3.Sexo	1()Masculino 2()Feminino
Data de Nascimento	/ /
Data	/ /

Tipo de participante (CASO) PRONTUÁRIO N° _____	Caso Índice Contactante < 15 anos Outro Especificar _____ _____	1 2 3 4	TIPO____ TIPOUT____
Endereço Completo			
Telefone			
CEP			

2014/2015

1. Caracterização Sócio-econômico e Demográfica (CASO)

101.	Você conhece ou conheceu alguém que tem hanseníase?	Sim Não (pule para a 108)	1 2	CONAHAN__
102.	Se sim, quantas pessoas?	_____ pessoas		QTPESHAN__
103.	Se sim, quem era?	Parente (com quem convive frequentemente) Parente (com quem tem pouca convivência) Vizinho Amigo Conhecido Colega de trabalho Outro _____ (Especificar)	1 2 3 4 5 6 7	QUEMHAN__ QUEMESP__
104.	Essa pessoa vivia ou ainda vive com você na mesma casa?	Sim Não	1 2	CONVIVE__
105.	Quanto tempo você viveu com alguém que tinha hanseníase?	_____ anos		QUVIVHAN__
106.	Com quantas pessoas com hanseníase você vive ou viveu?	_____ pessoas		QUANPES__
107.	Qual sua idade?	_____ anos		IDADE__
108.	Qual sexo?	Masculino Feminino	1 2	SEXO__
109.	Cor da pele	Branca Parda Negra Amarela Outra _____ (especificar)	1 2 3 4	COR__ COROU__

110	Você estudou até que série?	Não frequentei a escola Primeiro grau incompleto Primeiro grau completo Segundo grau incompleto Segundo grau completo Superior Pós-graduação Não respondeu	1 2 3 4 5 6 7	GRINSTR__
111	Em qual dessas faixas de renda a sua família se enquadra?	Sem rendimento Menos de um salário mínimo Um a menos de quatro salários	1 2 3	RENDFAM__ -

	(SM=R\$724,00/788,00)	mínimos	4	
	(Pai ou responsável)	Quatro a menos de oito salários mínimos	5	
		Oito a menos de doze salários mínimos	6	
		Doze salários mínimos ou mais	7	
		Não sei		
		Não respondeu		

2. Situação Clínica (Só para CASOS, pule para 301, se contactante)

		CÓDIGOS/CATEGORIAS		
201.	Classificação clínica (CASO)	Indeterminada Tuberculóide Virchowiana Dimorfa BT Dimorfa BB Dimorfa BL Neural Pura Ignorada	1 2 3 4 5 6 7 8	CLASS CL__
202.	Classificação Operacional (CASO)	Paucibacilar Multibacilar Ignorado	1 2 3	CLASS OP__
203.	Número de lesões (CASO)	Única Duas a cinco Mais que cinco	1 2 3	NLESO ES__
204.	Tem alguma incapacidade 1.() Presença 0.() Ausência	Qual?		_____
205.	Data do diagnóstico (CASO)	___/___/___		
206.	Modo de detecção do CASO	Encaminhamento Demanda espontânea Exame de coletividade Exame de contratos Outros modos Ignorado	1 2 3 4 5 6	
207.	Baciloscopia (CASO)	Índice Baciloscópico Médio_____		
208.	Já iniciou medicação? (CASO)	Sim Não	1 2	
209.	Data do início da medicação (CASO)	___/___/___		
210.	Exame confirmatório para MH? (CASO)	Histopatologia 1.Sim 2.Não Indeterminada Tuberculóide Borderline Tuberculóide Borderline borderline Borderline lepromatosa Lepromatosa	1 2 3 4 5 6	

3. Análise dos Hábitos e Informações Laboratoriais(CONTACTANTE)

301.	Quantos dormem no mesmo cômodo que você?	Atualmente, ___ pessoas		DORMECA__
302.	Outras pessoas da casa usam a mesma cama ou mesma rede que você para dormir ou descansar?	Sim Não Não sei	1 2 3	CAMAREDE__
303.	Frequência com que são lavados lençóis ou a rede onde você dorme:	Menos de 1X/mês 1X/mês 1X/15dias 1X/semana diariamente outra _____ (especificar)	1 2 3 4 5 6	LAVADORM__ ESPLAV_____
304.	Você cria algum animal?	Sim Não	1 2	CRIANIMAL__
305.	Se sim, qual?	1.Cachorro 2.Gato 3.Pássaros 4.Galinha/pato/marrecos 5.Macaco 6.Vaca/boi 7.Cavalo 8.Porco 9.Jumento 10.Outro Especificar_____		CACHOR__ GATO__ PASSAR__ GALPAT__ MACACO__ VACABOI__ CAVALO__ PORCO__ JUMENT__ OUTANI__ ESPANIM_
306.	Você já tomou BCG? (CONTACTANTE)	Sim Não Não Sei	1 2 3	TOMOUBC G_
307.	Presença de cicatriz no braço direito? (CONTACTANTE)	Sim Não	1 2	CICATRIZB D
308.	PCR Nasal (CONTACTANTE)	Positivo Negativo Não realizado Inibido	1 2 3 4	PCR__
309.	ML-Flow (CONTACTANTE)	Positivo Negativo Não realizado Inválido	1 2 3 4	ML- Flow__
310.	IB (CONTACTANTE)	Positivo Negativo	1 2	

ANEXOS

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará – via Plataforma Brasil

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
CEARÁ/ PROPESQ

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: ESTUDO DA DETECÇÃO DE MYCOBACTERIUM LEPRAE EM MENORES DE QUINZE ANOS CONTACTANTES DE HANSENIANOS FORTALEZA-CEARÁ

Pesquisador: Cristiane Cunha Frota

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 20342613.3.0000.5054

Instituição Proponente: Departamento de Patologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 507.836

Data da Relatoria: 08/01/2014

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não se aplica.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

FORTALEZA, 08 de Janeiro de 2014

Assinador por:
FERNANDO ANTONIO FROTA BEZERRA
(Coordenador)

ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para o Responsável Legal

PROJETO DE PESQUISA INTITULADO “Detecção da infecção subclínica de *Mycobacterium leprae* em menores de quinze anos, contactantes de hansenianos, Fortaleza – Ceará”.

Todas as crianças menores de quinze anos, contactantes de pacientes hansenianos, atendidos no Centro de Dermatologia Dona Libânia, no período de 2014/2015, Fortaleza-Ceará, estarão sendo convidadas, através de um Representante Legal, a participar desse projeto. Os avanços na área da saúde ocorrem através de estudos como este, por isso a participação do menor é importante. Os objetivos deste estudo são: identificar infecção em contatos menores de 15 anos pelo método da baciloscopia do raspado da mucosa do nariz; avaliar o resultado do ML-Flow na exposição ao *M. leprae* e empregar o PCR para detecção de DNA do *M. leprae* na secreção nasal.

Caso o menor participe, será necessário coleta de secreção nasal das duas narinas com auxílio de um tipo de cotonete e responder, por meio de entrevista, o questionário sobre informações da doença hanseníase. O menor não sentirá desconforto durante a coleta da secreção do nariz. Será pesquisada na secreção nasal a presença de material genético da bactéria da hanseníase. Também será necessário coleta de 5ml ou 50 µl de sangue e o menor poderá ter o desconforto, quando receber a picada para colher o sangue do seu antebraço, ou polpa digital. Este estudo não proporciona benefício direto para o menor, trata-se de estudo experimental e somente no final do estudo, poderemos concluir a presença de algum benefício.

O Representante Legal do menor poderá ter todas as informações que quiser e poderá não permitir a participação do mesmo na pesquisa ou retirar seu consentimento a qualquer momento, sem prejuízo no seu atendimento. Pela participação do menor no estudo, não haverá qualquer tipo de pagamento, mas o Representante Legal terá a garantia de que todas as despesas necessárias à realização da pesquisa não serão de sua responsabilidade. O nome do menor não aparecerá em qualquer momento no estudo, pois o mesmo será identificado com um número (registro do laboratório).

Em qualquer etapa do estudo, o Representante Legal do menor terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os investigadores são: Dra. Cristiane Cunha Frota e Dra. Delaide Sampaio Dias Lourenço, que poderão ser encontradas nos endereços: Laboratório de Micobactérias, Bloco da Biomedicina, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Rua Monsenhor Furtado, S/N.

Rodolfo Teófilo, Fortaleza-Ceará. Telefone (85) 3366- 8303 e Centro de Dermatologia Dona Libânia, 1033 – Centro, Fortaleza-Ceará. Telefone (85) 3101-5453.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li e/ou que foram lidas para mim, descrevendo o projeto de pesquisa “Estudo da detecção de *Mycobacterium leprae* em menores de quinze anos, contactantes de hansenianos, Fortaleza-Ceará”.

Eu _____, em pleno gozo das minhas faculdades mentais, com 18 anos ou mais, detentor de integral competência, li e/ou ouvi o esclarecimento acima e ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Sendo o Responsável legal, do menor _____ concordo voluntariamente em dar consentimento, para o mesmo participar deste estudo, e entendo que sou livre para interromper meu consentimento a qualquer momento, sem justificar minha decisão. Sei que seu nome não será divulgado, que não terei despesas e não receberei dinheiro pela participação no estudo.

Assinatura do Responsável legal Data ____/____/____

Obs.:Em caso de dúvida sobre a participação do menor nesse estudo, você poderá solicitar informações no Comitê de Ética da Universidade Federal do Ceará, localizado à rua Coronel Nunes de Melo, 1127- Rodolfo Teófilo. Telefone (85) 3366-8344.

RESPONSÁVEL LEGAL

Nome.....
 Natureza (Grau de Parentesco, Tutor, Curador, etc).....
 Documento de Identidade N°Sexo: M () F ()
 Endereço N°
 Bairro.....
 CidadeCepTel: DDD (.....).....

Assinatura da testemunha* Data ____/____/____

***para casos de pacientes menores de 15 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.**

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido do representante legal do menor _____ para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____/____

ANEXO C – Termo de Assentimento para o Menor (TAM)**TERMO DE ASSENTIMENTO PARA O MENOR**

Você está sendo convidado para participar da pesquisa “Detecção da infecção subclínica de *Mycobacterium leprae* em menores de quinze anos, contactantes de hansenianos, Fortaleza – Ceará”. Seus pais ou responsáveis permitiram que você participe.

Queremos saber se os menores de 15 anos, contactantes de casos novos de hanseníase, estão infectados, através de exames de laboratório. A pesquisa será feita no Centro de Dermatologia Dona Libânia. Para isso, precisamos colher material (secreção) do seu nariz com o auxílio de um swab (cotonete) e uma pequena amostra de sangue, onde será dada uma “espetadinha” no dedo indicador esquerdo (da mão direita, se você for canhoto), ou colher 5ml de sangue no seu antebraço. O uso do material é seguro, mas é possível que você sinta um desconforto quando receber a picada no dedo ou antebraço. Caso aconteça algo errado, você pode nos procurar pelos telefones 3101-5453 (Dra. Delaide Sampaio) ou 3366-8344 (Dra. Cristiane Frota). Somente no final do estudo, é que poderemos concluir um benefício para você.

Você não precisa participar da pesquisa se não quiser, é um direito seu, não terá nenhum problema se desistir.

Ninguém saberá que você está participando da pesquisa, não falaremos a outras pessoas, nem daremos a estranhos as informações que você nos der. Os resultados da pesquisa vão ser publicados, mas sem identificar as crianças que participaram da pesquisa.

Eu _____ aceito participar da pesquisa “Estudo da detecção de *Mycobacterium leprae* em menores de quinze anos contactantes de hansenianos Fortaleza-Ceará”. Entendi que posso dizer “sim” e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer “não” e desistir que ninguém vai ficar furioso. Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis. Recebi uma cópia deste termo de assentimento e li e concordo em participar da pesquisa.

Fortaleza, ____ de _____ de _____.

Assinatura do menor

Assinatura do (a) pesquisador(a)

ANEXO D – Coloração Ziehl – Neelsen a frio

1. Colocar a lâmina em suporte apropriado;
2. Gotejar sobre a lâmina a fucsina de Ziehl-Neelsen até a completa submersão dos esfregaços;
3. Deixar em temperatura ambiente durante 20 minutos;
4. Retirar a lâmina do suporte e lavar em água corrente;
5. Gotejar a solução descorante (álcool-ácido a 1%) sobre os esfregaços até que os mesmos tomem uma coloração rosada;
6. Lavar novamente a lâmina em água corrente;
7. Colocar a lâmina em suporte apropriado, gotejar sobre a lâmina azul de metileno até completa submersão do esfregaço. Marcar 1 minuto, retirar a lâmina do suporte, lavá-la em água corrente e deixá-la secar à temperatura ambiente.

ANEXO E – Protocolo para extração de DNA a partir de swabs contendo amostras de secreção nasal, utilizando o kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, Alemanha)

1. Cortar o swab com uma lâmina de bisturi estéril, dentro de uma placa de Petri esterilizada. Verter o restante do tampão, contido no tubo de coleta, para um ependorf de 2,0ml;
2. Adicionar 180 μ L do tampão ATL;
3. Colocar 20 μ L de proteinase K, agitar em vortex por 5 segundos e incubar a 56°C por 24h;
4. Adicionar 200 μ L de AL e agitar em vortex por 5 segundos;
5. Adicionar 200 μ L de etanol absoluto e novamente agitar em vortex por 5 segundos;
6. Preparar coluna e tubo do kit;
7. Pipetar toda a solução (610 μ L) para o conjunto (coluna mais o tubo do kit), e centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto;
8. Descartar a solução mais o tubo e ficar apenas com a coluna;
9. Colocar a coluna em um novo tubo de 2,0ml (kit) e adicionar 500 μ L de AW1. Centrifugar a 8000rpm por 1 minuto e descartar a solução mais o tubo e ficar apenas com a coluna;
10. Colocar a coluna em um novo tubo de 2,0ml (kit) e adicionar 500 μ L de AW2. Centrifugar a 14000 rpm por 3 minutos. Descartar a solução mais o tubo e ficar apenas com a coluna;
11. Colocar a coluna em um tubo de 1,5ml, adicionar 50 μ L de AE e deixar em repouso por 1 minuto. Centrifugar a 8000rpm por 1 minuto;
12. Adicionar na coluna 30 μ L de AE. Centrifugar a 8000rpm por 1 minuto;
13. Descartar a coluna, tampar o tubo e etiquetá-lo. Guardar o DNA extraído no freezer à -20°C.