**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

GABRIELA PAGANO DE OLIVEIRA GONÇALVES DA SILVA

**Estudo comparativo entre teste rápido imunológico (LID- NDO) e PCR tempo
real de raspado dérmico em álcool e em papel-filtro na hanseníase**

**Ribeirão Preto
2017**

GABRIELA PAGANO DE OLIVEIRA GONÇALVES DA SILVA

Estudo comparativo entre teste rápido imunológico (LID- NDO) e PCR tempo real de raspado dérmico em álcool e em papel-filtro na hanseníase

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Clínica Médica.

Área de concentração: Clínica Médica.

Orientador: Prof. Dr. Marco Andrey Cipriani Frade

Ribeirão Preto

2017

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Da Silva, Gabriela Pagano de Oliveira Gonçalves

Estudo comparativo entre teste rápido imunológico (LID- NDO) e PCR tempo real de raspado dérmico em álcool e em papel-filtro na hanseníase/
Gabriela Pagano de Oliveira Gonçalves da Silva. Ribeirão Preto, 2017.

79p.; 30cm

Dissertação de mestrado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto,
Universidade de São Paulo. 2017.

Orientador: Frade, Marco Andrey Cipriani

1. Hanseníase; 2. Diagnóstico; 3. Teste sorológico; 4. PCR; 5. ELISA anti- PGL1.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Gabriela Pagano de Oliveira Gonçalves da Silva. **Estudo comparativo entre teste rápido imunológico (LID- NDO) e PCR tempo real de raspado dérmico em álcool e em papel-filtro na hanseníase**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Clínica Médica.

Área de concentração: Clínica Médica.

Aprovada em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

RESUMO

DA SILVA, G.P.O.G. **Estudo comparativo entre teste rápido imunológico (LID-NDO) e PCR tempo real de raspado dérmico em álcool e em papel-filtro na hanseníase**. 79f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

A hanseníase é uma doença infecciosa que acomete pele e nervos periféricos. Seu diagnóstico é baseado eminentemente nos seus aspectos clínicos variáveis e poucos são os exames complementares que auxiliam no diagnóstico, como baciloscopia do raspado intradérmico, histopatologia, ELISA anti- PGL1 (APGL1) e anti-LID, geralmente positivos nas formas multibacilares, dificultando o diagnóstico das formas paucibacilares. Busca-se comparar os resultados obtidos com o teste rápido imunológico (LID-NDO) Orange Life® com os resultados da PCR tempo real realizada nas amostras de raspado intradérmico e os resultados do ELISA APGL1 coletadas durante a ação por demanda espontânea (Hanseníase Brasília 2014), além de comparar eficiência entre dois métodos diferentes de conservação destas amostras (papel-filtro x álcool). Foram coletadas 277 amostras de raspado dérmico de 50 pacientes clinicamente diagnosticados com hanseníase durante a ação. Na mesma ocasião, os indivíduos diagnosticados foram submetidos à coleta de sangue periférico para teste rápido sorológico (Orange Life®) e ELISA APGL1. A extração de DNA do raspado intradérmico, armazenado no álcool e no papel-filtro, foi realizada no Laboratório de Dermatologia do HC-FMRP-USP. A PCR em tempo real foi realizada usando par de primers específicos RLEP, e o master mix sybr green-Promega. Dos 50 pacientes diagnosticados clinicamente, 90% são multibacilares. Todos os testes, tanto o teste rápido sorológico como a PCR, apresentaram maior positividade nos pacientes multibacilares. O teste rápido sorológico foi positivo em 64,44% dos pacientes multibacilares e em 40% dos paucibacilares. A PCR nas amostras armazenadas no álcool foi positiva em 19,05% dos pacientes multibacilares e a PCR do papel-filtro em 17,78%; nenhuma PCR foi positiva em pacientes paucibacilares. O ELISA APGL foi positivo em 56% dos pacientes diagnosticados. Na PCR das amostras armazenadas no papel-filtro, o sítio de coleta com maior positividade foram os cotovelos (75%). A concordância entre o teste rápido sorológico e a PCR e a concordância entre o teste rápido e o ELISA APGL1 foram *fair* (suave). Já a concordância entre a PCR das amostras armazenadas no álcool e a PCR das amostras armazenadas no papel-filtro foi perfeita. Concluímos que o exame clínico é ainda essencial para o diagnóstico da hanseníase, principalmente das formas paucibacilares. Os métodos de armazenamento do material coletado por raspado intradérmico (papel-filtro x álcool) não interferiram no resultado final da PCR, portanto o armazenamento no papel-filtro pode ser feito preferencialmente, pois apresenta menor custo para a extração de DNA. O teste rápido sorológico e o ELISA anti-PGL1 têm baixa especificidade, porém podem ter outras aplicações, diferentes do diagnóstico da hanseníase.

Palavras-chave: Hanseníase; Diagnóstico; Teste sorológico; PCR; ELISA anti-PGL1.

ABSTRACT

DA SILVA, G.P.O.G. **Comparative study between immunological rapid test (LID-NDO) and real-time PCR of dermal smear in alcohol and filter paper in leprosy.** 79f. Dissertation (Master) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2017.

Leprosy is an infectious disease that affects skin and peripheral nerves. Leprosy diagnosis is mainly based on its variable clinical aspects and few complementary tests that aid in the diagnosis, such as bacilloscopy, histopathology, besides the anti-PGL1 ELISA (APGL1) and anti-LID, all of which are generally positive in multibacillary forms, confirming the difficulty in diagnosis of paucibacillary patients. The aim of this study was to compare the results obtained with the Orange Life® Immunological Rapid Test (LID-NDO) with the real-time PCR results obtained in the intradermal scraping samples and the results of the ELISA APGL1, collected during the “Hanseníase” action in Brasília in January 2014, in addition to comparing efficiency between two different methods of preservation of these samples (filter paper x alcohol). A total of 277 dermal smear samples were collected from 50 patients clinically diagnosed with leprosy during the procedure. At the same time, the individuals diagnosed were submitted to peripheral blood collection for serological rapid test (Orange Life®) and ELISA APGL1. The extraction of DNA from intradermal scrapings, stored in alcohol and filter paper, was carried out at the Dermatology Laboratory of HC-FMRP-USP. Real-time PCR was performed using a pair of primers specific for the RLEP gene, and the master sybr green-Promega. From 50 patients diagnosed clinically, 90% are multibacillary. All tests, both the serological rapid test and the PCR, were more positive in multibacillary patients. The rapid serological test was positive in 64.44% of the multibacillary patients, and in 40% of the paucibacillary. The PCR in the samples stored in the alcohol was positive in 19.05% of the multibacillary patients and the PCR of the filter paper in 17.78%; PCR weren't positive in paucibacillary patients. ELISA APGL was positive in 56% (28) of the diagnosed patients. In the PCR of the samples stored in the filter paper, the collection site with the highest positivity was the elbows (75%). The agreement between the rapid serological test and the PCR and the agreement between the rapid test and the ELISA APGL1 were fair. The agreement between the PCR of the samples stored in the alcohol and the PCR of the samples stored on the filter paper was perfect. We conclude that the clinical examination is still essential for the diagnosis of leprosy, especially in paucibacillary forms. We also concluded that the methods of storing the material collected by intradermal scraping (filter paper x alcohol) do not interfere in the final result of the PCR, therefore the storage in the filter paper can be done preferentially because it presents a lower cost for the extraction of DNA. Rapid serological test and the anti-PGL1 ELISA have low specificity, but may have other different applications than the diagnosis of leprosy.

Key - words: Leprosy; Diagnosis; Serological test; PCR; anti-PGL1 ELISA.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Correlação entre as classificações de Madri, Ridley e Jopling e OMS.	20
Tabela 2.	Características e classificação dos 50 pacientes analisados.....	44
Tabela 3.	Resultados respectivos do teste rápido, Elisa anti- PGL1, PCR em álcool e PCR em papelfiltro.....	45
Tabela 4.	Distribuição dos resultados do teste rápido sorológico de acordo com a forma clínica da doença.....	46
Tabela 5.	Distribuição dos resultados da PCR realizada nas amostras armazenadas no álcool e no papel filtro de acordo com a forma clínica da doença.....	47
Tabela 6.	Distribuição dos resultados da PCR separados pelo sítio de coleta da amostra armazenada em papel filtro e álcool.....	48
Tabela 7.	Correlação entre forma clínica de hanseníase dos pacientes e o resultado do teste sorológico.....	49
Tabela 8.	Correlação entre forma clínica de hanseníase dos pacientes e o resultado da PCR realizada nas amostras armazenadas no álcool e no papel filtro.....	49
Tabela 9.	Concordância entre teste rápido e PCR das amostras no álcool.....	49
Tabela 10.	Concordância entre o teste rápido sorológico e a PCR das amostras no papelfiltro.....	50
Tabela 11.	Concordância entre a PCR das amostras no álcool e no papel-filtro....	50
Tabela 12.	Concordância entre o teste rápido sorológico e o ELISA anti- PGL1 nos pacientes diagnosticados com hanseníase.....	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Prevalência mundial da hanseníase.....	16
Figura 2.	Prevalência da hanseníase no Brasil.....	17
Figura 3.	Mácula hipocrômica- MHI.....	20
Figura 4.	Placa eritematosa – MHT.....	21
Figura 5.	Lesões foveolares - MHD	22
Figura 6.	Pápulas eritematosas, nódulos, infiltração- MHV	23
Figura 7.	Reação tipo 1.....	24
Figura 8.	Eritema nodoso.....	25
Figura 9.	Quantificação de DNA – PCR tempo real.....	38
Figura 10.	Melt – PCR tempo real.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APGL1: anticorpo anti-PGL1.

BAAR: bacilo álcool-ácido resistente

MH: hanseníase

DD: hanseníase dimorfo-dimorfa

DT: hanseníase dimorfo-tuberculoide

DV: hanseníase dimorfo-virchowiana

ELISA: “enzyme linked immunosorbent assay”

ENMG: eletroneuromiografia

Fg: fentograma

FMRP-USP: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo

HC-FMRP: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

HI: hanseníase indeterminada

HN: hanseníase neural pura

MB: multibacilar

MS: Ministério da Saúde

OMS: Organização Mundial da Saúde

PB: paucibacilar

PCR: reação em cadeia da polimerase

PGL-1: glicolípídeo fenólico 1

PQT: poliquimioterapia

µl: micro litro

SINAN: Sistema de informação de agravos de notificação

SUMÁRIO

1. Introdução.....	13
1.1. Definição, agente etiológico e histórico.....	15
1.2 Epidemiologia.....	15
1.3 Patogenia.....	17
1.4 Manifestações clínicas e definição de um caso de hanseníase.....	18
1.5 Classificação.....	19
1.5.1 Hanseníase indeterminada (MHI).....	20
1.5.2 Hanseníase tuberculoide (MHT).....	21
1.5.3 Hanseníase dimorfa (MHD).....	21
1.5.4 Hanseníase virchowiana (MHV).....	22
1.6 Tratamento e estados reacionais.....	23
1.7 Exames complementares.....	25
1.8 Justificativa.....	28
 2. Objetivos.....	 29
2.1 Geral.....	31
2.2 Específicos.....	31
 3. Metodologia.....	 33
3.1 Casuística.....	35
3.2 Casos novos.....	35
3.3 Coleta das amostras biológicas.....	36
3.4 Extração de DNA e PCR.....	36
3.5. Sorologia.....	38
3.6 Análise estatística.....	39
3.7 Ética.....	39
 4. Resultados.....	 41
5. Discussão.....	51
6. Conclusão.....	57
7. Referências bibliográficas.....	61
Apêndices.....	69
Anexo.....	75

INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1 Definição, agente etiológico e histórico

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica, que acomete predominantemente pele, mucosas e nervos periféricos, causada pelo bacilo intracelular obrigatório, álcool-ácido resistente (BAAR), *Mycobacterium leprae*, bactéria da ordem *Actinomycetale* e da família *Mycobacteraceae*; identificado em 1873 por Armauer Hansen. (Gunatilake; Settinayake, 2004). O homem é considerado o único reservatório natural do bacilo, apesar do relato de animais selvagens, como tatus e macacos, naturalmente infectados (Araújo, 2003).

A sequência genômica do *Mycobacterium leprae* foi publicada em 2001, e o estudo de seu genoma revelou que o *M. leprae* sofreu um processo de regressão genômica, resultando na eliminação de aproximadamente 2.000 genes, levando à perda de vias metabólicas essenciais e fazendo com que o *M. leprae* se tornasse parasita intracelular obrigatório para garantir sua sobrevivência.

Após a disponibilidade da sequência gênica do *M. leprae*, foi possível melhorar os estudos moleculares e desenvolver ferramentas de biologia molecular para serem utilizadas no estudo e diagnóstico da Hanseníase.

A introdução do tratamento com dapsona na década de 1940 levou ao controle parcial dos sintomas, redução das sequelas e melhora da qualidade de vida dos pacientes, que antes eram isolados da sociedade. Em 1982, a poliquimioterapia (PQT) passou a ser recomendada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (Rodrigues; Lockwood, 2011; WHO, 1982). O tratamento preconizado atualmente é rifampicina e dapsona pelo período de 6 meses em pacientes paucibacilares e rifampicina, dapsona e clofazimina por 12 meses em pacientes multibacilares.

1.2 Epidemiologia

A hanseníase tem sido relatada por mais de 2000 anos em diferentes pontos do mundo. A meta de eliminação da doença definida pela Organização Mundial de

Saúde (OMS) em 1991, uma taxa de prevalência global de <1 paciente por 10.000 habitantes, foi alcançada no ano de 2000, porém mais de 200.000 novos casos ainda são reportados a cada ano (Reibel et al., 2015). O número de novos casos tem sido bastante estável nos últimos 8 anos, indicando manutenção da transmissão. Em 2013, 14 países relataram mais de 1000 novos casos, dos quais três (Índia, Brasil e Indonésia) respondem por mais de 80% de todos os casos no mundo (WHO, 2013). Recentemente, a OMS desenvolveu um roteiro para 17 doenças tropicais negligenciadas, incluindo a hanseníase, para reduzir seu impacto mundial. As metas para a hanseníase são: interrupção global da transmissão ou eliminação até 2020 e redução das incapacidades de grau 2 em casos recentemente detectados para menos de 1 por milhão de população até 2020 (WHO, 2012).

Embora no Brasil a incidência da hanseníase tenha sido reduzida nos últimos anos, a doença ainda persiste como um problema de saúde pública concentrado nas regiões mais pobres do país, principalmente Norte, Nordeste e Centro-Oeste (Pena et al., 2009). Segundo análise de dados de 692 municípios dos estados de Mato Grosso, Tocantins, Rondônia, Pará e Maranhão, utilizando o SINAN entre 2001 e 2012, houve uma redução na taxa de casos novos de hanseníase com redução significativa entre 2003 e 2012.

Figura 1. Prevalência mundial da hanseníase, 2012.

Fonte: <http://www.who.int/lep/situation/en/>

Figura 2. Prevalência da hanseníase no Brasil distribuída por municípios, 2013.

Fonte: <http://www.sdh.gov.br/>

1.3 Patogenia

A transmissão do bacilo se dá principalmente por contato prolongado com indivíduo bacilífero e ocorre pelas vias aéreas superiores através de gotículas nasais e orais. Porém, mesmo após contato prolongado com o *Mycobacterium leprae*, apenas alguns indivíduos expostos desenvolvem hanseníase. O período de incubação médio do bacilo varia de três a cinco anos, mas pode chegar a 30 anos (Barreto et al, 2014).

A proliferação e sobrevivência dos bacilos em macrófagos e células infectadas por Schwann dependem da resposta imunológica do doente. Os indivíduos que

adoecem apresentam um amplo espectro de manifestações clínicas que se estendem a partir do polo tuberculoide para o polo virchowiano da doença.

1.4 Manifestações clínicas e definição de um caso de hanseníase

A doença se manifesta por manchas hipocrômicas ou eritematosas, isoladas ou disseminadas pelo tegumento, com uma característica peculiar, a alteração de sensibilidade (dormência) no local da lesão, identificada pela hipoestesia ou anestesia do local afetado (SCOLLARD et al., 2006).

A apresentação clínica da hanseníase é dependente da interação entre o parasita e a resposta imune celular do hospedeiro. A forma clínica inicial é chamada de indeterminada e pode ter remissão espontânea ou evoluir para alguma das formas clínicas descritas por Ridley e Jopling. O espectro clínico descrito por Ridley e Jopling varia entre dois polos estáveis e bem caracterizados: tuberculoide (TT) e virchowiano (VV). Nos pacientes TT a resposta imune celular é efetiva, com formação de granulomas para restrição da infecção e eliminação do parasita. Já o polo VV é caracterizado por tolerância imunológica com disseminação do bacilo (Ridley; Jopling, 1966). Entre estes polos há formas clínicas intermediárias chamadas de formas dimorfas ou “*borderlines*”.

O período de incubação da hanseníase é bastante variado e costuma ser definido entre 2 a 5 anos, mas trabalhos recentes demonstram que este período pode ser bem maior, chegando a décadas (SUZUKI et al., 2011). A sua transmissão ocorre pelas vias aéreas superiores, e as pessoas que convivem com o doente, denominados contatos ou comunicantes, possuem até 8 vezes mais chances de desenvolver a hanseníase (VIJAYAKUMARAN et al., 1998).

O diagnóstico é eminentemente clínico e epidemiológico, realizado após anamnese e exame dermatológico e neurológico. Segundo diretrizes do Ministério da Saúde, define-se um caso de hanseníase quando um indivíduo apresenta no mínimo uma das seguintes características: lesão cutânea com alteração de sensibilidade; acometimento de nervo com espessamento neural ou presença de bacilo na biópsia ou no exame baciloscópico.

1.5 Classificação

Em 1966 foi bem estabelecida a classificação por Ridley e Jopling, usada principalmente para fins de pesquisa, tendo fundamental importância no entendimento espectral da doença no século XX.

A doença apresenta um amplo espectro clínico e histopatológico que está correlacionada com a resposta imunológica do paciente. Em uma extremidade do espectro, sob a forma tuberculoide, uma resposta imune mediada por células específicas ao *M. leprae* é observada, com lesões caracterizadas por granulomas epitelioides, a participação de linfócitos, principalmente do tipo Th1, e poucos bacilos álcool-ácido resistentes. Em contraste, na forma mais grave, ou virchowiana, a imunidade celular contra o *M. leprae* está ausente, com lesões dérmicas difusas caracterizadas pela presença de macrófagos jovens, grande número de bacilos e um pequeno número de células T de, predominantemente, tipo Th2. A classificação adequada da hanseníase é uma das questões fundamentais para o tratamento e prognóstico da doença.

Outra classificação muito usada no Brasil é a de Madri, que considera dois polos estáveis e opostos, virchowiano e tuberculoide, e dois grupos instáveis, indeterminado e dimorfo, que evoluem para um dos polos estáveis na evolução natural da doença (Araújo, 2003).

Lesões maculares podem ser observadas em todas as formas clínicas da doença. Estudos mostram que há discordância entre os parâmetros clínicos, bacteriológicos e histopatológicos, dificultando assim a aplicação exclusiva da classificação de Rifley- Jopling. A Associação Indiana de Classificação de Hansenologistas (IAL – Indian Association of Leprologists Classification, 1981), baseada essencialmente em parâmetros clínicos e bacteriológicos, pode ser mais adequada para classificar as lesões maculares vistas tão frequentemente em pacientes com hanseníase na prática clínica (Sarkar et al, 1999).

Grande parte dos pacientes apresentam danos neurais, antes, durante ou após o tratamento. O controle da hanseníase tem como objetivo reduzir a frequência e a gravidade das deformidades e a incapacidade. Para isso são necessários diagnóstico e tratamento precoces.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda uma classificação operacional, na qual os indivíduos acometidos pela doença são divididos em

paucibacilares (PB), quando apresentam um número menor ou igual a 5 lesões cutâneas, e multibacilares (MB), quando apresentam mais de 5 lesões. Entretanto, se a baciloscopia estiver disponível, os pacientes que apresentarem exame baciloscópico positivo são classificados como MB, independentemente do número de lesões de pele (Teixeira et al., 2008).

Tabela 1. Correlação entre as classificações de Madri, Ridley e Jopling e OMS.

Madri	Indeterminada	Tuberculoide	Dimorfa	Virchowiana
Ridley e Jopling		T	DT DD DV	V
OMS	PAUCIBACILARES		MULTIBACILARES	

(Fonte: Adaptada de Hanseníase: formas clínicas e diagnóstico diferencial. Cacilda Silva Souza. Medicina, Ribeirão Preto, 30: 336, jul./set.1997).

1.5.1 Hanseníase indeterminada (MHI)

Representa a forma inicial da doença, que na maioria dos indivíduos evolui para cura. Normalmente apresenta-se como mácula hipocrômica com alteração de sensibilidade térmica, tátil e/ou dolorosa ou apenas áreas de hipoestesia na pele. Ocorre apenas comprometimento de ramúsculos nervosos, não de troncos nervosos. (ARAUJO, 2003).

Figura 3. Mácula hipocrômica – MH

(Fonte: Ambulatório dermatologia de hanseníase HCRP)

1.5.2 Hanseníase tuberculoide (MHT)

É caracterizada por lesões bem delimitadas, assimétricas, e a forma mais localizada da doença manifesta-se em indivíduos com resposta imune celular eficiente. As lesões são únicas ou poucas, eritematosas ou hipocrômicas, máculas ou placas, bem delimitadas. Também ocorre anestesia ou hipoestesia e redução de pelos e sudorese (Rodrigues; Lockwood, 2011).

A variedade infantil ocorre em crianças contactantes de pacientes bacilíferos e apresenta-se principalmente na face como placas, nódulos, lesões tricofíticas ou sarcoídicadas.

Figura 4. Placa eritematosa- MHT
(Fonte: Ambulatório dermatologia de hanseníase HCRP)

1.5.3 Hanseníase dimorfa (MHD)

A forma dimorfa apresenta características clínicas e laboratoriais variadas, podendo se aproximar tanto do polo tuberculoide (MHDT) quanto do virchowiano (MHDV). É maior o número de lesões cutâneas, as quais, se caracterizam por manchas eritematosas ou acastanhadas com limites internos nítidos e externos

imprecisos e lesões foveolares. As lesões neurais são intensas, precoces e frequentemente levam a variados graus de incapacidade.

Figura 5. Lesões foveolares – MHD
(Fonte: Ambulatório dermatologia de hanseníase HCRP)

1.5.4 Hanseníase virchowiana (MHV)

Ocorre em indivíduos com a imunidade celular específica deprimida. As lesões cutâneas são pápulas, nódulos, placas e infiltração difusa que distribuem-se preferencialmente nas áreas mais frias do corpo, incluindo as regiões frontal, central da face e os lóbulos das orelhas, que se mostram infiltradas caracterizando a fácies leonina, além de extensas áreas do tegumento (ARAÚJO, 2003).

Ocorre edema articular e digital nos membros, xerose com descamação fina e áreas de rarefação dos pelos com alopecia. Ocorre comprometimento nervoso nos ramúsculos da pele, na inervação vascular e nos troncos nervosos, tem tendência à distribuição simétrica.

Figura 6. Pápulas eritematosas, nódulos, infiltração – MHV.
(Fonte: Ambulatório dermatologia de hanseníase HCRP)

1.6 Tratamento e estados reacionais

O tratamento indicado pelo Ministério da Saúde é a poliquimioterapia (PQT) padronizada pela Organização Mundial de Saúde. A poliquimioterapia é diferente para pacientes paucibacilares e multibacilar:

- Esquema Paucibacilar (PB): uma dose mensal de 600 mg de rifampicina (2 cápsulas de 300 mg) com administração supervisionada e uma dose mensal de 100mg supervisionada e uma dose diária auto-administrada de dapsona. O tratamento tem duração de 6 meses.

- Esquema Multibacilar (MB): dose mensal de 600 mg (2 cápsulas de 300 mg) de rifampicina com administração supervisionada; uma dose mensal de 300 mg (3 cápsulas de 100 mg) com administração supervisionada e uma dose diária de 50mg auto-administrada de clofazimina; e uma dose mensal de 100mg supervisionada e uma dose diária auto-administrada de dapsona. O tratamento tem duração de 12 meses.

Os estados reacionais representam episódios inflamatórios no curso crônico da hanseníase. Podem ser precipitados pelo tratamento da hanseníase, por infecções, estresse físico, gravidez, uso de medicamentos ou serem espontâneos. Os tipos de reação existentes são a reação reversa ou reação do tipo 1 e a reação do tipo 2 ou eritema nodoso da hanseníase (ENH). Os quadros reacionais podem ocorrer antes, durante ou após o tratamento.

A reação do tipo 1 é mediada pela imunidade celular e surge precocemente durante o tratamento, caracteristicamente na hanseníase dimorfa. Ocorre exacerbação das lesões pré-existentes, que se tornam edemaciadas, eritematosas, brilhantes, podendo chegar a ulceração acompanhadas por sintomas sistêmicos variados e neurite. O corticosteroide sistêmico é o medicamento indicado para tratamento, principalmente quando há neurite associada. Em casos em que a reação é apenas cutânea, podem ser usados analgésicos e anti-inflamatórios não-esteroidais. Outros medicamentos imunossupressores como ciclosporina, micofenolato de mofetil e metotrexato têm sido utilizados em casos isolados (Ura, 2007).

Figura 7. Reação do tipo 1
(Fonte: Ambulatório dermatologia de hanseníase HCRP)

A reação do tipo 2 ocorre na MHD e MHV, em geral após seis meses de tratamento (Lockwood et al., 2011). É desencadeada por imunocomplexos com ativação do complemento e aumento de citocinas séricas. A lesão característica é o eritema nodoso (pápulas e nódulos cutâneos dolorosos e difusos). Apresenta acometimento sistêmico com febre, adenomegalias, neurite, orquite, epididimite, irite, iridociclite, artrite, mão e pé reacionais, linfadenite, proteinúria e dano hepático. O tratamento de escolha é a talidomida e o uso de corticoterapia sistêmica nos casos com reações mais frequentes e intensas (Ura, 2007).

Figura 8. Eritema nodoso
(Fonte: Ambulatório dermatologia de hanseníase HCRP)

1.7 Exames complementares

O diagnóstico da hanseníase é essencialmente clínico e realizado quando os exames dermatológicos e neurológicos são feitos com eficiência por profissionais treinados.

Alguns exames complementares podem auxiliar no diagnóstico. O principal deles é a baciloscopia do raspado intradérmico, que é positiva na maioria dos casos multibacilares, positiva ou negativa nos casos dimorfos e é negativa na hanseníase tuberculoide; portanto sua negatividade não exclui o diagnóstico. Além disso, a baciloscopia necessita ser coletada em 5 sítios diferentes na pele.

No exame histopatológico a coloração de hematoxilina-eosina permite a

análise de aspectos histopatológicos do paciente. Para a visualização do bacilo deve ser realizada coloração Fite-Faraco, que é específica para identificação dos bacilos.

Na hanseníase indeterminada os achados histopatológicos são inespecíficos, com infiltrado inflamatório perianexial e perineural predominantemente linfocitário. Bacilos escassos ou ausentes.

O exame histológico típico na hanseníase tuberculoide revela granuloma do tipo tuberculoide com células epitelioides e gigantes tipo Langhans, que tocam a epiderme, acometendo, principalmente, as terminações nervosas.

A histologia na hanseníase virchowiana é caracterizada por infiltrado celular extenso que atinge a gordura subcutânea, com uma faixa de colágeno normal entre a derme e a epiderme (faixa de *Unna*). Há predomínio de macrófagos com citoplasma espumoso contendo lípidos neste infiltrado, que são denominadas células de Virchow. Ocorre destruição dos anexos cutâneos e os BAAR podem ser vistos ao redor dos nervos periféricos. Assim como a baciloscopia, a análise histopatológica tem uma boa especificidade, porém a sensibilidade depende da visualização pelo profissional que está avaliando a lamina.

A eletroneuromiografia (ENMG) é o estudo da velocidade e da amplitude de condução de nervos e dos potenciais de ação musculares. É um exame essencial para o diagnóstico de hanseníase neural primária (OOI; SRINIVASAN, 2004). Esse exame pode apresentar-se alterado semanas antes de alguma alteração neurológica ser detectada no exame físico.

Exames de imagem com a ultrassonografia de nervos podem ajudar na detecção do espessamento de nervos periféricos com método complementar ao exame neurológico.

Os testes sorológicos podem ser realizados para avaliar a produção de anticorpos contra antígenos específicos do *M. leprae*. Possuem a vantagem de serem dosados no plasma, precisando apenas de uma coleta de sangue periférico. Um teste sorológico que possibilita o diagnóstico e consequentemente o tratamento precoce da hanseníase poderá reduzir a transmissão, prevenir deficiências funcionais e deformidades e facilitar a erradicação da hanseníase (Duthie et al, 2007). Pacientes multibacilares mais próximos do polo virchowiano possuem uma resposta humoral mais produtiva, possuindo títulos altos, e que se correlacionam diretamente com a carga bacilar.

Diferentes antígenos já foram e ainda são testados para melhorar a

capacidade do teste sorológico em identificar os casos. Dentre eles o mais utilizado é o PGL-I. Pacientes com hanseníase multibacilar produzem grandes quantidades de IgM dirigido para PGL-I, sendo este antígeno o mais usado nos testes sorológicos. Outros antígenos como proteínas recombinantes, ML0405 e ML2331 exibiram alta sensibilidade para a detecção da hanseníase em testes realizados no Brasil (Fabri et al, 2016).

Uma proteína de fusão, LID-1, foi desenvolvida pela fusão dos genes ML2331 e ML0405, produzindo uma única proteína quimérica mais sensível do que as proteínas originais sozinhas. Recentemente, na intenção de melhorar a sensibilidade dos testes sorológicos, epítomos do PGL-I e LID-1 foram conjugados para formar LID-NDO. A sensibilidade destes testes sorológicos varia de acordo com a origem geográfica dos pacientes.

Após a disponibilidade da sequência gênica do *M. leprae*, foi possível melhorar os estudos moleculares e desenvolver ferramentas de biologia molecular para serem utilizadas no estudo e diagnóstico da Hanseníase. A PCR (Reação em cadeia da polimerase) é a técnica que promete maior sensibilidade associada à especificidade, e, em casos difíceis de diagnosticar, favorece o diagnóstico correto e precoce. Diferentes desenhos de primers já foram testados para vários genes e regiões do genoma do bacilo, dentre eles a região RLEP é bem utilizada por ser uma região repetitiva. Mais recentemente, a tecnologia de PCR em tempo real melhorou a detecção, aumentando a sensibilidade e a especificidade, uma vez que parece ser uma ferramenta sólida para o reconhecimento de micobactérias em situações clínicas selecionadas, bem como para quantificação em ambientes experimentais. Este método permite a quantificação direta do conteúdo de DNA bacteriano em amostras clínicas e tem melhorado o tempo de retorno e a rentabilidade, permitindo resultados mais confiáveis. O procedimento segue o princípio geral da PCR, e a sua principal característica é que o DNA amplificado é quantificado à medida que se acumula na reação em tempo real após cada ciclo de amplificação. Esses métodos em tempo real melhoraram discretamente, mas de forma coerente, a sensibilidade analítica e clínica quando as amostras de pacientes com hanseníase paucibacilar foram avaliadas em amostras de pele. Embora o diagnóstico pela PCR não seja necessário para pacientes multibacilares com quadro clínico exuberante, é extremamente útil para o diagnóstico de casos difíceis e atípicos (Martínez et al, 2014).

Um dos pilares do controle da hanseníase é o exame dos contatos, que faz

parte da estratégia de controle da doença tanto pelo Ministério da Saúde do Brasil como pela Organização Mundial da Saúde (BAZAN- FURINlet al., 2011). Juntamente com o diagnóstico precoce da hanseníase, a avaliação dos contactantes será de grande valor na prevenção de quadros clínicos mais graves que podem levar a deficiências. O tratamento quando estabelecido precocemente pode impedir a transmissão da hanseníase e as consequências do diagnóstico tardio.

1.8 Justificativa

A hanseníase é uma doença crônica incapacitante e, diante da dificuldade de diagnóstico principalmente em pacientes paucibacilares, é evidente a necessidade de buscarmos novos testes e ferramentas que permitam o diagnóstico precoce da doença.

Como o surgimento dos novos testes como o teste rápido, vemos a necessidade de avaliarmos sua efetividade em diferentes populações, comparando-os a testes mais específicos como a PCR.

Além da avaliação de novos testes, por se tratar de uma doença negligenciada, que predominantemente acomete regiões carentes, existe a necessidade destes testes tornarem-se viáveis, simples e com o menor custo possível, tanto na coleta, quanto no armazenamento e análise, motivos pelos quais o trabalho buscar avaliar a diferença entre armazenamento de amostras de raspado intradérmico para extração de DNA em álcool e em papel-filtro de menor custo.

OBJETIVOS

2. Objetivos

2.1 Geral

Comparação de teste rápido sorológico com PCR tempo real em amostras de pacientes diagnosticados clinicamente em ação realizada em Brasília e comparar o armazenamento dessas amostras em papel-filtro e em álcool.

2.2 Específicos

- Comparar os resultados do teste rápido sorológico LID-NDO com resultados de PCR tempo real e com os resultados do ELISA APGL em amostras de indivíduos doentes, coletadas em Brasília-DF em 2014;
- Comparar dois métodos de armazenamento das amostras de raspado intradérmico (armazenamento papel-filtro x álcool);
- Analisar a associação entre a forma clínica dos pacientes e os resultados do teste rápido sorológico e da PCR tempo real.

METODOLOGIA

3. Metodologia

3.1 Casuística

Foram avaliadas 277 amostras de raspado intradérmico armazenadas em papel-filtro (230) e no álcool (47) de 50 pacientes diagnosticados clinicamente em ação realizada em Brasília em 2014, em clínica móvel na carreta da saúde Novartis, instalada na rodoviária do Plano Piloto da cidade.

Todos os pacientes avaliados foram orientados, leram e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido para participar da pesquisa.

3.2 Casos novos

Os pacientes foram diagnosticados clinicamente a partir da avaliação dermato-neurológica quando achado pelo menos um desse sinais: diminuição de sensibilidade e/ou disautonomia em mancha hipocrômica ou eritematosa e/ou espessamente nervoso periférico acompanhado de diminuição de sensibilidade e/ou fraqueza muscular. Todos os pacientes diagnosticados com hanseníase foram avaliados por pelo menos 2 dermatologistas; os quais foram classificados e encaminhados para tratamento aos serviços de saúde próximos às suas residências. Devido a dificuldade na correlação entre a clínica e as classificações, foram utilizadas as classificações de Madri e Indiana em conjunto.

Questionários foram realizados a fim de se conhecer e avaliar hábitos e costumes dos pacientes e de seus familiares, caracterizando principalmente aspectos sociais e ambientais. As fichas foram catalogadas e os dados repassados para uma planilha eletrônica (Excel).

3.3 Coleta das amostras biológicas

a. Raspado intradérmico: A coleta foi realizada com pinçamento da pele para provocar isquemia local, seguindo pequena incisão com bisturi e raspagem, com a lâmina. Dentro da incisão, a coleta do material obtido é feita com as costas da lâmina e transferida para o papel-filtro e acondicionada em papel-laminado, e em tubo com álcool 70%. Foram coletadas amostras das seguintes regiões: orelhas, cotovelo, joelhos e lesão. Essas amostras foram armazenadas em papel-filtro, separadas de acordo com o sítio de coleta e armazenadas em álcool sem a separação por sítio (todas as amostras no mesmo tubo).

b. Sangue: Em todos os indivíduos foram coletadas amostras de sangue periférico por punção venosa em tubo EDTA, cerca de 10-20µl de sangue foram utilizados para realização do teste rápido sorológico NDO-LID e o plasma foi separado para ser utilizado no ELISA APGL1. Todo o material biológico coletado foi processado diariamente e armazenado.

3.4 Extração de DNA e PCR

a. Álcool: a extração do DNA do material armazenado no álcool foi realizada seguindo as orientações do fabricante contidas no kit Qiagen, conforme descritas no protocolo abaixo:

- Realizada centrifugação a 14.000 rpm por 10 minutos para retirada do álcool.
- Foi adicionado 1ml solução salina para reidratação da amostra por 1 hora, que foi novamente centrifugada a 14.000 rpm para retirada da solução salina;
- Adicionado 180µl do tampão e 20µl de proteinase K ao pellet, misturado no vortex e incubado a 56°C overnight;
- No dia seguinte, após 15 segundos no vortex, foi adicionado 200µl do tampão e incubado por 1 hora a 56°C;
- Adicionado 200 µl de etanol 96%;

- A mistura foi transferida para coluna de centrifugação DNeasy Mini colocada em um tubo coletor de 2 ml. Centrifugado a 8.000 rpm por 1 minuto, o tubo coletor foi descartado;
- A coluna de centrifugação foi colocada em um novo tubo coletor de 2ml. Adicionado 500µl do tampão AW1, centrifugado por 1 minuto a 8.000 rpm. Descartado o tubo coletor;
- A coluna de centrifugação foi colocada em um novo tubo coletor de 2ml. Adicionado 500µl do tampão AW2, centrifugado por 3 minutos a 14.000 rpm. Descartado o tubo coletor;
- A coluna de centrifugação foi transferida para um tubo de microcentrífuga novo de 2ml;
- Foi adicionado 75µl de tampão ao centro da membrana da coluna para eluição do DNA. Incubado por 1 minuto à temperatura ambiente e centrifugado por 1 minuto a 8.000 rpm;
- O passo acima foi repetido para aumentar o rendimento do DNA;
- A coluna foi descartada e o DNA extraído foi acondicionado em freezer -20° até o momento de uso na PCR.

b. Papel-filtro: a extração de DNA do papel-filtro foi realizada da seguinte forma: a região do papel que continha a amostra foi recortada com uma tesoura e colocada em um microtubo, adicionou-se água MilliQ autoclavada, volume suficiente para submergir o pedaço de papel (aproximadamente 100µl), para eluição do material o tubo foi incubado á temperatura de 95° C por 15 minutos.

c. PCR: A PCR em tempo real foi realizada no termociclador Rotor Gene Qiagen, usando par de primers específicos para a região gênica RLEP com a seguinte sequência: F-5' ATTTCTGCCGCTGGTATCGGT 3', R-5' TGCGCTAGAAGGTTGCCGTAT 3'. Antes da realização das reações, o par de primers foi testado quanto especificidade, em amostras de leishmaniose e micobacteriose. Para a realização da PCR foi utilizado 25 µl do master mix sybr green-Promega, 18 µl de água e 1 µl de cada primer que estava a uma concentração de 10 µM. Foi seguido o seguinte protocolo de amplificação: holding stage: 95° C- 2 min; 40 ciclos: 95°C- 30 seg / 53°C- 30 seg / 72°C- 30 seg; curva de melting: 55°- 95°C. Foi feito um pool das amostras dos diferentes síticos do mesmo paciente; quando havia resultado positivo, as amostras eram investigadas individualmente.

Quantitation data for Cycling A.Green

Figura 9. Quantificação DNA- PCR em tempo real

Melt data for Melt A.Green

Figura 10. Melt- PCR tempo real

3.5 Sorologia

a. Teste rápido sorológico (Orange life®):

Uma gota de sangue total [10-20 µl] foi colocada no poço do dispositivo, adicionando 2 gotas do tampão, seguindo as instruções do fabricante. Os resultados de NDO-LID® foram avaliados visualmente por três avaliadores independentes usando pontuações qualitativas (positivas ou negativas) e semi-quantitativas (0, 1+,

2+). Os resultados qualitativos finais foram estabelecidos quando pelo menos dois avaliadores concordaram com um resultado.

b. ELISA anti-PGL 1

Uma microplaca de 96 poços foi sensibilizada com a proteína PGL-1 (12,5ng/50µL/poço), incubada *overnight* a 4°C. Depois, lavou-se 3x com PBS Tween 0,05% (PBS/T), e a solução de bloqueio (BSA 1% em PBS/T) foi adicionada e incubada por 1 hora em temperatura ambiente (TA). A seguir, o soro foi diluído a 1:400, na mesma solução de bloqueio, e adicionado aos poços. Após 2h de incubação em TA, os poços foram lavados 6x com PBS/T, e 100 µL do anticorpo anti-IgM humano conjugado com HRP foi adicionado (1:20000, Abcam, Cambridge, UK). Após 2 horas de incubação, a placa foi lavada e 100 µL substrato TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) foi adicionado, após aproximadamente 15 minutos, a reação foi bloqueada com 50µL solução *stop* (ácido sulfúrico 1M). A leitura da absorbância foi feita em 450 nm em leitora de microplaca (Asys Expert Plus-Microplate Reader UK).

3.6 Análise estatística

Para analisar a concordância entre os métodos foi utilizado o coeficiente kappa. Este mede o grau de concordância entre testes quando as variáveis são categóricas. Quando o coeficiente assume seu valor máximo, 1, corresponde a uma perfeita concordância.

3.7 Ética

Este estudo faz parte de um projeto maior (Hanseníase Brasil) aprovado pelo Comitê de ética do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto sob o número 723.534 em 14 de julho de 2014.

RESULTADOS

4. Resultados

Os indivíduos avaliados compareceram por demanda espontânea após divulgação na mídia do Distrito Federal da carreta da saúde da Fundação Novartis, constituída de estrutura de cinco consultórios e um espaço para coleta, instalada no pátio da Rodoviária do Plano Piloto de Brasília durante quatro dias. Com o apoio da equipe de voluntários da Organização Não-Governamental - Grupo de Apoio das Mulheres Atingidas pela Hanseníase (GAMAH) e de profissionais da saúde do DF, a triagem dos indivíduos foi realizada baseando-se nos sinais e sintomas relacionados à doença e/ou história de contato com paciente com hanseníase. Foram dispensados apenas os pacientes que apresentavam queixas sem relação alguma com hanseníase. Os 434 indivíduos selecionados eram procedentes de 22 municípios diferentes dos estados de Goiás, Mato Grosso e Distrito Federal. Dentre todos os 434 indivíduos avaliados na ação, 50 (11,52%) foram diagnosticados clinicamente com hanseníase, média de idade de 42,9 anos, idade mínima de 9 anos e máxima de 74 anos (Tabela 2), e maioria do sexo feminino (64%). No momento do diagnóstico foram classificados, a maioria, como forma clínica dimorfa (76%) e operacionalmente como multibacilares (90%), conforme classificações de Ridley e Jopling e Madri (Tabela 3).

Dos 50 pacientes, foram coletadas 277 amostras de raspado intradérmico, incluindo os diferentes sítios de coleta, sendo 230 armazenadas no papel-filtro e 47 armazenadas no microtubo com álcool 70%. O teste rápido sorológico foi realizado em todos os pacientes durante a coleta.

Entre os pacientes diagnosticados clinicamente com hanseníase, o teste rápido apresentou-se positivo em 62% (31) dos indivíduos, o ELISA anti- PGL1 foi positivo em 56% (28), a PCR das amostras armazenadas no álcool foi positiva em 17,02% (8) das amostras e a PCR das amostras armazenadas no papel-filtro foi positiva em 16% (8) das amostras (Tabela 3).

Entre os pacientes não diagnosticados com hanseníase, 338 concordaram em se submeter a coleta de sangue para a realização do teste rápido e anti-PGL1. Dos 338 indivíduos não-doentes, 93 (27,51%) relataram ser contactantes de pacientes com hanseníase. Entre os contactantes, o teste rápido sorológico foi positivo em 48

(51,6%) e o anti-PGL1 foi positivo em 28 (30,1%). Entre os 245 indivíduos não-doentes e não contactantes, o teste rápido foi positivo em 148 (60,4%) e o anti-PGL1 foi positivo em 84 (34,3%).

Tabela 2. Características e classificação dos 50 pacientes analisados.

Variáveis	Frequência	Percentual
Sexo		
F	32	(64)
M	18	(36)
Forma Clínica (RJ + Madrid)		
MHI	3	(6)
MHT	2	(4)
MHDT	5	(10)
MHDD	25	(50)
MHDV	8	(16)
MHV	3	(6)
MHN	4	(8)
Idade		
0- 10 anos	1	(2)
11- 20 anos	4	(8)
21- 40 anos	17	(34)
41- 60 anos	19	(38)
61- 80 anos	9	(18)

Legenda: MHDD: hanseníase dimorfa- dimorfa; MHDT: hanseníase dimorfa- tuberculíde; MHDV: hanseníase dimorfa- virchowiana ; MHI: hanseníase indeterminada; MHN: hanseníase neural pura; MHT: hanseníase tuberculóide; MHV: hanseníase virchowiana.

Tabela 3. Resultados respectivos do teste rápido, ELISA anti- PGL1, PCR em álcool e PCR em papel filtro.

Exame	Frequência	Percentual
TESTE SOROLÓGICO		
	n=50	
Negativo	19	(38)
Positivo	31	(62)
ELISA ANTI- PGL1		
	n=50	
Negativo	22	(44)
Positivo	28	(56)
PCR ÁLCOOL		
	n=47	
Negativo	39	(82,98)
Positivo	8	(17,02)
PCR PAPEL FILTRO		
	n=50	
Negativo	42	(84)
Positivo	8	(16)

Dos 50 pacientes diagnosticados clinicamente com hanseníase, o teste rápido sorológico foi positivo em 62% dos casos (31 pacientes), na seguinte distribuição: negativo em 100% dos casos de MHI; positivo em 100% dos casos de MHT; positivo em 80% dos casos de MHDV, positivo em 56% dos casos de MHDD; positivo em 87,5% dos casos de MHDV; positivo em 100% dos casos de MHV e positivo em 25% dos casos de MHV (Tabela 4).

Tabela 4. Distribuição dos resultado do teste rápido sorológico de acordo com a forma clínica da doença

Forma Clínica (RJ)	TESTE SOROLÓGICO (RÁPIDO)		
	Negativo	Positivo	Total
MHI	3 (100)	0 (0)	3
MHT	0 (0)	2 (100)	2
MHDT	1 (20)	4 (80)	5
MHDD	11 (44)	14 (56)	25
MHDV	1 (12,5)	7 (87,5)	8
MHV	0 (0)	3 (100)	3
MHN	3 (75)	1 (25)	4
Total	19	31	50

A PCR nas amostras armazenadas no álcool foi positiva em 8 pacientes (17,02%); sendo 100% negativa nos pacientes classificados como MHI, MHT, MHDT e MHN; 100% positiva nos pacientes classificados como MHV; 4,35% nos MHDD e 57,14% dentre os MHDV (Tabela 5).

Nas amostras armazenadas no papel filtro, a PCR foi positiva em 8 pacientes (16%); sendo 100% negativa nos pacientes classificados como MHI, MHT, MHDT e MHN; 100% positiva nos pacientes classificados como MHV; 4% nos MHDD e 50% nos MHDV (Tabela 5).

Tabela 5. Distribuição dos resultados da PCR realizada nas amostras armazenadas no álcool de acordo com a forma clínica da doença.

Forma Clínica (RJ)	PCR ÁLCOOL			PCR PAPEL FILTRO		
	Negativo	Positivo	Total	Negativo	Positivo	Total
MHI	3 (100)	0 0	3	3 (100)	0 0	3
MHT	2 (100)	0 0	2	2 (100)	0 0	2
MHDT	5 (100)	0 0	5	5 (100)	0 0	5
MHDD	22 (95,65)	1 (4,35)	23	24 (96)	1 (4)	25
MHDV	3 (42,86)	4 (57,14)	7	4 (50)	4 (50)	8
MHV	0 0	3 (100)	3	0 0	3 (100)	3
MHN	4 (100)	0 0	4	4 (100)	0 0	4
Total	39	8	47	42	8	50
Frequência de Missing = 3						

Dos 8 pacientes com PCR positiva nas amostras conservadas no papel-filtro, 7 tinham 5 amostras: orelha direita, orelha esquerda, joelhos, cotovelos e lesão; e 1 paciente, 4 amostras: orelha direita, orelha esquerda, joelhos e cotovelos. O sítio de coleta que apresentou maior positividade foram os cotovelos (75%), seguido da orelha esquerda (62,5%), lesão (50%), orelha direita (50%) e joelhos (50%) (Tabela 6).

Tabela 6. Distribuição dos resultados da PCR separados pelo sítio de coleta da amostra armazenada em papel filtro e álcool.

Local	PCR PAPEL FILTRO		Total
	NEGATIVA	POSITIVO	
A	0 0	8 (100)	8
C	2 (25)	6 (75)	8
J	4 (50)	4 (50)	8
L	3 (42,86)	4 (57,14)	7*
OD	4 (50)	4 (50)	8
OE	3 (37,5)	5 (62,5)	8

Legenda: A: amostras armazenadas no álcool (todos os sítios juntos); C: amostra de raspado dérmico coletada dos cotovelos; J: amostra de raspado dérmico coletada dos joelhos; L : amostra de raspado dérmico coletada da lesão; OD: amostra de raspado dérmico coletada da orelha direita; OE: amostra de raspado dérmico coletada da orelha esquerda.

*: um paciente não apresentou amostra.

Todos os teste realizados apresentaram positividade maior nas formas multibacilares. O teste rápido sorológico foi positivo em 29 (64,44%) pacientes multibacilares, e positivo em 2 (40%) pacientes paucibacilares (Tabela 7). A PCR realizada nas amostras armazenadas no álcool foi positiva em 19,05% (8 pacientes) multibacilares e não foi positiva em nenhum paciente paucibacilar diagnosticado clinicamente (Tabela 8); a PCR realizada nas amostras armazenadas no papel-filtro foi positiva em 17,78% (8 pacientes) multibacilares e não foi positiva em nenhum pacientes paucibacilar diagnosticado clinicamente (Tabela 8).

Tabela 7. Correlação entre forma clínica de hanseníase dos pacientes e o resultado do teste sorológico.

Forma Clínica (OP)	TESTE RÁPIDO		
	Negativo	Positivo	Total
MB	16 (35,56)	29 (64,44)	45
PB	3 (60)	2 (40)	5
Total	19	31	50

Tabela 8. Correlação entre forma clínica de hanseníase dos pacientes e o resultado da PCR realizada nas amostras armazenadas no álcool e no papel filtro.

Forma Clínica (OP)	PCR ÁLCOOL			PCR PAPEL FILTRO		
	Negativo	Positivo	Total	Negativo	Positivo	Total
MB	34 (80,95)	8 (19,05)	42	37 (82,22)	8 (17,78)	45
PB	5 (100)	0 0	5	5 (100)	0 0	5
Total	39	8	47	42	8	50

A força da concordância entre o teste rápido sorológico e o PCR foi *fair* (suave), pois apresentou coeficiente de kappa de 0,24 na análise da concordância entre o teste rápido e PCR das amostras no álcool (Tabela 9) e 0,21 entre o teste rápido e PCR das amostras no papel-filtro (Tabela 10).

A concordância entre o PCR das amostras no álcool e no papel-filtro foi perfeita, kappa igual a 1 (Tabela 11).

A força da concordância entre o teste rápido e os resultados do ELISA APGL1 também foi suave (kappa de 0,382) (tabela 12).

Tabela 9. Concordância entre teste rápido e PCR das amostras no álcool.

TESTE RÁPIDO	PCR ÁLCOOL			Coeficiente de Kappa	IC 95%
	Negativo	Positivo	Total		
Negativo	19 (48,72)	0 0	19	0,24	0,08 ; 0,41
Positivo	20 (51,28)	8 (100)	28		
Total	39	8	47		

Tabela 10. Concordância entre o teste rápido sorológico e a PCR das amostras no papel-filtro.

TESTE RÁPIDO	PCR PAPEL FILTRO			Coeficiente de Kappa	IC 95%
	Negativo	Positivo	Total		
Negativo	19	0	19	0,21	0,06 ; 0,35
	(45,24)	0			
Positivo	23	8	31	0,21	0,06 ; 0,35
	(54,76)	(100)			
Total	42	8	50		

Tabela 11. Concordância entre a PCR das amostras no álcool e no papel-filtro.

PCR ÁLCOOL	PCR PAPEL FILTRO		
	Negativo	Positivo	Total
Negativo	39	0	39
	(100)	0	
Positivo	0	8	8
	0	(100)	
Total	39	8	47

*Todos os exames foram concordantes, neste caso não há necessidade do cálculo de coeficiente, pois seu valor é máximo, ou seja, igual a 1.

Tabela 12. Concordância entre o teste rápido sorológico e o ELISA APGL1 nos pacientes diagnosticados com hanseníase

TESTE RÁPIDO	ANTI- PGL1			Coeficiente de Kappa	IC 95%
	Negativo	Positivo	Total		
Negativo	13	6	19	0,382	0,10 ; 0,65
	(59,09)	(21,42)			
Positivo	9	22	31	0,382	0,10 ; 0,65
	(40,9)	(78,57)			
Total	22	28	50		

DISCUSSÃO

5. Discussão

O diagnóstico de hanseníase é essencialmente clínico, realizado através de uma análise da história e condições de vida do paciente e exame dermatológico. O esfregaço cutâneo está entre os exames complementares mais utilizados para confirmar este diagnóstico e determinar a classificação operacional da hanseníase. Outras avaliações, como o exame histopatológico, a reação de Mitsuda, testes sorológicos e a identificação do *Mycobacterium leprae* através da reação em cadeia da polimerase (PCR) também são usados (Carvalho et al, 2015).

É evidente a necessidade de buscarmos exames e formas para o diagnóstico precoce da hanseníase e a diminuição de sequelas neurológicas. A hanseníase é uma doença negligenciada que afeta a população de regiões mais carentes do Brasil e do mundo, sendo necessária a busca por exames complementares de acesso fácil e menor custo.

Métodos moleculares modernos como a PCR são mais específicos e sensíveis para a detecção de DNA do bacilo em amostras clínicas. Durante os últimos 30 anos, os métodos de PCR foram desenvolvidos para amplificar diferentes alvos genéticos de *M. leprae*, a região RLEP foi considerada muito sensível e específica para *M. leprae* e pode detectar até 10 fg de DNA purificado (Turankar et al, 2015).

O desenvolvimento de instrumentos eficazes para a detecção precoce da infecção, como os testes rápidos, que podem ser aplicados por não especialistas em uma fase precoce, tem sido considerado uma prioridade na investigação (Geluk et al, 2012).

A detecção do DNA do *M. leprae* por PCR convencional apresenta sensibilidade e especificidade significativas quando comparadas com as técnicas convencionais de coloração de bacilos (Truman et al, 2008). No entanto, a PCR quantitativa em tempo real mostrou ainda maior sensibilidade e especificidade no diagnóstico de vários parasitas e foi aplicada com sucesso na detecção do DNA do *M. leprae*, em esfregaços cutâneos e biópsias (Martinez et al, 2006).

Cerca de 50% dos casos não diagnosticados pelo exame histológico padrão e outros métodos clínicos ou laboratoriais podem ser confirmados pelo uso de métodos moleculares convencionais. Entretanto, também deve ser considerado o fato

de que o diagnóstico baseado na PCR tem um nível considerável de falha. Isto ocorre provavelmente devido à variabilidade de formas clínicas. O pequeno número de bacilos entre pacientes paucibacilares reflete a necessidade de otimizar os métodos moleculares (Katoch et al, 2007; Martinez et al, 2011).

A maioria dos pacientes diagnosticados clinicamente na campanha em Brasília que coletaram as amostras é acometida por formas multibacilares da doença, apresentando assim maior quantidade de DNA do bacilo nas amostras.

Os testes realizados apresentaram positividade maior nas formas multibacilares. O teste rápido sorológico foi positivo em 29 (64,44%) pacientes multibacilares, e positivo em 2 (40%) pacientes paucibacilares. Tanto a PCR realizada nas amostras armazenadas no álcool e no papel-filtro foi positiva em 8 pacientes multibacilares, (19,05% dos pacientes multibacilares nas amostras armazenadas no álcool e 17,78% nas amostras armazenadas no papel-filtro) e foi negativa em todos os pacientes paucibacilares.

Apesar da positividade nos grupos de pacientes multibacilares ter sido expressiva, vale levantarmos o ponto de que os grupos são diferentes; dos 50 pacientes diagnosticados, apenas 5 são classificados como paucibacilares, ressaltando que a dificuldade no diagnóstico desses indivíduos não é apenas laboratorial, mas também existe no diagnóstico clínico.

Todos os 8 pacientes que apresentaram a PCR tempo real positiva no papel-filtro também apresentaram a PCR tempo real positiva nas amostras armazenadas no álcool e o teste rápido sorológico positivo. Esses 8 pacientes apresentavam formas multibacilares da hanseníase (1 paciente classificado como MHDD, 4 pacientes classificados como MHDV e 3 pacientes classificados como MHV). Nenhum paciente apresentou amostra positiva apenas no papel-filtro ou apenas no álcool. Com isso podemos concluir que em nossas amostras tanto a forma de armazenamento (álcool x papel-filtro) como a forma de extração do material genético não interferem na positividade da PCR.

A diferença no valor percentual entre amostras no álcool x papel-filtro só existe porque 3 dos 50 pacientes diagnosticados não apresentam amostra armazenada no álcool. Estudos indicam que o cartão FTA (semelhante ao papel-filtro), que permite a coleta, transporte e arquivamento de amostras clínicas, é uma alternativa atraente ao uso do etanol para a preservação de amostras DNA de *M. Leprae* (Aye et al, 2011). O armazenamento no papel-filtro pode ser priorizado em detrimento do

armazenamento no álcool, que exige uma extração com o uso de kit, com maior custo. Ressaltamos a importância desses dados, visto que as diferenças nos custos de coleta e extração do DNA são significativas, sendo o custo no álcool 11 vezes superior (estimado custo de coleta e extração de R\$15,76 por amostra no álcool e R\$1,36 por amostra no papel filtro).

Dos 8 pacientes com PCR positiva nas amostras conservadas no papel-filtro, 7 tinham 5 amostras: orelha direita, orelha esquerda, joelhos, cotovelos e lesão e 1 paciente 4 amostras: orelha direita, orelha esquerda, joelhos e cotovelos. O sítio de coleta que apresentou maior positividade foram os cotovelos (75%), seguido da orelha esquerda (62,5%), lesão (50%), orelha direita (50%) e joelhos (50%). O resultado esperado seria uma maior positividade nas lesões, pois esperaríamos uma maior quantidade de bacilo. A necessidade de coleta de todos os sítios e o armazenamento separado do material de cada sítio pode ser questionado frente a esses resultados, objetivando menor tempo de coleta, facilidade no armazenamento e o bem-estar do paciente. Fatores como local de coleta e características individuais do paciente podem ter causado interferência na coleta de material.

O polo virchowiano é caracterizado por imunidade mediada por células específica fraca ou ausente e títulos de anticorpos elevados, de modo que a replicação e disseminação bacilares conduzem a elevados índices bacterianos. Dados suportam a utilização de ensaios de detecção de anticorpos em algum momento do algoritmo de diagnóstico, mostrando sensibilidade de 95 % e especificidade de 95,2% em pacientes virchowianos. No outro extremo do espectro de hanseníase, os pacientes tuberculoides apresentam imunidade mediada por células ao *M. leprae* específica e produção de anticorpos baixa ou ausente. Pacientes paucibacilares são diagnosticados com base em sintomas e histopatologia porque os índices bacilares são negativos (Wen et al, 2014).

Do grupo de 50 pacientes diagnosticados clinicamente com hanseníase, o teste rápido sorológico foi positivo em 62% dos casos, na seguinte distribuição: negativo em 100% (3) dos casos de MHI; positivo em 100% (2) dos casos de MHT; negativo em 20% (1) e positivo em 80% (4) dos casos de MHDT; negativo em 12,5% (1) e positivo em 87,5% (7) dos casos de MHDV; positivo em 100% (3) dos casos de MHV; negativo em 75% (3) e positivo em 25% (1) dos casos de MHN. Os 8 pacientes que apresentaram as amostras positivas na PCR, do grupo de 50 pacientes diagnosticados clinicamente, também apresentaram o teste sorológico positivo. O

ELISA APGL 1 foi positivo em 56% (28) dos casos dos pacientes diagnosticados clinicamente. Entre os 8 pacientes com PCR positiva, o ELISA foi positivo em 7 (87,5%) e foi negativo em 1 paciente, multibacilar, classificado com MHDV.

Se analisarmos os resultados dos testes nos indivíduos não- doentes, o teste rápido LID-NDO foi positivo em 51,76% entre os contactantes e 60,4% nos não-contactantes. O anti-PGL1 foi positivo em 30,1% dos contatos e 34,3% dos indivíduos não-doentes e não-contactantes. Esses dados mostram a baixa especificidade desses testes e a limitada utilização dos mesmos no diagnóstico de hanseníase.

O teste rápido sorológico LID-NDO que utilizamos é formado pela combinação de LID-1 e PGL- 1, e pode ser considerado para apenas mostrar a presença de anticorpos contra o *M. leprae* e não do bacilo, sendo um bom teste principalmente para screening infeccioso. Também será positivo em pessoas que tiveram contato com a hanseníase, mas não desenvolveram a doença.

A porção LID é uma composição da fusão das proteínas ML0405 e ML2331 (designada LID-1 - leprosy IDRI diagnostic) e já foi testada contra um painel de soros prospectivos de indivíduos que desenvolveram hanseníase, e foi observado que a LID-1 era capaz de diagnosticar a hanseníase de 6 a 8 meses antes do início dos sintomas clínicos (Duthie et al, 2007). Trabalhos indicam que aumentos importantes nos títulos de anti-PGL-I e anti-LID-1 indicam infecção subclínica e progressão da doença, mesmo na ausência de lesões cutâneas ou lesões nervosas (Duthie et al., 2015; Spencer et al., 2011; Worobeck et al., 2009).

Estudos recentes ressaltam a importância do teste rápido LID- NDO e anti-PGL1 ferramentas no diagnóstico de hanseníase (Amorim et al, 2016), porém, como visto em nossos dados estes testes devem ser considerados apenas como auxiliares no diagnóstico e avaliados como *screening* de novos focos de infecção. Entretanto a concordância entre o teste rápido sorológico LID- NDO e o ELISA anti- PGL1 observada foi suave com kappa de 0,382. Trabalhos do grupo de pesquisa têm mostrado que indivíduos que apresentaram altos títulos de anti- PGL no ELISA tem potencial para o desenvolvimento da doença ou contato com indivíduo doente.

CONCLUSÃO

6. Conclusão

O exame clínico é ainda essencial para o diagnóstico da hanseníase, principalmente das formas paucibacilares.

Os métodos de armazenamento do material coletado por raspado intradérmico (papel-filtro x álcool) não interferiram no resultado final da PCR. Como a hanseníase está associada a regiões carentes, com menos assistência e recursos, o armazenamento no papel-filtro pode ser feito preferencialmente devido à maior facilidade de armazenamento e ao menor custo para extração do DNA.

O teste rápido sorológico apresentou baixa especificidade, pois teve positividade de 62% no grupo de pacientes doentes (diagnosticados clinicamente) e 57,8% de positividade no grupo de não- doentes e apresentou concordância suave com o ELISA anti- PGL1, porém é um exame mais sensível se comparado a PCR (positividade de 17,02% e 16% nas amostras armazenadas no álcool e papel-filtro respectivamente). O trabalho mostra que esses testes têm baixa sensibilidade para serem utilizados como diagnóstico. Sua utilização deve ocorrer em conjunto com outros métodos de diagnóstico e, principalmente, como *screening* e não como ferramenta diagnóstica.

REFERÊNCIAS

7. Referências Bibliográficas

Amorim FM, Nobre ML, Ferreira LC, et al. Identifying Leprosy and Those at Risk of Developing Leprosy by Detection of Antibodies against LID-1 and LID-NDO. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 10, n. 9, p. e0004934, 2016.

Araujo AERDA, Aquino DMCD, Goulart IMB, et al . Neural complications and physical disabilities in leprosy in a capital of northeastern Brazil with high endemicity. **Rev. bras. epidemiol.**, v. 17, n. 4, p. 899-910, 2014 .

Araujo MG. Hanseníase no Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 36, n. 3, p. 373-382, 2003.

Aye KS, Matsioka M, Kai M, Kyaw K, Win AA, Shwi MM, Thein M, Htoo MM, Htoon MT. FTA card utility for PCR detection of *Mycobacterium leprae*. **Jpn. J. Infect. Dis.**, v. 64, p. 246- 248, 2011.

Barreto JG, Guimarães LS, Leão MRN et al. Anti- PGL- I seroepidemiology in leprosy cases: household contacts and school children from a hyperendemic municipality of the Brazilian Amazon. **Lep Rev.**, v. 82, p. 358-370, 2011.

Barreto JG, Bisanzio D, Souza Guimarães L, et al. Spatial analysis spotlighting early childhood leprosy transmission in a hyperendemic municipality of the Brazilian Amazon region. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 2, p. e2665, 2014.

BazanFurini R, Motta AC, Simão JC, et al. Early detection of leprosy by examination of household contacts, determination of serum anti-PGL-1 antibodies and consanguinity. **Mem.Inst.Oswaldo Cruz**, v.106, p.536-540, 2011.

Bechelli LM, Rotberg A. **Compêndio de Leprologia**. 2ª Edição. Ministério da Educação e Saúde. Departamento Nacional de Saúde. Serviço Nacional de Lepra, 1956.

Brasil. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Diretrizes para vigilância, atenção e controle da hanseníase**. Portaria No 3.125, de 7 de outubro de 2010. (2010).

Brasil. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Hanseníase no Brasil: dados e indicadores selecionados**. SVS/DVE/PNCH. (2009).

Brasil. Vigilância em saúde: **situação epidemiológica da hanseníase no Brasil**. Brasília, Ministério da Saúde; 2008.

Brasil. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Políticas de Saúde. **Guia para controle da hanseníase**. (2002).

Brasil MTLRF, de Oliveira LR, Rímoli NS, et al. Anti PGL-1 serology and the risk of leprosy in a highly endemic area in the State of São Paulo, Brazil: four-year follow-up. **Rev Bras Epidemiol**, v. 6, n. 3, p. 262-271, 2003.

Bührer-Sékula S. Sorologia PGL-I na hanseníase. **Rev Soc Bras Med Trop**. 2008;41(2):3–5 (2008).

Cardona-Castro NM, Restrepo-Jaramilo S, Gil de la Ossa M, Brennan PJ. Infection by *Mycobacterium leprae* of household contacts of lepromatous leprosy patients from a post-elimination leprosy region of Colombia. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 2005;100(7):703–7.

Carvalho APM, Fabri ACOL, Oliveira RC, Lana FCF. Factors associated with anti-phenolic glycolipid-I seropositivity among the household contacts of leprosy cases. **BMC Infect Dis**,15: 219, 2015.

Cavalcanti AAL, Lucena-Silva N, Montarroyos UR, et al. Concordance between expected and observed bacilloscopy results of clinical forms of leprosy: a 6-year retrospective study in Recife, State of Pernambuco, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 5, p. 616-619, 2012.

Coelho FACO, Carvalho APM, Vieira NF, et al. Integrative literature review of the reported uses of serological tests in leprosy management. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.49, n.2, p.158-164, 2016.

Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. **Nature**, v. 409, n. 6823, p. 1007-1011, 2001.

Costa TA, Cruvinel DL, Roma FR, et al . Avaliação da concordância entre exames clínicos e laboratoriais no diagnóstico da hanseníase. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 41(Supl 2), p. 48-55, 2008.

Duthie MS, Goto W, Ireton. GC. et al. Use of protein antigens for early serological diagnosis of leprosy. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 11, p. 1400-1408, 2007

Foss NT. Hanseníase: aspectos clínicos, imunológicos e terapêuticos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 74,n. 2, p. 113-119, 1999.

Freitas LRS, Duarte EC, Garcia LP. Trends of main indicators of leprosy in Brazilian municipalities with high risk of leprosy transmission, 2001–2012. **BMC Infectious Diseases**, v.16, n. 1, p.472, 2016.

Geluk A, Bobosha K, van der Ploeg-van Schip JJ, Spencer JS, Banu S, Martins MV, et al. New biomarkers with relevance to leprosy diagnosis applicable in areas hyperendemic for leprosy. **J Immunol.** 2012;188(10):4782–91. doi: 10.4049/jimmunol.1103452.

Geluk A, Klein MR, Franken KL, et al. Postgenomic approach to identify novel Mycobacterium antigens with potential to improve immunodiagnosis of infection. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 5636- 5644, 2005.

Gunatilake SB, Settinayake S. Leprosy. **Pratica Neurology**, v. 4, p. 194- 203, 2004.
Katoch VM, Lavania M, Chauhan DS, Sharma R, Hirawati, et al. Recent advances in molecular biology of leprosy. **Indian J Lepr.** 2007;79:151–166.

Lini N, Shankernarayan NP, Dharmalingam K. Quantitative real-time PCR analysis of Mycobacterium leprae DNA and mRNA in human biopsy material from leprosy and reactional cases. **J Med Microbiol** 2009; 58: 753–759.

Lockwood DNJ, Suneetha L, De Sagili K, et al. Cytokine and protein markers of leprosy reaction in skin and nerves: Baseline result for the North Indian infir cohort. **PLoS Negl Trop Dis**, v.5, n.12, p. e1322, 2011.

Marques MAM, Pinho MB, Rosa TLSA, Pujari V, Lemes RMR, Lery LMS, Silva CAM, Guimarães AC, Atella GC, Wheat WH, Brennan PJ, Crick DC, Belisle JT, Pessolania MCV. The Essential Role of Cholesterol Metabolism in the Intracellular Survival of *Mycobacterium leprae* Is Not Coupled to Central Carbon Metabolism and Energy Production. *Journal of Bacteriology*; v. 197, n. 23, p.3698-3707.

Martinez AN, Alves MR, Sarno EN, Moraes MO. Evaluation of qPCR-Based Assays for Leprosy Diagnosis Directly in Clinical Specimens. **PLoS Negl Trop Dis**, Oct; 5(10): e1354, 2011.

Martinez NA, Britto CFPC, Nery JAC et al. Evaluation of real-time and conventional PCR targeting complex 85 genes for detection of Mycobacterium leprae DNA in skin

biopsy samples from patients diagnosed with leprosy. **J Clin Microbiol** ; 44: 3154–3159, 2006.

Martinez NA, Talhari C, Moraes MO, et al. PCR- based techniques for leprosy diagnosis: from de laboratory to clinic. **PLoS Negl Trop Dis**, v.8, n.4, p. e2655, 2014.

Mizoguti DDF, Hungria EM, Freitas A A, et al. Multibacillary leprosy patients with high and persistent serum antibodies to leprosy IDRI diagnostic-1/LID-1: higher susceptibility to develop type 2 reactions. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 7, p. 914-920, 2015.

Moet FJ, Meima A, Oskam L, Richardus JH. Risk factors for the development of clinical leprosy among contacts, and their relevance for targeted interventions. **Lepr Rev.**75(4):310–26, 2004.

Moura RS, Calado KL, Oliveira MLW, Bühner-Sékula S. Sorologia da hanseníase utilizando PGL-I: revisão sistemática. **Rev Soc Bras Med Trop**;41(Suppl 2):11–8, 2008.

Ooi WW, Srinivasan J. Leprosy and the peripheral nervous system: basic and clinical aspects. **Muscle & Nerve**, v. 30, n. 4, 2004.

Penna ML, Oliveira ML, Penna GO. The epidemiological behaviour of leprosy in Brazil. **Lepr Rev**, v. 80, p. 332–344, 2009.

Reibel F, Cambau E, Aubry A. Update on the epidemiology, diagnosis, and treatment of leprosy. **Medecine et maladies infectieuses**, v. 45,n. 9, p. 383-393, 2015.

Rodrigues LC, Lockwood DN. Leprosy now: epidemiology, progress, challenges, and research gaps. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, n. 6, p. 464–70, 2011.

Salgado CG, Ferreira DV, Frade MA, et al. High Anti-Phenolic Glycolipid- I IgM Titers and Hidden Leprosy Cases, Amazon Region. **Emerg.Infect.Dis.**,v.18, p.889-890, 2012.

Sampaio SAP, Rivitti EA. Hanseníase. Artes Médicas publishing company. In: **Dermatologia. 3rd edition**. Edited by Artes Médicas. São Paulo; 2007. p. 467–87.

Sarkar R, Kaur I, Das A, Sharma VK. Macular Lesions in Leprosy: A Clinical, Bacteriological and Histopathological Study. **The Journal of Dermatology.**, V. 26, p. 569-576, 1999.

Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, et al. The continuing challenges of leprosy. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.19, p.338-381, 2006.

SINAN. <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/hanseniaase/bases/Hansbrnet.def>, acesso 21 de outubro de 2013.

Singh P, Cole ST. Mycobacterium leprae: genes, pseudogenes and genetic diversity. **Future microbiology**, v. 6, n. 1, p. 57-71, 2011.

Spencer JS, Brennan PJ. The role of Mycobacterium leprae phenolic glycolipid I (PGL-I) in serodiagnosis and in the pathogenesis of leprosy. **Lepr Rev**, v. 82, n.4, p. 344-57, 2011.

Spencer JS, Duthie MS, Geluk A, et al. Identification of serological biomarkers of infection, disease progression and treatment efficacy for leprosy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. (107 Suppl 1), p. 79-89, 2012.

Souza CS. Hanseníase: formas clínicas e diagnóstico diferencial. **Medicina (Ribeirao Preto. Online)**, v. 30, n. 3, p. 325-334, 1997.

Suzuki K, Tanigawa K, Kawashima A, et al. Chimpanzees used for medical research shed light on the pathoetiology of leprosy. **Future. Microbiol.** v.6,p.1151-1157,2011.

Turankar RP, Pandey S, Lavania M, et al. Comparative evaluation of PCR amplification of RLEP, 16S rRNA, rpoT and Sod A gene targets for detection of M. leprae DNA from clinical and environmental samples. **International journal of mycobacteriology**, v. 4, n. 1, p. 54-59, 2015.

Truman RW, Andrews PK, Robbins NY, et al. Enumeration of Mycobacterium leprae using real-time PCR. **PLoS Negl Trop Dis**, v.2, n.1, p. e328, 2008.

Ura S. Tratamento e controle das reações hansê-nicas. **Hansen Int.**, v. 32, n.1, p. 67-70, 2007.

Vijayakumaran P, Jesudasan K, Mozhi NM, et al. Does MDT arrest transmission of leprosy to household contacts? **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.**, v.66, p.125-130,1998.

Walker SL, Lockwood DNJ. The clinical and immunological features of leprosy. **British medical bulletin**, v. 77, n. 1, p. 103-121, 2006.

WHO Global leprosy update, 2013; reducing disease burden. **Wkly Epidemiol Rec.** ,v. 89, n. 36, p.389–400, 2014.

World Health Organization. Elimination of leprosy: resolution of the 44th World Health Assembly (Resolution No. WHA 44.9) Geneva: WHO; 1991.

Wen Y, You YG, Yuan LC, Yuan YH, Zhang Y, Duthie MS, Li HY. Evaluation of Novel Tools to Facilitate the Detection and Characterization of Leprosy Patients in China. **Biomed Res Int.** 2014: 371828, 2014.

WHO. Accelerating work to overcome the global impact of neglected tropical diseases - a roadmap for implementation. Geneva: World Health Organization; 2012.

Worobec SM. Treatment of leprosy/Hansen's disease in the early 21st century. **Dermatol Ther**, v.22, n. 6, p.518-537, 2009.

APÊNDICES

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO MAIOR DE IDADE

PROJETO (PESQUISA): "Hanseníase no Brasil: diagnóstico de novos casos, identificação de áreas críticas e treinamento de pessoal em municípios brasileiros para manutenção das estratégias de controle da doença" – **AÇÃO: MUNICÍPIO**

LOCAL: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP (DERMATOLOGIA)

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Prof. Dr. Marco Andrey Cipriani Frade

CONVITE: A equipe de profissionais e pesquisadores coordenada pelo Professor Dr. Marco Andrey Cipriani Frade está realizando a pesquisa acima citada. Gostaríamos de lhe convidar a participar desta pesquisa e para isso precisamos de sua autorização.

Este estudo tem o objetivo de identificar pessoas com hanseníase nas comunidades do seu município, com a finalidade de diagnosticar a doença nas formas iniciais e tratar os doentes para evitar futuras incapacidades físicas.

As pessoas que aceitarem participar deste estudo responderão a um questionário para dados de identificação e endereço (5 minutos), serão submetidas a uma consulta médica (história clínica e exame da pele e nervos, aproximadamente 10 minutos), além de serem, submetidas à coleta de uma pequena amostra de sangue (1 colher de sopa) para dosagem de anticorpos (anti-PGL1 e LID) e/ou moléculas do DNA/RNA específicos para a hanseníase em laboratório e, quando necessário, de uma amostra da pele (biópsia sob anestesia local) e/ou raspado dérmico (corte minúsculo de lóbulos das orelhas, cotovelos e/ou joelhos para tentar achar a bactéria misturada na linfa), que serão realizadas por médicos e profissionais de saúde experientes, sempre com a finalidade de identificação da presença da bactéria (*M. leprae*) causadora da hanseníase. Todo o material biológico coletado será armazenado em Biorrepositório já aprovado pelo CEP. Caso a pessoa examinada seja diagnosticada com a doença, sua casa será visitada num horário oportuno para que os contatos (parentes) sejam também avaliados. Caso diagnosticado com hanseníase o indivíduo receberá uma guia de referência (encaminhamento) com todas informações clínicas, diagnóstico e tratamento, com a qual poderá procurar a unidade de saúde mais próxima de sua residência para início do tratamento, garantido pelo SUS. Quaisquer dúvidas que o paciente ou o médico do posto tiver podem usar o telefone abaixo para esclarecimentos devidos.

Todo o exame e coletas de sangue e/ou raspado ocorrerão no próprio domicílio (não gerando nenhum gasto aos indivíduos avaliados) e serão realizados por profissionais treinados, com material limpo e descartável. A coleta de sangue pode provocar pequeno desconforto no momento da picada da agulha, e eventualmente hematoma no local após a coleta. A coleta do raspado dérmico provoca pequena dor no local, no momento da coleta, onde será realizada uma pequena incisão com lamina de bisturi.

A participação nesta pesquisa é voluntária, todos os procedimentos realizados não terão nenhum custo para o participante, e você participa somente se quiser. Sempre que desejar serão fornecidos esclarecimentos sobre cada uma das etapas do estudo pelos contatos abaixo. A qualquer momento, você poderá recusar-se a continuar participando do estudo e, também, poderá retirar seu consentimento, sem que isso traga qualquer penalidade ou prejuízo a você. Além disso, caso se sinta vitimado por algum dano decorrente dessa pesquisa, poderá buscar ressarcimento de acordo com as leis vigentes no país. Após a assinatura da DECLARAÇÃO abaixo em duas vias de igual teor, ficando uma em sua posse, fica garantido o cumprimento do que foi informado acima, a gratuidade de todos os procedimentos e o sigilo de sua identidade e das demais informações.

DECLARAÇÃO

Tendo eu compreendido perfeitamente tudo o que me foi informado AUTORIZO A MINHA PARTICIPAÇÃO NESTA PESQUISA, assim como A GUARDA DO MATERIAL BIOLÓGICO COLETADO em biorrepositório, de forma VOLUNTÁRIA, SEM QUE PARA ISSO EU TENHA SIDO FORÇADO OU OBRIGADO.

Assinatura ou impressão dactiloscópica do participante

Nome legível do participante Maior de idade

LOCAL: _____ **DATA:** _____

Pesquisador responsável: _____

Assinatura do pesquisador responsável: _____

Contatos: 16-36022441 ou 16-36330236; Celular: 16-992087498

Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto (16)3602-2228 para dúvidas éticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO MENOR DE IDADE

PROJETO (PESQUISA): "Hanseníase no Brasil: diagnóstico de novos casos, identificação de áreas críticas e treinamento de pessoal em municípios brasileiros para manutenção das estratégias de controle da doença" **AÇÃO:** MUNICÍPIO

LOCAL: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP (DERMATOLOGIA)

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Prof. Dr. Marco Andrey Cipriani Frade

CONVITE: A equipe de profissionais e pesquisadores coordenada pelo Professor Dr. Marco Andrey Cipriani Frade está realizando a pesquisa acima mencionada. Gostaríamos que seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade participasse desta pesquisa e para isso precisamos de sua autorização.

Este estudo tem o objetivo de identificar pessoas com hanseníase nas comunidades do seu município, com a finalidade de diagnosticar a doença nas formas iniciais e tratar os doentes para evitar futuras incapacidades físicas.

As CRIANÇAS e ADOLESCENTES que participarem deste estudo responderão a um questionário para dados de identificação e endereço (5 minutos), serão submetidas a uma consulta médica (história clínica e exame da pele e nervos, aproximadamente 10 minutos), além de serem, submetidas à coleta de uma pequena amostra de sangue (1 colher de sopa) para dosagem de anticorpos (anti-PGL1 e LID) e/ou moléculas do DNA/RNA específicos para a hanseníase em laboratório e, quando necessário, de uma amostra da pele (biópsia sob anestesia local) e/ou raspado dérmico (corte minúsculo de lóbulos das orelhas, cotovelos e/ou joelhos para tentar achar a bactéria misturada na linfa), que serão realizadas por médicos e profissionais de saúde experientes, sempre com a finalidade de identificação da presença da bactéria (*M. leprae*) causadora da hanseníase. Todo o material biológico coletado será armazenado em Biorrepositório já aprovado pelo CEP. Caso ele seja diagnosticado com a doença, sua casa será visitada num horário oportuno para que os contatos (parentes) sejam também avaliados e, se necessário, tratados. Caso diagnosticado com hanseníase ele receberá uma guia de referência (encaminhamento) com todas informações clínicas, diagnóstico e tratamento, com a qual poderá procurar a unidade de saúde mais próxima de sua residência para início do tratamento, garantido pelo SUS. Quaisquer dúvidas que o paciente, o responsável ou o médico do posto tiver podem usar o telefone abaixo para esclarecimentos devidos.

Todo o exame e coletas de sangue e/ou raspado ocorrerão na própria escola ou no domicílio (não gerando nenhum gasto aos indivíduos avaliados), e serão realizados por profissionais treinados, com material limpo e descartável. A coleta de sangue pode provocar pequeno desconforto no momento da picada da agulha, e eventualmente hematoma no local após a coleta. A coleta do raspado dérmico provoca pequena dor no local, no momento da coleta, onde será realizada uma pequena incisão com lamina de bisturi.

A participação nesta pesquisa é voluntária, seu filho (ou menor sobre sua responsabilidade) participa somente se ele e você quiserem. Sempre que desejar serão fornecidos esclarecimentos sobre cada uma das etapas do estudo pelos contatos abaixo. A qualquer momento, você poderá recusar-se a continuar participando do estudo e, também, poderá retirar seu consentimento, sem que isso traga qualquer penalidade ou prejuízo a você. Além disso, caso se sinta vitimado por algum dano decorrente dessa pesquisa, poderá buscar ressarcimento de acordo com as leis vigentes no país.

Após a assinatura da DECLARAÇÃO abaixo em duas vias de igual teor, ficando uma em sua posse, fica garantido o cumprimento do que foi informado acima, a gratuidade de todos os procedimentos e o sigilo da identidade de seu filho (ou menor sobre sua responsabilidade) e das demais informações

DECLARAÇÃO DOS PAIS OU RESPONSÁVEIS

Tendo eu compreendido perfeitamente tudo o que me foi informado AUTORIZO QUE MEU FILHO(A) ou MENOR sob minha responsabilidade _____ PARTICIPE COMO VOLUNTÁRIO DESTA PESQUISA, assim como AUTORIZO A GUARDA DO MATERIAL BIOLÓGICO COLETADO em biorrepositório, SEM QUE PARA ISSO EU TENHA SIDO FORÇADO OU OBRIGADO.

Assinatura ou impressão dactiloscópica d(o,a) pai/mãe ou responsável legal.

Nome legível do pai/mãe ou responsável legal.

LOCAL: _____ DATA: _____

Assinatura do pesquisador responsável: _____

Pesquisador responsável: _____

Contatos: 16-36022441 ou 16-36330236; Celular: 16-992087498

Contato do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (16) 3602-2228 para dúvidas éticas.

ANEXO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Hanseníase no município de baixa endemia (Ribeirão Preto-SP): diagnóstico de novos casos, identificação de áreas críticas e treinamento de pessoal local para manutenção das estratégias de controle da doença

Pesquisador: MARCO ANDREY CIPRIANI FRADE

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 25368914.7.0000.5440

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP -

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 723.534

Data da Relatoria: 14/07/2014

Apresentação do Projeto:

Hanseníase é doença crônica com tempo de incubação que varia de 3 a 5 anos, sendo de alta patogenicidade podendo levar à incapacidade. O estudo visa diagnosticar casos novos de hanseníase entre contatos de casos notificados nos últimos cinco anos, e entre estudantes da rede pública de ensino fundamental e médio do município de Ribeirão Preto SP; identificar áreas críticas e realizar treinamento de pessoal local para a manutenção das estratégias de controle da doença. Além disso, busca-se diagnosticar e encaminhar para

tratamento os casos novos de hanseníase atendidos durante a semana de treinamento em serviço no município de Ribeirão Preto, realizar o treinamento em serviço (manhã e tarde) de pelo menos 25 profissionais de saúde das diferentes categorias, de agentes comunitários a profissionais com nível superior de ensino, apresentar palestras de diferentes conteúdos relacionados a hanseníase, para públicos específicos de interesse do município, com o número de presentes limitado ao espaço físico disponível no local (noite), Coletar sangue venoso de todos os pacientes, comunicantes e escolares examinados, para análise comparativa com cidades de outros estados brasileiros de diferentes taxas de endemias. Busca-se: realizar treinamento em serviço, em conjunto com os profissionais de saúde do município, com o exame de: 200 escolares da rede pública de ensino, divididos em duas

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br

escolas, e os familiares dos alunos que forem diagnosticados com hanseníase; 30 a 40 contatos de 10 casos diagnosticados no município durante o ano de 2012, 30 a 40 contatos de 10 casos diagnosticados no município durante o ano de 2010,

30 a 40 contatos de 10 casos diagnosticados no município durante o ano de 2008, Treinar pelo menos 5 equipes de 5 profissionais de saúde nesta metodologia, nos períodos da manhã e tarde, para manter a detecção de casos novos precocemente, diminuindo assim o índice de diagnóstico de hanseníase com grau 2 de incapacidade; e por fim apresentar palestras sobre hanseníase a outros profissionais de saúde do município, no período noturno, durante a semana de nossa permanência.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivos a. Geral: Diagnosticar casos novos de hanseníase entre contatos de casos notificados e entre estudantes da rede pública de ensino fundamental e médio do município de Ribeirão Preto SP; realizar treinamento de pessoal local para a manutenção das estratégias de controle da doença, além de avaliar a eficácia do teste rápido para hanseníase (Orange life) para uso em campo.

Objetivo Secundário: Específicos: i. Diagnosticar e encaminhar para tratamento os casos novos de hanseníase atendidos durante a semana de treinamento em serviço no município de Ribeirão Preto. ii. Realizar o treinamento em serviço (manhã e tarde) de pelo menos 25 profissionais de saúde das diferentes categorias, de agentes comunitários a profissionais com nível superior de ensino. iii. Apresentar palestras de diferentes conteúdos relacionados a hanseníase, para públicos específicos de interesse do município, com o número de presentes limitado ao espaço físico disponível no local (noite). iv. Coletar sangue venoso de todos os pacientes, comunicantes e escolares examinados, para análise comparativa com cidades de outros estados brasileiros de diferentes taxas de endemias.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os estudantes e participantes da pesquisa serão submetidos ao exame clínico dermatoneurológico, à venóclise simples e/ou punção de polpa digital (lanceta) para coleta das amostras de sangue para dosagens de anticorpos específicos para hanseníase (PGL1 e LID) e testagem pelo método de fluxo lateral (testes rápido para hanseníase Orange life) respectivamente.

Benefícios: Resultados esperados (Metas) a. Realizar treinamento em serviço, em conjunto com os profissionais de saúde do município, com o exame de: i. 200 escolares da rede pública de ensino, divididos em duas escolas, e os familiares dos alunos que forem diagnosticados com hanseníase. ii. 30 a 40 contatos de 10 casos diagnosticados no município durante o ano de 2012. iii. 30 a 40 contatos de 10 casos diagnosticados no município durante o ano de 2010 iv. 30 a 40 contatos de

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br

Continuação do Parecer: 723.534

10 casos diagnosticados no município durante o ano de 2008 b. Treinar pelo menos 5 equipes de 5 profissionais de saúde nesta metodologia, nos períodos da manhã e tarde, para manter a detecção de casos novos precocemente, diminuindo assim os índices epidemiológicos de controle; c. Avaliar a eficácia de detecção do anticorpo anti-PGL1 em campo pelo teste rápido (Orange life®), comparando-o com a dosagem feita pelo ELISA anti-PGL1.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Serão avaliados aproximadamente 500 indivíduos, divididos em 200 estudantes de escolas públicas de Ribeirão Preto e 300 contactantes de 40 pacientes diagnosticados nos anos 2008; 2010 e 2012. Os indivíduos serão avaliados e, se diagnosticados clinicamente, serão classificados conforme classificações de Madrid e Ridley e Jopling. Será realizada a coleta de sangue de todos indivíduos para a dosagem de anti-PGL-I e LID no plasma, além de realização do teste rápido para hanseníase (Orange life). Os pacientes que forem diagnosticados durante esta semana serão submetidos também à coleta de raspado dérmico para análise molecular do bacilo. Questionários serão realizados a fim de se conhecer e avaliar hábitos e costumes dos pacientes e de seus familiares, caracterizando principalmente aspectos sociais e ambientais. As fichas serão preenchidas no programa digital Hansys (UFOPA). Além disso, durante as visitas (escolares, contatos e pacientes), os indivíduos positivos para reação no teste rápido (APGL1+LID) terão seus contatos examinados e também testados no domicílio. Todos os casos serão georreferenciados, longitude e latitude, das residências dos indivíduos incluídos no estudo, utilizando-se um equipamento de GPS portátil (Garmin® eTrexLegend). As coordenadas serão inseridas no software Quantum GIS 1.8.0 com a finalidade de elaboração dos mapas de distribuição espacial da hanseníase, bem como análise da distribuição das características clínicas, epidemiológicas, ambientais e socioeconômicas avaliadas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentos:

Projeto de pesquisa versão 1 de 10/07/2014;

Termo de Assentimento 10/07/2014;

TCLE versão 1 de 26/02/2014;

TCLE (menores de 18 anos) versão 1 de 26/02/2014.

Recomendações:

Não há.

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DE
RIBEIRÃO PRETO DA USP -

Continuação do Parecer: 723.534

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012, o projeto de pesquisa versão 1 de 10/07/2014, assim como os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido: Termo de Assentimento 10/07/2014, TCLE versão 1 de 26/02/2014 e TCLE (menores de 18 anos) versão 1 de 26/02/2014, podem ser enquadrados na categoria APROVADO.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

RIBEIRAO PRETO, 21 de Julho de 2014

Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
(Coordenador)

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRAO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br