



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Faculdade de Ciências Médicas

Maria de Fátima Lires Paiva

**Estudo de aspectos epidemiológicos, clínicos e imunológicos da
hanseníase em município hiperendêmico**

Rio de Janeiro
2013

Maria de Fátima Lires Paiva

**Estudo de aspectos epidemiológicos, clínicos e imunológicos da hanseníase
em município hiperendêmico**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Programa de Doutorado Interinstitucional realizado com a Universidade Federal do Maranhão.

Orientadora: Prof.^a Dra. Márcia Maria Jardim Rodrigues

Coorientador: Prof. Dr Ivan Abreu Figueiredo

Rio de Janeiro

2013

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

P149 Paiva, Maria de Fátima Lires.
Estudo de aspectos epidemiológicos, clínicos e
imunológicos da hanseníase em município hiperendêmico /
Mara de Fátima Lires Paiva. – 2013.
96 f.

Orientadora: Márcia Maria Jardim Rodrigues.

Coorientador: Ivan Abreu Figueiredo.

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de
Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em
Fisiopatologia Clínica e Experimental. Programa de Doutorado
Interinstitucional realizado com a Universidade Federal do
Maranhão

1. Hanseníase – Teses. 2. Hanseníase – Controle – Teses.
3. Hanseníase – Diagnóstico – Teses. 4. Hanseníase -
Epidemiologia –Teses. I. Rodrigues, Márcia Maria Jardim. II.
Figueiredo, Ivan Abreu. III. Universidade do Estado do Rio de
Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV Título.

CDU 616-002.73

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou
parcial desta tese desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Maria de Fátima Lires Paiva

**Estudo de aspectos epidemiológicos, clínicos e imunológicos da hanseníase
em município hiperendêmico**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Programa de Doutorado Interinstitucional realizado com a Universidade Federal do Maranhão.

Aprovada em: 27 de maio 2013.

Coorientador: Prof. Dr Ivan Abreu Figueiredo
Universidade Federal do Maranhão

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Márcia Maria Jardim Rodrigues (Orientadora)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof. Dr. Alex Christian Manhães
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Ximena Illramendi Rojas
Fundação Oswaldo Cruz

Prof.^a Dra. Nadia Cristina Duppre
Fundação Oswaldo Cruz

Prof.^a Dra. Maria do Rosário da Silva Ramos Costa
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Egberto Gaspar de Moura
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Rio de Janeiro

2013

Ao meu pai Antônio Lires (em memória), minha mãe Corina, a meus filhos, Dácio, Darlene, Márcio Darlan e a meu netinho que chegará em breve.

AGRADECIMENTOS

À Deus, razão do meu existir, por ter abençoado minha vida e proporcionado este momento.

A minha mãe, por suas orações, por me incentivar e acreditar em mim.

Aos meus filhos, obrigada pelas lições de esperança, pelo amor infinito e confiança em minha capacidade. Obrigada pelas contínuas palavras de estímulo que me ajudaram a trilhar mais esse percurso.

Aos meus familiares pelo incentivo e entendimento por minha ausência em momentos de encontros familiares, que sabemos o quanto é prazeroso para todos nós.

Ao Prof. Dr. Natalino Salgado, Reitor da Universidade Federal do Maranhão que com o seu empenho possibilitou galgarmos mais este espaço. Que o protetor do universo ilumine-o sempre.

A Prof.^a Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento, pela iniciativa e esforço em organizar e realizar o DINTER,

A Prof.^a Dra. Maria do Rosário da Silva Ramos Costa, pelo empenho e paciência na condução e coordenação do DINTER, o nosso muito obrigada por tudo.

A equipe de Coordenação do DINTER/UERJ, pela competência e dedicação na condução do mesmo, meu reconhecimento e agradecimento.

Ao Prof. Dr. Ivan Abreu Figueiredo, pelo exemplo de competência comprometimento dedicação e carinho com que trata as questões da hanseníase, pela simplicidade e sabedoria.

A Prof.^a Dra. Marcia Maria Jardim Rodrigues por ter me aceito como orientanda, obrigada por tudo.

A Prof.^a Msc. Nila da Conceição, chefe do Departamento, pelo incentivo e compreensão durante a elaboração deste trabalho.

A Prof.^a Dra. Rosangela Fernandes Lucena Batista pelo conhecimento atenção e presteza de sempre.

A Prof.^a Dra. Isabela Maria Bernardes Goulart-CREDESH-UFU-MG, pelo projeto e vínculo com o Maranhão, sem o qual este trabalho não teria sido possível

A Prof.^a Dra. Silma Regina Ferreira Pereira, pelo incentivo, exemplo e competência com que conduz o Laboratório de Biologia e Genética Molecular-UFMA, como também a todos que compõem a família LABGEM eterna gratidão.

A Prof.^a Dra. Dorlene Aquino, pelo apoio e grandiosa colaboração, no desenvolvimento das atividades deste projeto.

Aos bolsistas e voluntários dos cursos de Enfermagem, Medicina, Biologia, e Geografia da UFMA, pela valiosa colaboração.

A amiga Jack, por tudo que vivemos durante este trabalho, mas tudo vale a pena quando o esforço não é pequeno, obrigada por tudo.

Ao Laboratório de Imunofisiologia, na pessoa da Prof^a Dra Flávia Nascimento e Prof. Msc. Graciomar Costa pela contribuição na execução deste projeto.

Aos professores do Departamento de Saúde Pública, Prof. Msc. Leonardo Figueiredo, Prof.^a Raimunda Mendonça, Prof^a Wanessa Fonseca, e Prof^a Msc. Regina Abreu, por compartilharem comigo a Atenção Básica, a fim de que pudesse concluir este estudo. Obrigada por tudo.

Ao Prof. Leonardo Cunha Figueiredo e David Barbosa pela atenciosa acolhida no Rio de Janeiro.

A Prof.^a Dra. Enedina Soares que com esse enorme coração também nos acolheu no Rio.

A Dra. Ximena Illaramendi agradeço a você a oportunidade de compartilhar ensinamentos.

A Dra. Nádia Cristina Duppre por compartilhar literatura e ensinamentos valiosos.

As colegas do doutorado pela convivência harmoniosa, Elza Lima, pelo apoio e companheirismo, Teresa Viveiros pela compreensão e incentivo, e Denicy pelo apoio.

A Maria Ivone, obrigada pela normalização e acolhida na reta final desta jornada.

Aos profissionais do Centro de Dermatologia do HUUPD onde montamos nosso QG, para atendermos nossos colaboradores, obrigada pela acolhida e carinho com que nos receberam nessa família.

Aos atores participantes desta pesquisa pela valiosa colaboração que permitiu a realização deste trabalho.

A Prof.^a Dra. Maria Teresa Seabra Soares de Brito e Alves pela liberação de outras atividades para dedicação exclusiva a este estudo.

As Secretarias de Saúde do Estado do Maranhão, na pessoa do Dr. José Márcio Soares Leite e do Município de São Luís na pessoa do Prof. Dr. Gutemberg Araújo e da Prof^a Dra. Ieda Gomes Vanderlei pelo apoio e colaboração, meu muito obrigada.

Ao CNPq e Capes pelo financiamento deste projeto.

Há muitos a quem agradecer... A todos aqueles que, embora não nomeados, brindaram-me com seus inestimáveis apoios em distintos momentos, meu reconhecimento e carinhoso muito obrigada.

Tudo posso naquele que me fortalece.

Filipenses 4:13

Temos drogas para as pessoas que sofrem de doenças como a lepra, mas elas não tratam do problema principal: a doença de se tornarem indesejadas.

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

PAIVA, Maria de Fátima Lires. **Estudo de aspectos epidemiológicos, clínicos e imunológicos da hanseníase em município hiperendêmico**. 2013. 96 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2013.

A epidemiologia da hanseníase tem demonstrado a utilização de ferramentas clínicas, moleculares e imunológicas, para o mapeamento dos principais focos de ocorrência da doença e de áreas de alto risco de adoecimento. Programas de controle da hanseníase, doença de longo período de incubação, em que os contatos são os principais grupos de risco, devem estabelecer todos os procedimentos disponíveis para o controle desse agravo. Objetiva-se estudar aspectos epidemiológicos clínicos e imunológicos da hanseníase em município hiperendêmico do Maranhão. Estudo de epidemiológico descritivo, realizado com 599 contatos, entre outubro de 2009 a outubro de 2011, no Serviço de Dermatologia no ambulatório do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão unidade Presidente Dutra São Luís - MA. Foi observado que a maioria dos contatos foi do gênero feminino com 57,17%, a faixa etária predominante acima de 15 anos, ou seja, (64,59%) com maior frequência na faixa de 20 a 59 anos, idade adulta e produtiva e o tipo de convívio predominante é o intradomiciliar com 74,95%, a forma clínica foi HT (30,00%), a classificação operacional mais frequente foi a MB com 61,90% do gênero feminino; a maioria apresentou somente uma cicatriz vacinal pela BCG, destacou-se o gênero masculino com 63,00%. O teste Elisa apresentou percentual de 63,50% e o ML-Flow 64,00%. Considerando o resultado dos testes Elisa e ML-FLOW sugere-se a utilização das técnicas imunológicas como ferramentas necessárias para o diagnóstico precoce, controle e vigilância dos contatos como forma de interromper a cadeia de transmissão da hanseníase na cidade pesquisada.

Palavras-chave: Hanseníase. Vigilância epidemiologia. Imunologia. Hiperendemia.

ABSTRACT

Leprosy epidemiology has demonstrated the usefulness of clinical, molecular and immunological tools for geographical identification of the main disease occurrence foci and also of high risk disease acquiring areas. Leprosy control programs must consider its long incubation period, during which nearby contacts are the main disease risk group, and should make use of all available procedures for disease control. This paper aims to study clinical, epidemiological and immunological aspects of leprosy in a hyper endemic county of Maranhão state. It's a descriptive epidemiological study made with 599 leprosy contacts from October 2009 to October 2011 in the clinic of the Dermatology service at the Presidente Dutra unit of Maranhão Federal University Hospital. Most contacts observed were female (57,17%), more than 15 years old (64,59%), mostly between ages 20-59, an adult and productive life span. Household contact was the most frequent (74,95%) as was tuberculoid leprosy (30,00%). MB operational classification was most frequent (61,90% of females), most presenting one BCG vaccine scar, with males amounting to 63,00%. ELISA test was positive in 63,5% and ML-flow in 64,00%. These two test results suggests the use of immunological techniques as necessary tools for precocious diagnosis, surveillance and control of leprosy contacts as a means of interrupting leprosy transmission chain in the analyzed county.

Keywords: Leprosy. Epidemiological surveillance. Immunology. Hyperendemic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Agregação de casos novos de hanseníase, pelo coeficiente de detecção no Brasil, 2005 a 2007.....	29
Figura 2 -	Coeficiente geral de detecção de hanseníase por municípios. Maranhão-2010.....	31
Figura 3 -	Esquema representativo dos componentes básicos da parede celular do <i>Mycobacterium leprae</i>	33
Figura 4 -	Gel de agarose mostrando os resultados da amplificação de DNA de <i>M. leprae</i> em amostras de mucosa bucal e nasal.....	48
Figura 5 -	Teste rápido para detectar hanseníase.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Características dos contatos de pacientes com hanseníase. Setor de Dermatologia do HUUPD, São Luís-MA, 2013.....	54
Tabela 2 -	Distribuição percentual de contatos de pacientes com hanseníase quanto à idade relacionado com a forma clínica do caso índice HUUPD, São Luís-MA, 2013.....	55
Tabela 3 -	Distribuição percentual de contatos de pacientes com hanseníase quanto ao gênero relacionado com a classificação operacional do caso índice. São Luís-MA, 2013.....	55
Tabela 4 -	Distribuição percentual de contatos de pacientes de hanseníase quanto ao gênero relacionado à cicatriz vacinal de BCG HUUPD, São Luís-MA, 2013.....	56
Tabela 5 -	Distribuição percentual de contatos de pacientes com hanseníase quanto a idade relacionada com as cicatrizes de BCG. São Luís-MA, 2013	56
Tabela 6 -	Distribuição percentual de contatos de pacientes com hanseníase quanto ao Elisa relacionado com a cicatriz de BCG HUUPD, São Luís-MA, 2013.....	57
Tabela 7 -	Distribuição percentual de contatos de pacientes com hanseníase quanto ao teste de Mitsuda relacionado com a cicatriz de BCG HUUPD, São Luís-MA, 2013.....	57
Tabela 8 -	Distribuição percentual de contatos de pacientes com hanseníase quanto ao ML-Flow relacionado com a cicatriz de BCG HUUPD, São Luís-MA, 2013.....	57
Tabela 9 -	Distribuição percentual de contatos de pacientes com hanseníase quanto ao gênero relacionado com os teste/exames HUUPD, Luís-MA, 2013.....	59
Tabela 10 -	Distribuição percentual de contatos de pacientes com hanseníase quanto à idade relacionada com os testes/exames HUUPD, Luís-MA, 2013.....	60

Tabela 11 -	Distribuição percentual de contatos de pacientes com hanseníase quanto a exames e forma clínica do caso índice HUUPD, São Luís-MA, 2013.....	61
Tabela 12 -	Distribuição percentual de contatos de pacientes com hanseníase quanto a exames e classificação operacional do caso índice HUUPD, São Luís-MA, 2013.....	62
Tabela 13 -	Níveis descritivos (valores – p) para os testes nas tabelas de contingência 2 a 10.....	63
Tabela 14 -	Níveis descritivos para as variáveis nas tabelas 11 e 12.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1U	Taq polimerase
a.C.	antes de Cristo
ATP	Adenosina trifosfato
BCG	Bacillus Calmette-Guérin (vacina contra a tuberculose)
CREDESH/UFU-MG	Centro de Referência Nacional em Hanseníase/Dermatologia Sanitária-Minas Gerais
CRs	Sistema complemento
CTLR	Receptores de lectina do tipo C
DD	Dimorfa-Dimorfa
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DR2-DR3	Haplótipos
DT	Dimorfa-Tuberculóide
DV	Dimorfa-Vichowiana
EDTA	Ácido Tetra-acético etilenodiamino
ELISA	Ensaio imunoenzimático
ErK1	Quinase 1 regulada por sinal extracelular
ErK2	Quinase 2 regulada por sinal extracelular
FCY	Fludarabina cyclophosphamida
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HI	Hanseníase Indeterminada
HLA	Antígenos leucocitários humanos
HT	Hanseníase Tuberculóide
HUUPD	Hospital Universitário Unidade Presidente Dutra
IB	Índice baciloscópico
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDH	Índices de Desenvolvimento Humano
IFN- γ	Interferon gama
IgM	Imunoglobulina M
IL-13	Interleucina-13
IL-2	Interleucina-2
IL-4	Interleucina-4

IL5	Interleucina-5
iNOS	Óxido nítrico sintetase
IP3	Fosfatidil-inositol trifosfato
LBP21	Laminin binding protein
MB	Multibacilar
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
ML-FLOW	Teste de fluxo lateral
MS	Ministério da Saúde
NRAMP-1	Proteína Macrofágica 1 Associada à Resistência Natural
NRAMP1	Região do genoma da bactéria
OMS	Organização Mundial de Saúde
PACRG-	Gene co-regulatório de Parkin
PARK2	Gene 2 co-regulatório de Parkin
PB	Paucibacilar
PBS-BSA	Tampão fosfato salino com albumina de soro bovino
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PDIM	1-ftioceroldimicocerosato
PGL-1	Glicolípido fenólico 1,
PIM	Fosfatidil inositol manosídeo
PQT	Poliquimioterapia
RLEP3	Sequência de produto de PCR
RNA	Ácido ribonucleico
SES-MA	Secretaria de Estado da Saúde do Maranhão
SNPs	Polimorfismos de nucleotídeo único
SUS	Serviço Único de Saúde
SVS	Secretaria de Vigilância Sanitária
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Th1	Células T helper 1
TBE	Solução com tribase, ácido bórico, EDTA
TK	Tirosinas kinases
TLN	Tampão de Lise nuclear
TLRs,	Toll-like receptors –receptores do tipo toll
TMM	Monomicolados de trealosa
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa

TT

Tuberculóide-Tuberculóide

UFMA

Universidade Federal do Maranhão

VV

Virchowiana-Virchowiana

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	18
1	OBJETIVOS	26
1.1	Objetivo Geral	26
1.2	Objetivos Específicos	26
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	27
2.1	Históricos da hanseníase	27
2.2	Epidemiologia	29
2.3	Características do parasita	33
2.4	Interações do parasita com as células do hospedeiro	35
2.5	Aspectos imunológicos da hanseníase	37
2.6	Influência da genética do hospedeiro na patogênese da hanseníase	39
3	MATERIAL E MÉTODO	41
3.1	Amostra do estudo	41
3.2	Coleta e triagem das amostras	43
3.2.1	<u>Procedimentos</u>	43
3.2.1.1	<u>Exame dermatoneurológico</u>	44
3.2.1.2	<u>Teste de Mitsuda</u>	45
3.2.1.3	<u>Extração do DNA total da mucosa nasal e bucal</u>	45
3.2.1.4	<u>Amplificação do DNA por PCR convencional</u>	46
3.2.1.5	<u>Eletroforese e foto documentação</u>	47
3.2.1.6	<u>Teste do fluxo lateral (ML-FLOW)</u>	48
3.2.1.7	<u>Swab bucal e swab nasal</u>	49
3.2.1.8	<u>Sangue Periférico</u>	49
3.2.1.10	<u>ELISA para Detecção de Anticorpos Anti-PGL-1</u>	50
3.3	Análise dos dados	51
4	RESULTADOS	52

5	DISCUSSÃO.....	62
6	CONCLUSÃO.....	66
	REFERÊNCIAS.....	67
	APÊNDICES A – Termo de consentimento livre e esclarecimento.....	89
	APÊNDICES B – Panfleto da Campanha.....	92
	APÊNDICES C – Chamada da Campanha.....	93
	ANEXOS A – Ficha do contato.....	94
	ANEXOS B - Protocolo de abordagem e seguimento.....	95

INTRODUÇÃO

Hanseníase doença crônica, infectocontagiosa de evolução lenta, causada pelo *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) ou bacilo de Hansen, parasita intracelular obrigatório e que se manifesta por sinais e sintomas dermatoneurológicos, como lesões de pele e de nervos periféricos, principalmente de olhos, mãos e pés (BRASIL, 2002; BRASIL, 2009).

A bactéria responsável pela hanseníase é um bacilo aeróbio, gram-positivo, álcool-ácido resistente, que possui crescimento lento (uma divisão a cada 12-21 dias), sendo esta a característica responsável pelo longo período de incubação da doença, que varia de 6 meses a 20 anos (BRITTON; LOCKWOOD, 2004; HETT; RUBIN, 2008).

A Transmissão ocorre principalmente pelas vias aéreas superiores, mas parece estar intimamente relacionada com o contato direto das pessoas sadias (contatos) com doentes sem tratamento, com a resposta imunológica de cada indivíduo e com diversos fatores sociais e ambientais (GOULART et al., 2008; MODLIN, 2010).

Sabe-se que o *M. leprae* possui preferência pelas células de Schwann, macrófagos e células do endotélio da pele. O tropismo para esses tipos celulares desencadeia as principais manifestações clínicas, como lesões na pele e neuropatias, danos nas células do sistema nervoso periférico, acarretando em diminuição da sensibilidade periférica e desordens motoras e funcionais (CHACHA et al., 2009; MATSUOKA, 2010).

No entanto, os mecanismos pelos quais os bacilos migram das regiões de exposição para estes tipos celulares, ainda não foram totalmente elucidados.

O mecanismo pelo qual o *M. leprae* é capaz de alcançar o meio intracelular em fagócitos, parece ser mediado pela interação dos lipídeos presentes na membrana celular do patógeno com receptores (como os de fibronectina, os receptores Fcy e os de manose) na membrana das células do hospedeiro (SPIERINGS et al., 2000; ASTARIE-DECQUEKER et al., 2010).

Entretanto, o tropismo pelas células de Schwann dá-se pela afinidade do bacilo à cadeia $\alpha 2$ da laminina-2, uma glicoproteína constituinte da lâmina basal nas mesmas (RAMBUKKANA et al., 1993; RAMBUKKANA et al., 1997). A interação deste complexo proteico com receptores ligantes de laminina – presentes na

membrana da bactéria – promoveria a introdução do patógeno nas células-alvo (SHIMOJI et al., 1999; PESSOLANI et al., 1999).

Em geral os patógenos intracelulares desenvolveram estratégias para modular a resposta imune do hospedeiro de forma a criar um nicho adequado para a sua sobrevivência e perpetuação (ALTER et al., 2011). Após a introdução de *M. leprae* nas células alvo, o organismo do hospedeiro irá reconhecer e desencadear respostas imunológicas específicas, definindo assim o curso da infecção (MENDONÇA et al., 2008).

Segundo as evidências, durante, a Idade Média, a hanseníase manteve alta prevalência na Europa e Oriente Médio. No século XIII, pode-se estimar a magnitude da hanseníase na Europa pela evidência de cerca de 19.000 leprosários. Assim também, pode-se acompanhar o declínio da endemia europeia, a partir do século XVII, a partir da melhoria das condições de vida, redução da doença e declínio dos leprosários, com a desativação gradual destes asilos. Por volta de 1870, a hanseníase já havia praticamente desaparecido em quase todos os países da Europa, na Noruega, onde podia ser considerada endêmica, sua incidência já se achava em declínio. Acredita-se que esse declínio teve como causa principal a melhoria das condições socioeconômicas experimentadas pelos povos europeus ao longo das Idades Moderna e Contemporânea.

A hanseníase continua sendo um problema de saúde pública em alguns países, especialmente aqueles situados nos trópicos (GILLIS; KRAHENBUHL, 1998; LINDOSO; LINDOSO, 2009). No Brasil a hanseníase é endêmica, sendo o segundo país do mundo em número de casos (ALVES et al., 2010) e continua apresentando taxa de prevalência em níveis superiores ao recomendado pela Organização Mundial de Saúde (menos de um caso a cada 10 mil habitantes). No ano de 2009, nosso país registrou sozinho, mais de 90% dos casos notificados no continente americano (WHO, 2010).

No ano de 2006, o Ministério da Saúde lançou o Plano Nacional de Eliminação da Hanseníase em nível municipal, cuja meta era diminuir o índice de prevalência para menos de um caso por cada 10.000 habitantes, nos estados e municípios de área endêmica. Apesar da notável diminuição nos coeficientes de detecção ao longo dos anos, a detecção de novos casos continua alta e a patologia é considerada hiperendêmica nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste do nosso país (IMBIRIBA et al., 2008; BRASIL, 2009).

A detecção dos espaços de maior risco da doença permite a orientação das ações de controle para áreas onde a transmissão é maior, trabalhando áreas geográficas contínuas com maior efetividade epidemiológica. Os indicadores epidemiológicos possibilitarão demonstrar a relevância dos limites da agregação dos casos de hanseníase no Brasil. Essa abordagem evita que sejam ignoradas áreas “silenciosas”, devido ao tamanho de sua população ou baixa detecção e não devido ao maior risco. Espera-se que nas doenças transmissíveis a distribuição de casos não seja ao acaso na população, mas que os casos estejam agregados no espaço como consequência da transmissão. Os 10 maiores clusters incluíram 1024 municípios onde vivem 15,45 da população brasileira. Entretanto, foram responsáveis por 51% do total de casos novos de hanseníase notificados no período analisado e 60% dos casos novos notificados em menores de 15 anos (BRASIL, 2008). A taxa média de detecção de hanseníase nas áreas desses clusters foi de 97 doentes em cada 100.000 habitantes ou de 9,7 doentes por 10.000 habitantes.

Alguns fatores concorrem para a imprecisão na delimitação de um cluster, como problemas da qualidade dos dados e conhecimento dos casos existentes na área. Assim, informações gerenciais locais podem trazer novos dados e possibilitar a validade dessas delimitações, relevância e limites dos achados apresentados (Brasil, 2008).

O Estado do Maranhão faz parte do Cluster nº 1, área com maior risco de detecção da doença no país (BRASIL, 2009). Além disso, é o quarto estado com maior coeficiente de detecção de novos casos de hanseníase no país (6,97 em cada 10.000 habitantes) e o primeiro da região nordeste em número de casos notificados em 2010. Quase 80% dos municípios do estado foram considerados hiperendêmicos pelo Ministério da Saúde a partir da taxa de detecção em menores de 15 anos.

A ausência de manifestações clínicas nos indivíduos infectados assintomáticos é um problema que circunda a epidemiologia da hanseníase, uma vez que o diagnóstico destes indivíduos é fundamental para o controle da doença (FINE, 2007). Neste quadro, as técnicas de biologia molecular, mais eficazes para identificação do bacilo, vem sendo utilizadas como marcadores para pacientes subclínicos, abrindo novas perspectivas para a quebra da cadeia da transmissão (CHO; BRENNAN, 1999; PRASAD; KAVIARASAN, 2010).

Após sequenciamento total do genoma de *M. leprae* (COLE et al, 2001), a técnica de PCR (Reação em cadeia da Polimerase) tornou-se uma aliada para identificação do bacilo, sendo útil para a amplificação de fragmentos específicos do DNA da bactéria. Além disso, essa ferramenta é capaz de detectar *M. leprae* em amostras dos mais diversos tecidos dos próprios pacientes ou contatos (GILLIS; WILLIAMS, 1991). A praticidade e rapidez desta técnica permitiram a sua implantação como ferramenta de diagnóstico, principalmente nas infecções subclínicas (KATOCH, 1999).

As ferramentas imunológicas são igualmente importantes tanto para o diagnóstico da infecção subclínica como da forma multibacilar da doença. A técnica ELISA (Ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzima) é um teste de sorologia rápida, que permite a mensuração dos anticorpos produzidos contra o glicolipídio fenólico 1 (PGL-1), uma glicoproteína de membrana específica do *M. leprae* que constitui cerca de 2% da massa total bacteriana (MARTINS et al, 2010). O teste de ELISA, pode ser empregado nas regiões endêmicas do nosso país, auxiliando na identificação de indivíduos com maior risco para o desenvolvimento da hanseníase.

Polimorfismos na região dos genes do antígeno leucocitário humano (HLA) e do fator de necrose tumoral (TNF α) (VAN EDEN et al., 1985; SHAW et al., 2001), nas regiões cromossômicas 6q25, 10p13 e 17q22 (MILLER et al., 2004; SIDDIQUI et al., 2001), nos genes PARK2/PACRG (MIRA et al., 2004), foram descritos como fatores de risco para hanseníase. A variabilidade genética permite o entendimento das possíveis respostas do hospedeiro, moduladas por proteínas codificadas pelos genes estudados (SCHURR et al., 2006).

Diversos estudos relacionam diferenças na resposta imunológica aos antígenos de *M. leprae* à predisposição genética. Complexos genômicos já foram identificados como fatores de suscetibilidade para infecção e manifestação clínica da hanseníase (GULIA et al., 2010)

O teste fluxo lateral (ML-FLOW) é o mais fácil, mais rápido, menos invasivo e mais barato teste de sorodiagnóstico (KAI et al., 2008). Sua sensibilidade demonstrou ser parecida com a do ELISA e por isso é amplamente utilizado para facilitar a classificação de pacientes nas formas clínicas (BÜHRER-SÉKULA et al., 2003). É uma alternativa à sorologia por ELISA para auxiliar na classificação de pacientes em PB e MB e auxiliar na decisão terapêutica (CONTIN et al., 2011).

A classificação das formas da hanseníase data de 500 a.C., quando se reconhecia duas formas fundamentais; uma onde predominavam os fenômenos neurológicos e outra em que ocorriam deformidades nasais, queda de sobrancelhas e ulcerações (OPROMOLLA, 2000).

Essa concepção permaneceu até 1848, quando Danielsen e Boeck classificaram a hanseníase em uma forma nodular e outra anestésica. Houveram várias outras classificações até que em 1953, o VI Congresso Internacional de Leprologia, realizado em Madri, estabeleceu a classificação da hanseníase segundo sua tendência de evoluir em direção a um dos polos, encontrando-se duas formas polares e dois grupos: formas tuberculóide e virchowiano e grupos indeterminado e dimorfo (CONGRESSO INTERNACIONAL DE LEPROLOGIA, 1953)

O MS e a OMS adotam, para fins de tratamento, um método simplificado para a classificação da hanseníase baseado na contagem do número de lesões cutâneas, a Classificação Operacional, pela qual pacientes com até cinco lesões de pele são classificados como PB e aqueles com mais de cinco lesões cutâneas como MB.

Ficando estabelecido que:

Casos PB seriam pacientes que apresentassem até cinco lesões de pele, sem acometimento de nervos periféricos e/ou acometimento de apenas um nervo. A baciloscopia é sempre negativa.

Casos MB seriam pacientes que apresentassem mais de cinco lesões de pele e/ou acometimento de mais de um nervo periférico. A baciloscopia pode ser negativa ou positiva.

A hanseníase indeterminada (I) é considerada a primeira manifestação clínica da doença, podendo curar ou evoluir para outra forma clínica, após período variável de poucos meses até anos.

Baseando-se no espectro imunológico dos indivíduos, Ridley e Jopling (1966) desenvolveram um sistema de classificação mundial para os pacientes de hanseníase, agrupando-os em: lepromatoso-lepromatoso (LL), borderline-lepromatoso (BL), borderline-borderline (BB), borderline-tuberculóide (BT), tuberculóide-Tuberculóide (TT) ou indeterminada (I).

A classificação proposta por Ridley e Jopling, é mais utilizada em pesquisas e leva em consideração a imunidade dentro de um espectro de resistência do hospedeiro e a histopatologia, sendo, portanto, difícil a sua utilização, no campo, pelos serviços de saúde (LYON, 2013).

Os pacientes recebem o esquema terapêutico por poliquimioterápico (PQT), no qual são administrados rifampicina, dapsona, clofazimina em pacientes MB até no máximo dois anos e durante seis meses para os pacientes PB (DAUMERIE, 2000; FORNO et al., 2010). A ação das drogas é principalmente por inibição da síntese de proteínas (GELBER et al., 1992). Assim, como da transcrição e replicação, por inativação das enzimas DNA-girase (TAKIFF et al., 1994) e ligação da RNA polimerase ao DNA genômico (JI et al., 1996).

A terapia multidrogas é uma ferramenta prática e poderosa para o tratamento dos doentes, minimizando assim a transmissão do bacilo. Graças ao tratamento, observou-se uma queda no número de casos em escala mundial, porém os novos casos continuam surgindo a cada ano. Por isso, em áreas endêmicas (onde há alto foco de transmissão) é necessária a inclusão dos indivíduos com infecção subclínica, que também transmitem o bacilo, no esquema terapêutico de quimioprofilaxia, (MARTELLI et al., 2002).

A complexidade dos aspectos imunológicos, celulares e genéticos da infecção por *M. leprae* ainda não permitiram a consolidação de uma ferramenta de diagnóstico padrão, a qual seria um marco para eliminação da doença (SCOLLARD et al., 2006). O diagnóstico da hanseníase é feito pelo exame clínico dermatoneurológico e baciloscopia (considerados padrão ouro), utilizados para localização de possíveis lesões com alterações na sensibilidade ou espessamento de nervos (BAPTISTA et al., 2006). Por isso é necessária a utilização de técnicas mais específicas que possibilitem a realização do diagnóstico nas formas precoces da doença bem como o monitoramento dos contatos que são o maior grupo de risco de adoecimento. (GOULART; GOULART, 2008).

As Diretrizes para Vigilância, Atenção e Controle da Hanseníase (ACH), que visam o fortalecimento das ações de vigilância epidemiológica da hanseníase, bem como à organização da rede de atenção integral e promoção da saúde com base em diagnóstico precoce, tratamento oportuno de todos os casos diagnosticados, prevenção e tratamento de incapacidades e vigilância dos contatos domiciliares, que é realizada através de um conjunto de atividades com o objetivo de evitar assim a ocorrência de novos casos conforme a Portaria SVS/DVE/MS nº 3.125, de 07 de outubro de 2010, do MS, que normaliza as ações de controle da hanseníase em todo território nacional, (BRASIL, 2010).

No país, as ações de diagnóstico e tratamento da hanseníase foram historicamente centralizadas em unidades especializadas. Já praticadas desde os anos 1970 em alguns estados do Sudeste e Sul, a discussão nacional sobre a descentralização das ACH ganhou corpo a partir de 1985, no contexto da reestruturação do sistema de saúde (RAPOSO, 2011).

Com a Constituição Federal de 1988 foi criado o Sistema Único de Saúde (SUS) e as Leis 8080 e 8142 de 1990, que instrumentalizaram a descentralização das ações de saúde (BRASIL, 1990a; BRASIL, 1990b).

Mesmo após inúmeras campanhas de erradicação de abrangência mundial, a lepra continua longe de ser eliminada, caracterizando-se doença negligenciada (RANQUE et al., 2007; LINDOSO; LINDOSO, 2009). Embora tenha manifestação clínica bem conhecida, ainda permanece endêmica em muitas áreas do mundo como na Índia e no Brasil (WHO, 2009). Isso se deve, em parte, pelo não conhecimento pleno de todo ciclo de transmissão da doença. Para interferir nesta cadeia de transmissão bastante complexa, é necessário conhecer os principais fatores associados ao adoecimento (socioeconômicos, culturais, ambientais) e seu poder de manutenção do ciclo da doença.

Em 2011, o Brasil registrou um coeficiente de detecção alto, de 15,88/100 mil habitantes, e um coeficiente de prevalência médio, 1,24/10 mil habitantes, segundo parâmetros do Ministério da Saúde (BRASIL, 2012).

Do total de 3.776 novos casos da doença notificadas no Estado do Maranhão, no ano de 2010, mais de 10% eram crianças com até 14 anos de idade (BRASIL, 2010). Estes parâmetros refletem a incapacidade de controle da doença e a continuidade na cadeia de transmissão (BARBIERI; MARQUES, 2009).

Constata-se também, a relação pobreza e incidência de hanseníase, onde municípios com mais de 20 casos médios apresentam elevada exclusão social ($IE < 0,5$) (POCHMAN; AMORIN, 2003).

Estima-se que contatos domiciliares de pacientes MB têm um risco relativo 5 a 10 vezes maior para a ocorrência da doença que na população em geral (DOULL et al, 1942; FINE et al, 1997; VAN BEERS et al., 1999). Existem evidências de que a transmissão da doença na fase de infecção subclínica pode ocorrer, mesmo em países endêmicos, por conta de que a história de contato próximo com pacientes de hanseníase não foi estabelecida (FINE et al., 1997).

Estudos mostram que o trabalho com contatos é de importante relevância para solucionar esse problema, pois mostram que a investigação dos comunicantes possibilita uma estimativa relativamente mais precisa da incidência, permitindo o diagnóstico precoce e, conseqüentemente, delimitando com exatidão os casos novos (MATOS, 1998; OLIVEIRA et al., 2007).

Considerando-se que a vacina contra hanseníase *M. leprae*, é ainda um desafio e de futuro imprevisível, nos propomos realizar o presente estudo, na perspectiva de poder contribuir para detecção precoce, identificação e acompanhamento para a redução dos casos de hanseníase, no município de São Luís - Estado do Maranhão.

Este trabalho justifica sua construção sob a ótica de que, sendo a hanseníase um grande problema de saúde pública, este estudo, emprega técnicas moleculares e imunológicas de diagnóstico da hanseníase, trazendo novas perspectivas para o monitoramento da doença, sobretudo respondendo a um questionamento O que podemos fazer para diagnosticar hanseníase antes que as pessoas adoeçam? Essas ferramentas contribuirão para o entendimento da epidemiologia na área da hanseníase, assim como para o tratamento dos casos novos e avaliação da infecção por *M. leprae* em contatos no município de São Luís, hiperendêmico para hanseníase? O monitoramento dos quadros de infecção subclínicas pelas técnicas de diagnóstico precoce auxiliará na descoberta de novos casos e redução da transmissão da doença?

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo Geral

Estudar aspectos epidemiológicos clínicos e imunológicos da hanseníase em município hiperendêmico do Maranhão.

1.2 Objetivos Específicos

- Identificar os contatos quanto ao gênero, faixa etária e tipo de convívio com o caso índice;
- Relacionar técnicas moleculares para detecção de infecção subclínica em contatos de pacientes com hanseníase;
- Relacionar a detecção do DNA bacteriano em amostras de mucosa oral e nasal dos contatos com as formas clínicas e classificação operacional dos casos índices;
- Relacionar a presença de anticorpos IgM anti-PGL1 pelas técnicas de Elisa e ML-FLOW com as formas clínicas e classificação operacional dos casos índices/pacientes.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Históricos da hanseníase

A hanseníase parece ser a doença mais antiga do mundo. Registros arqueológicos datam a existência da doença no período calcolítico (idade do cobre), cerca de 2000 a.C. (ROBBINS et al., 2009). Referências textuais relatam a doença no antigo Egito (HULSE, 1972), na China (SKINSNES, 1980) e na civilização grega, romana e povos célticos (MARIOTTI et al., 2005). Esqueletos com características peculiares, as chamadas fáceis leoninas (erosão da maxila e do septo nasal) também foram encontrados em escavações no oeste asiático (BLAU; YAGODIN, 2005), e em leprosários da idade média na Dinamarca, Hungria, Itália e República Checa (MANCHESTER, 1984).

Acredita-se que a hanseníase tenha surgido no sudeste do continente asiático (região da atual Índia) e que tenha se espalhado para Europa com o retorno das tropas de Alexandre o Grande após a conquista da Pérsia. Na Europa, a doença tornou-se um grave problema de saúde pública durante toda a idade média (MONOT et al., 2005).

Nesse período, a hanseníase era mutiladora, os pacientes acometidos apresentavam muitas deformidades, sustentando a hipótese de que a forma lepromatosa da doença era predominante (TAYLOR et al., 2000; LIKOVSKY et al., 2006). Os pacientes eram forçados à segregação, viviam em aldeias separadas ou em leprosários, pois se acreditava que doença era altamente contagiosa.

O declínio no aparecimento de novos casos da doença na Europa, observando a partir do século XVI, pode ser explicado pela variação na patogenicidade de organismos causadores de doenças infectocontagiosas ou pela alta mortalidade dos indivíduos coinfectados por *M. tuberculosis* e *M. leprae*, o que era bastante comum na época (DONOGHUE et al., 2005). Além disso, a segregação de grande parte dos portadores da doença e sua exclusão do convívio doméstico, assim como a redução da população das cidades e o aumento nos padrões socioeconômicos também justificam a redução dos índices de lepra no continente europeu, assim como o não restabelecimento da doença (BROWNE, 1974).

No continente americano, a doença foi introduzida pelos colonizadores, pois não há vestígios de hanseníase nos povos indígenas nativos. O tráfico de escravos parece ser outro foco de expansão da hanseníase nas colônias, pois havia focos da endemia hanseniana na Ásia e África (EIDT, 2004). Os primeiros casos notificados da doença no Brasil foram em 1600, na então capital da colônia: Rio de Janeiro (YAMANOUCHI et al., 1993). A expansão da hanseníase parece ter acompanhado a marcha de colonização, sendo introduzidos focos da doença em todo o país (MAURANO, 1944).

Segundo Browne (1974), trabalhos publicados por Danielssen e Boeck (1848) foram os primeiros a contradizer os dogmas da doença na época, afirmando que hanseníase não era transmitida por proximidade com o doente e que tampouco era hereditária. Anos mais tarde, o físico G. A. Hansen (1873) anunciou resultados de sua investigação, onde atribuía a um microorganismo em forma de bastão, observado em lesões dos pacientes acometidos, a causa da doença.

Por muito tempo, a hanseníase permaneceu incurável, mesmo com o avanço no descobrimento do agente patológico. Somente na década de 40 a dapsona e seus derivados foram utilizados para o tratamento da doença (FAGET et al., 1943).

Atualmente, os países do “Novo Mundo” são os mais afetados pela patologia. Mesmo com a intervenção e auxílio da Organização Mundial de Saúde, a hanseníase ainda está longe de ser erradicada em muitos países, indicando que o parasita vai continuar sua coexistência ao lado do hospedeiro.

No Brasil, os primeiros casos de hanseníase foram notificados no ano de 1600, na cidade do Rio de Janeiro, onde, anos mais tarde, seria criado o primeiro “Lazareto” – local para abrigar os doentes de Lázaro, lazarentos ou leprosos. Foram identificados, focos também na Bahia e no Pará, o que levou as autoridades da Colônia a solicitarem providências a Portugal, sem, entretanto, serem atendidas. As primeiras iniciativas do governo colonial só foram tomadas dois séculos depois, com a regulamentação do combate à doença, por ordem de D. João V. Entretanto, as ações de controle se limitaram à construção de leprosários e à assistência precária dos doentes (PENNA, 1994).

O Brasil teve a iniciativa pioneira de substituir oficialmente o termo “lepra” por hanseníase. Essa medida, entretanto, não tem se mostrado suficiente para, por si só, eliminar o estigma. Em primeiro lugar, por sua adoção não ter sido universal, e o termo “lepra” continuar sendo utilizado como sinônimo de hanseníase e

principalmente, porque a adoção não foi acompanhada de um esforço educativo, no sentido de mudar as atitudes diante da doença. Ainda hoje, continuam vigentes leis que discriminam o doente de hanseníase, dificultando sua reabilitação social (PENNA, 1994).

2.2 Epidemiologia

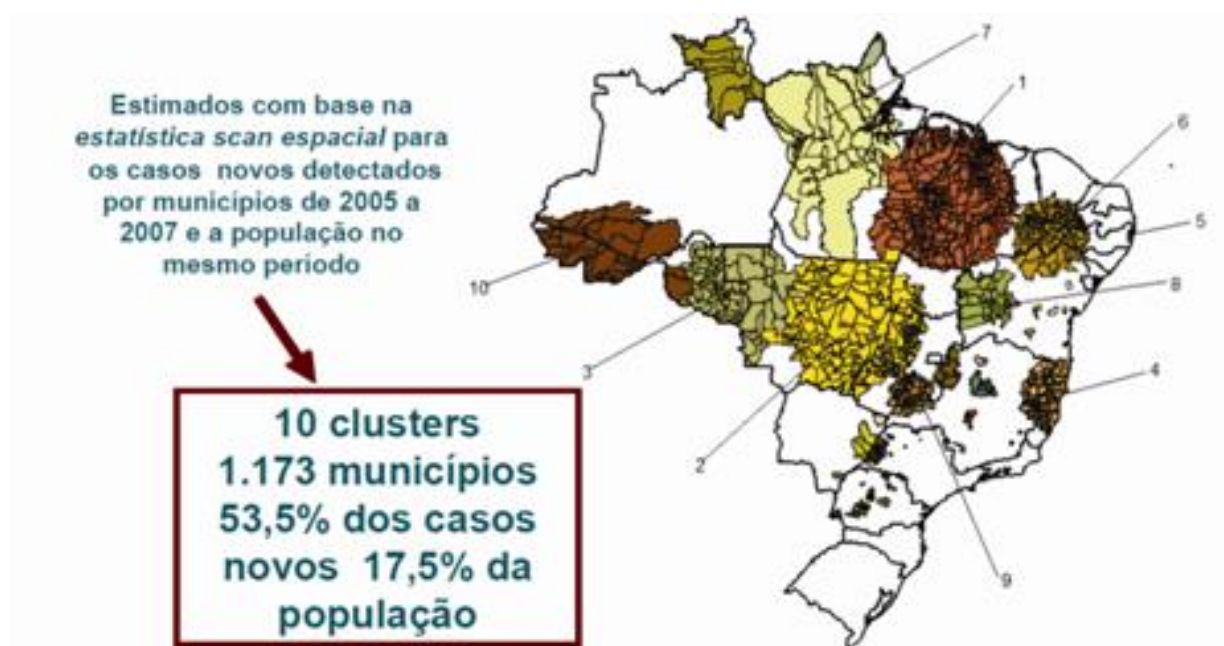
Hanseníase, doença crônica estigmatizante pelo potencial de causar danos neurológicos, resulta da infecção pelo *Mycobacterium leprae*, um bacilo álcool ácido resistente, que possui tropismo por nervos periféricos, podendo também comprometer as mucosas nasal e orofaringolaríngea, olhos e vísceras (GOMES; FRADE; FOSS, 2007). Apesar de terem sido difundidas campanhas para eliminação da hanseníase, enquanto problema de saúde pública e da Organização Mundial de Saúde (OMS) ter anunciado a eliminação da doença, em alguns países endêmicos em 2005, sua incidência, que é estimada pela detecção de casos novos, permanece alta.

Programas de controle da hanseníase, doença de longa incubação em que os contatos são o principal grupo de risco, devem estabelecer todos os procedimentos disponíveis para o controle desta doença. No período de 1980 a 2006, foi realizado o último estudo de tendência no Brasil, onde há indicação de um período inicial de redução das taxas de detecção (BRASIL, 2008a). Entretanto, essa estabilização ainda está em patamar muito alto, tendo sido identificados 10 clusters hiperendêmicos, envolvendo 14 estados brasileiros, Roraima (RR), Rondônia (RO), Mato Grosso (MT), Tocantins, (TO), Pará (PA), Maranhão (MA), Ceará (CE), Piauí (PI), Pernambuco (PE), Paraíba (PB), Bahia (BA), Minas Gerais (MG), Espírito Santo (ES) e Goiás (GO), - no período de 2003 a 2005 (BRASIL, 2008b).

A detecção dos espaços de maior risco da doença permite a orientação das ações de controle para áreas onde a transmissão é maior, possibilitando o trabalho dirigido para áreas geográficas contínuas visando maior efetividade epidemiológica.

O Estado do Maranhão (MA) está no Cluster1 (Edital MCTq/CNPq/CT-Saúde/MS/SCTIE/DECIT 34/2008), classificado como região hiperendêmica de hanseníase, conforme caracterizado pelo Ministério da Saúde. Somente o Estado do

Maranhão possui índice médio de detecção de 6,7 casos por 10.000 habitantes Programa de Controle da Hanseníase da Secretaria de Estado da Saúde do Maranhão (SES-MA, 2007), Figura 1. Na população total de 6,26 milhões de pessoas foram registrados, no ano de 2007, 4.175 casos, dos quais 384 casos registrados estão abaixo de 15 anos de idade (1,6 casos/10.000).



Fonte: SVS/MS, 2011.

Figura 1 - Agregação de casos novos de hanseníase, pelo coeficiente de detecção no Brasil, 2005 a 2007.

Em 2008 o Estado ocupou o primeiro lugar em número de casos notificados na região Nordeste, onde foram detectados 4.296 casos novos, dos quais 394 casos registrados ocorreram em menores de 15 anos, correspondendo a 9,17% do total. O coeficiente de detecção foi de 68,0/100.000 em menores de 15 anos. Ambos hiperendêmicos.

Em 2008, foram registrados somente em São Luís, 518 novos casos. Em 2009 esse número subiu para 566, o que corresponde a 48 novos casos em apenas um ano.

No ano de 2009 foi notificado um total de 3.872 casos novos de hanseníase no Maranhão, significando uma taxa de detecção de 60,8/100.000 habitantes, 371 casos novos em menores de 15 anos, taxa de detecção em menores de 15 anos

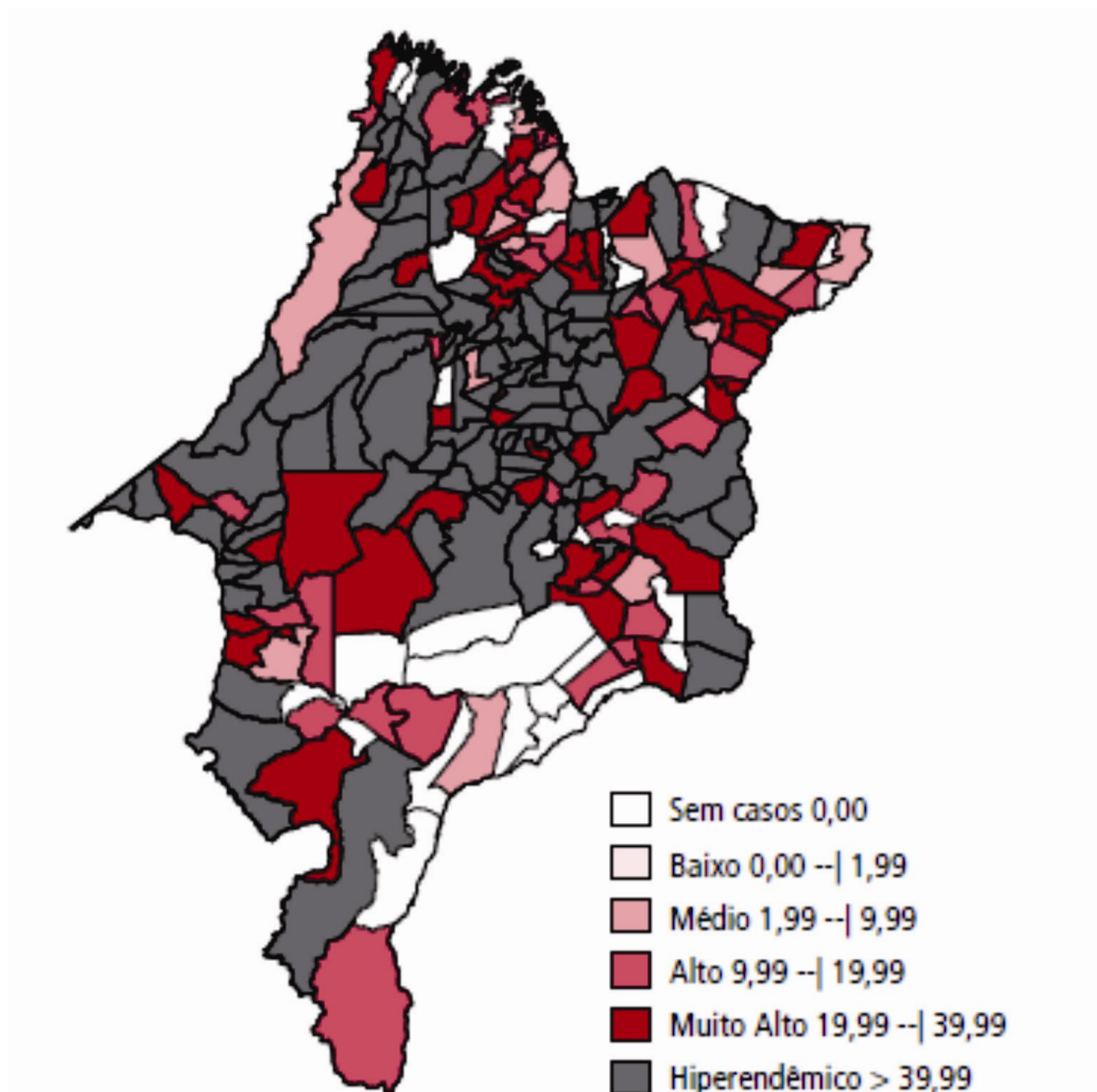
18,0/10.000, percentual de contatos examinados- 42% (16.651/7.009) precário; casos novos segundo sexo: masculino - 2.243 (57,9%) feminino - 1.629 (42,1%).

Apesar da importante redução do coeficiente de prevalência de hanseníase no Maranhão, que atualmente é de 5,7 casos/10 mil habitantes, o Estado demanda intensificação das ações para eliminação da doença, justificadas por um padrão de alta endemicidade segundo os parâmetros de prevalência (SES-MA, 2009).

Por meio da distribuição espacial verifica-se municípios mais endêmicos localizados no centro do Estado. Entre os 217 municípios maranhenses, 30 (14%) não notificaram casos novos em 2010, 98 (45%) são considerados hiperendêmicos, dos quais 26 (26,5%) com menos de 10 casos novos.

A capital São Luís apresentou 60,1 casos/100 mil habitantes em 2010, padrão de hiperendemicidade. No entanto, observa-se queda significativa no coeficiente geral de detecção (CGD) de 5,5 casos/100 mil habitantes ao ano, nos últimos 6 anos. O CGD em 2010 foi de 60,5 casos/100 mil habitantes e para os menores de 15 anos de 19,2 casos/100 mil habitantes, padrão de elevada magnitude. Em 2011 a taxa de detecção foi de 64,24 casos/100 mil habitantes (SVS-SES-MA, 2011).

As medidas de vigilância são voltadas ao aumento do percentual de exame de contatos que em 2010 foi precário, com 42,9%. O principal indicador de avaliação da qualidade da atenção e o percentual de cura dos casos diagnosticados, com resultado regular de 83,2% em 2010, Figura 2.



Fonte: SVS/MS, 2011.

Figura 2 - Coeficiente geral de detecção de hanseníase por municípios. Maranhão-2010

Em conjunto com a Secretaria de Saúde do Estado do Maranhão, foi definido como áreas prioritárias, para este estudo as cidades com mais de 100.000 habitantes, São Luís, Imperatriz e Açailândia com índices de detecção acima de 12 casos/10.000. A capital São Luís, mesmo com índices menores, correspondendo à alta endemia, foi também selecionada por ter uma intensa migração de várias cidades, sendo, representativa de todo o Estado do Maranhão.

O Estado do Maranhão foi escolhido também por possuir um dos menores Índices de Desenvolvimento Humano – IDH (0,683), sendo considerado o Estado mais pobre, com os menores índices educacionais e de renda do país.

2.3 Características do parasita

O microorganismo causador da hanseníase, o *Mycobacterium leprae*, é taxonomicamente classificado como pertencente à família Mycobacteriaceae, da ordem Actinomycetales. É uma bactéria não móvel, não formadora de esporos, que se apresenta na forma de bacilo, com comprimento entre 1 a 8 µm e diâmetro de 0,3 µm. São bactérias gram-positivas, fracamente coradas por álcool ou ácidos (álcool-ácido resistente). Pelo método de Fite-Faraco, exibem uma taxa de replicação bastante lenta (aproximadamente 12 dias), que ocorre, principalmente, em macrófagos, células epiteliais e células de Schwann. O fato da localização de lesões em regiões periféricas do corpo sugere que o bacilo possui preferências por áreas de baixa temperatura, o que foi demonstrado por Shepard (1965) em camundongos.

Sua membrana plasmática é revestida por parede celular, de cerca de 20 nm de espessura e composta por uma pseudo-bicamada lipídica, assim chamada devido à disposição das moléculas que formam a sua estrutura (SCOLLARD et al., 2006). O cerne da parede é composto por peptidoglicano e arabinogalactano ligado a ácidos graxos específicos de micobactérias, os ácidos micólicos (Figura 3). “A camada” mais externa da parede, ou seja, a capsula é composta dentre outros lipídeos por:

Monomicolatos de trealosa (TMM), por várias moléculas de glicolipídeos fenólico-1 (PGL-1) e de 1-ftioceroldimicocerosato (PDIM), sendo estes únicos para esta espécie de bactéria e parecem estar relacionados com a patogenicidade (HETT; RUBIN, 2008; AKAMA et al., 2010).

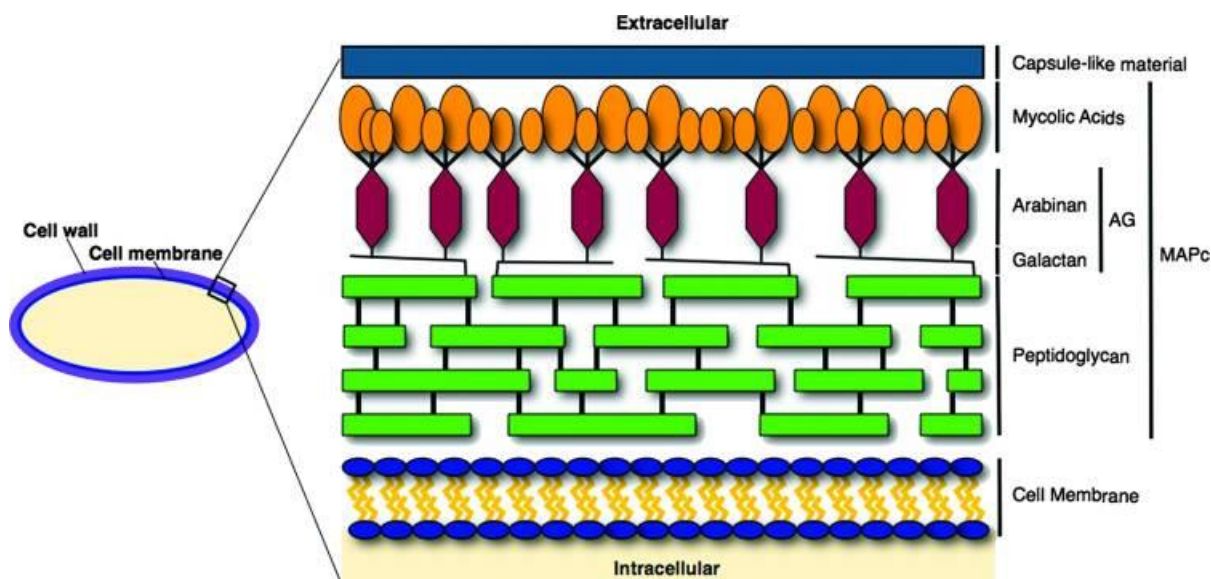


Figura 3 - Esquema representativo dos componentes básicos da parede celular do *Mycobacterium leprae*. Fonte: Hett e Rubin (2008).

A conservação desses genes, mesmo com a grande redução genômica sofrida pelo parasita, evidencia a importância adaptativa das proteínas capsulares (EIGLMEIER et al., 2001). Como exemplo, o PGL-1 pode ser citado: sabe-se que a sua secreção no interior de células fagocitárias inibe a resposta imune celular das mesmas e promove a neutralização dos radicais livres produzidos por estas células, quando ativadas. Estes dados apontam o importante papel destas moléculas da parede celular na modulação do sistema imune do hospedeiro durante a infecção (SILVA et al., 1993; BARRETO et al., 2007).

A análise do genoma do bacilo de Hansen demonstra um caso de evolução redutiva que reflete uma perfeita adaptação do patógeno ao seu nicho – as células da linhagem macrófaga (BROSCH et al., 2000; SCHURR et al., 2006). Além da perda dos mecanismos para obtenção de ferro, outras vias metabólicas completas foram perdidas devido à ausência de genes codificadores de enzimas. Dentre elas a cadeia de transporte de elétrons, vias catabólicas (lipólise e oxidação dos ácidos graxos) e a via de produção aeróbica de ATP (glicólise), que apesar da perda de várias enzimas, não teve sua função prejudicada.

Essas características reiteram a incapacidade de cultivar este bacilo *in vitro*, mas sua viabilidade mesmo fora do organismo humano é um tema que intriga os pesquisadores há longas datas (DESIKAN, 1977). Uma das hipóteses aponta a presença de códons de finalização “frameshift” em quase 3% das possíveis regiões

codificadoras de proteínas. Esta peculiaridade permitiria a síntese de diferentes proteínas em um mesmo “pedaço” do genoma (ANDERSON; ANDERSON, 1999; SMITH et al., 2005). Outra hipótese aponta mutações nos pseudogenes como responsáveis por essa capacidade.

Nakamura et al. (2009) verificaram que parte dos genes não funcionais de *M. leprae* acumularam mais mutações que as regiões codificantes de proteínas, sugerindo que essas regiões, capazes de transcrever RNAs, coordenariam funções como a regulação da atividade ribossomal, paralização na maquinaria intracelular e replicação, explicando assim a capacidade destas bactérias sobreviverem mesmo fora das células do hospedeiro.

2.4 Interações do parasita com as células do hospedeiro

Na década de 70, os primeiros ensaios clínicos já sugeriam que as deformidades, lesões e perda de sensibilidade característicos da hanseníase eram causadas pela invasão de *M. leprae* nas células do sistema nervoso periféricos, macrófagos e células endoteliais (SKINSNES, 1971). Mas décadas foram necessárias para que os primeiros estudos sobre as bases moleculares envolvidas na interação do patógeno com as células do hospedeiro fossem realizados.

A especificidade pelas células de Schwann dá-se pela afinidade do bacilo à região globular da cadeia $\alpha 2$ da laminina-2, uma glicoproteína constituem a lâmina basal das células de Schwann e macrófagos (RAMBUKKANA et al., 1993; RAMBUKKANA et al., 1997). A adesão é mediada por proteínas presentes na parede celular do patógeno, nas quais se destacam o PGL-1 e a LBP21 (laminin binding protein) (NG et al., 2000). Outros componentes da parede celular parecem induzir a perda da bainha de mielina nas células de Schwann, tornado-as mais suscetíveis à invasão pelo bacilo (RAMBUKKANA et al., 2002). Além disso, parecem existir outras adesinas, ainda não identificadas, capazes de ligar-se aos resíduos de alanina e lisina da cadeia da laminina-2 (MARQUES et al., 2001).

Entretanto, os mecanismos que promovem a interiorização do patógeno pelas células do hospedeiro não estão totalmente elucidados. Sabe-se que para que isso ocorra, são necessárias ativação de vias intracelulares para reorganização do

citoesqueleto. A via das tirosinas kinases (TK) está ativada nos processos de opsonização, realizado em células fagocitárias (KWIATKOWSKA; SOBOTA, 1999). Alves (2004) verificaram em seu trabalho que a proteína quinase C, tirosina quinase (TK) e o fosfatidil-inositol trifosfato (IP3) são moléculas necessárias para o processo de fagocitose de *M. leprae*.

Outra possível via de interiorização é a mediada por fagocitose, onde a vesícula engloba e funde-se aos lisossomos para que suas proteínas sejam degradadas e utilizadas para a apresentação de antígenos. Diversas micobactérias são capazes de inibir a fusão dessas organelas, desta forma mantendo-se vivas no interior das células (PIETERS; GATFIELD, 2002). Essa inibição parece ocorrer por uma redução na acidez das vesículas fagocitárias, promovendo uma parada na maturação do fagossomo (ALVES et al., 2004).

A sobrevivência do bacilo após a sua internalização é um passo fundamental para o curso da doença, pois a etapa seguinte envolve proliferação celular e reprodução do patógeno (BAKKER et al., 2006). O aumento de genes de progressão do ciclo celular (Ciclina D1 e p21) e ativação da cascata de sinalização de Erk1 e Erk2 nas células de Schwann são medidas por *M. leprae*, ressaltando a eficácia dos mecanismos do bacilo para manutenção do seu nicho no organismo do hospedeiro (TAPINOS; RAMBUKKANA, 2005).

O reconhecimento de microorganismo em macrófagos e células dendríticas é mediado por receptores hiperexpressos em células do sistema imune e presentes nos sítios de exposição, sendo estes os responsáveis por desencadear as primeiras respostas do hospedeiro (MENDONÇA et al., 2008). Os principais tipos de receptores são os toll-like receptors (TLRs), de lectina do tipo C (CLR) e do sistema complemento (CRs), responsáveis pelo reconhecimento de lipídeos da parede celular de *M. leprae* (ASTARIE-DEQUEKER et al., 2010).

Glicoproteínas como o PGL-1 são reconhecidos pelo receptor do tipo 3 do sistema completo (CR3) (SCHLESINGER; HORWITZ, 1991). Lipoglicanos são reconhecidos por receptores de lecitina e manose (SCHLESINGER et al., 1994). Outras estruturas não possuem interação com receptores de membranas, tais como o fosfatidil inositol manosídeo (PIM), que interferem na fagocitose inserindo lipídeos na membrana dessas células, que provocam um aumento na eficiência da fagocitose mediada pelos receptores (ILANGUMARAN et al., 1995).

A internalização dos bacilos pelos macrófagos desempenha um papel sumamente importante na patogênese da hanseníase, uma vez que este tipo celular irá modular as respostas celular e humoral durante o curso da infecção.

2.5 Aspectos imunológicos da hanseníase

No local de invasão (mucosa das vias aéreas superiores) as células dendríticas são as primeiras a reconhecer o bacilo. Células dendríticas estimuladas por antígenos de *M. leprae* apresentam um aumento na expressão de moléculas do MHC; classe II, uma vez que o complexo MHC-antígeno é capaz de estimular a diferenciação de linfócitos T, ativando a resposta imune celular (MAEDA et al., 2003).

Pelo mecanismo de apresentação de antígenos, após opsonização e processamento do microorganismo, estas células passam a expressar em sua superfície celular antígenos derivados da bactéria associados ao MHC de classe II (HASIMOTO et al., 2002). Este complexo desencadeia alterações intracelulares que resultarão na ativação e proliferação de células T CD4+ e CD8+ e na produção de INF- γ pelas mesmas (NEWPORT et al., 1996; JANEWAY, 2000; WEERDENBURG et al., 2010).

Dentre outras funções, o INF- γ promove aumento na produção de espécies reativas de nitrogênio em macrófagos mediante a ativação de enzima óxido nítrico sintetase (iNOS) (BLACKWELL et al., 2000; VISCA et al., 2002; SCHRODER et al., 2004). Já as espécies reativas de oxigênio (ROS) são produzidas pela explosão respiratória que ocorre após a fagocitose, onde a NADPH OXIDASE CATALISA A PRODUÇÃO DE SUPERÓXIDOS (O₂) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (SWINDLE et al., 2002). Desta forma, as células fagocitárias ativadas por INF- γ tornam-se capazes de limitar o crescimento e a sobrevivência de *M. leprae* (RAMASESH et al., 1991; COOPER et al., 2002).

Pacientes com hanseníase podem apresentar diferentes padrões de resposta imunológica frente à infecção pelo bacilo. Os indivíduos com hanseníase tuberculóide apresentam uma boa resposta imune celular do tipo Th1 e baixa

resposta humoral. A alta resposta adaptativa celular permite o controle da infecção mediante o ataque das células infectadas por *M. leprae*, reduzindo assim o nicho para replicação da bactéria (WILKINSON; LOCKWOOD, 2005). Apesar do efeito protetor deste tipo de resposta, danos como inflamações granulomatosas na pele e lesões nos nervos periféricos são observados a longo prazo (YAMAMURA et al., 1992).

No padrão de resposta Th1 observa-se uma enorme produção de $\text{INF-}\gamma$ e IL-2. Em lesões de pacientes com hanseníase tuberculóide são encontradas mais células dendríticas, o que justifica a maior produção de $\text{INF-}\gamma$ (SIELING et al., 1999). As células Th1 ativadas, após o processo de apresentação de antígenos, aumentam a produção de IL-2, uma citocina responsável pela proliferação e progressão de linfócitos T e pela estimulação de células NK, que possuem atividade citotóxica, atacando macrófagos e células de Schwann infectados pelo bacilo (CHIDLUNKAR et al., 1991; FOSS, 1997). As citocinas IL-7, IL-12, IL-15 e IL-18 são produzidas em menor quantidade na resposta Th1, mas parecem contribuir para o estado de imunidade ao bacilo, característico desses pacientes (GOULART et al., 2002).

Por outro lado, pacientes com hanseníase virchowiana possuem resposta imune celular reduzida, sendo este fator o principal responsável pela ineficiência de combater os bacilos, o que resulta na alta quantidade de bacilos nos nervos periféricos e na pele (MODLIN; BLOOM, 1993).

O Padrão de resposta imune celular neste espectro da doença é o Th2, com produção principalmente, de IL-4 e IL-10 (SIELING et al, 1993; NATH et al, 2000). A primeira estimula a diferenciação de células B e a proliferação de linfócitos Th2, enquanto a IL-10 inibe a proliferação de células Th1, reduz a expressão de citocinas antibacterianas (como o $\text{TNF-}\alpha$, $\text{INF-}\gamma$), de $\text{NF-}\kappa\beta$ e dos antígenos de classe II do MHC, reduzindo desta forma a capacidade de realizar a apresentação de antígenos e, conseqüentemente estimular as células T citotóxicas (SREENIVASAN et al., 1998; MOCELLIN et al., 2004).

Sharma et al. (1999) verificaram que indivíduos com hanseníase LL e DL, assim como os indivíduos não expostos ao bacilo, não aumentaram a translocação de PGL-1 para a superfície de células dendríticas, além de possuírem redução nesse tipo de células nas lesões, demonstrando uma deficiência na resposta celular (MODLIN, 2010). IL-10 também estimula a maturação de linfócitos B e a produção de anticorpos, o que resulta na alta resposta humoral, evidenciada nestes pacientes

pelos altos níveis de anticorpos circulantes, principalmente de IgM anti-PGL-1 (CHO et al,1983; FROTA et al, 2010).

Outra parte dos pacientes não possui uma resposta imune facilmente identificável, classificados como grupo Indeterminado (I). Acredita-se que esta seja a forma inicial da doença, pois os acometidos também não apresentam manifestações clínicas características (GOULART et al., 2002; PESSOLANI et al., 2003).

2.6 Influência da genética do hospedeiro na patogênese da hanseníase

As complexas interações do parasita com as células-alvo são determinadas pela composição genética do hospedeiro. Por isso, o desenvolvimento da doença após a exposição ao bacilo, assim como as diferentes formas clínicas da doença parecem ser determinadas por várias regiões genômicas em diferentes populações humanas (GOULART; GOULART, 2009).

Os modelos de susceptibilidade demonstram dois estágios da hanseníase após a exposição ao bacilo. O primeiro estágio da infecção seria aquela sem o aparecimento de sintomas clínicos (chamado de leprosy per se). Alguns genes atuam neste primeiro estágio, conferindo susceptibilidade ou resistência para o estabelecimento da infecção subclínica. Somente cerca de 5 a 10% dos infectados evoluem para o segundo estágio da doença, onde um conjunto de genes determina o tipo de resposta imune e conseqüentemente as manifestações clínicas específicas de algum dos polos da doença (ALTER et al., 2011).

Os primeiros estudos com este enfoque verificaram que complexos gênicos do sistema HLA (Antígenos Leucocitários Humanos) estavam envolvidos na susceptibilidade à hanseníase, aumentando a chance de pacientes passarem ao estágio leprosy per se (VAN EDEN et al., 1985; MEHRA, 1990). Além disso, haplótipos como o DR2-DR3, estariam envolvidos na determinação dos subtipos clínicos (SHAW et al., 2001; MIRA et al., 2003).

Muitos estudos foram realizados, relacionados aos genótipos do sistema HLA de classe I e II com a predisposição à doença e, após décadas de investigação, ficou claro que as diferentes moléculas codificadas por estes genes são responsáveis pela maior ou menor afinidade na ligação com os peptídeos da

bactéria (ALTER et al., 2010). Desta forma, eles controlam a magnitude da resposta imune, contribuindo assim para a gênese das formas clínicas (GELUK; OTTENHOFF, 2006; HSIEH et al., 2010).

Posteriormente, identificaram-se outros loci gênicos que também demonstravam atuar na susceptibilidade nos primeiros estágios da doença. Destacam-se as regiões: 10p 13, (SIDDIQUI et al., 2001); 17q22 (JAMIESON et al., 2004; MILLER et al., 2004) e 6q25 (MIRA et al., 2003), que também atuam na susceptibilidade para as formas paucibacilares e multibacilares (SCHURR et al., 2006).

Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) na região dos genes PARK2 e PACRG aumentam em quase cinco vezes a susceptibilidade à infecção por *M. leprae* e atuam no primeiro estágio de infecção (MIRA et al., 2004). Estes genes regulam as respostas celulares de estresse oxidativo e imunidade inata, influenciando a produção de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico nas células fagocitárias.

Um dos variantes descritos do gene PARK2 induz respostas antioxidantes, alterando assim a resposta natural dos fagócitos à infecção por *M. leprae* e, desta forma, aumentam a susceptibilidade (TAN et al., 2005). Outro papel desses variantes é na marcação de proteínas a serem degradadas pelo sistema ubiquitina proteassoma, pois o produto transcrito do gene é uma E-3- ligase (SHIMURA et al., 2000).

Variantes transcritos nos TLR (Toll-like receptors), efetores da resposta inata, são importantes no padrão de reconhecimento de moléculas e parecem aumentar o risco de desenvolvimento de doenças infecciosas (MISCH; HAWN, 2008). Estes receptores iniciam cascatas intracelulares que resultam na transcrição de citocinas pró-inflamatórias, regulando, desta forma, as respostas do hospedeiro (PREVEDELLO; MIRA, 2007; SAPKOTA et al., 2010).

Mesmo após a identificação de genes que conferem susceptibilidade ou resistência a doença infecciosa, a elucidação dos mecanismos pelos quais estes conferem tais capacidades ainda é necessária (ALCAÏS et al., 2005). Para isso mais estudos devem ser realizados para a confirmação de hipóteses geradas ao longo desses anos da era pós-genômica (GELUK; OTTENHOFF, 2006).

3 MATERIAL E MÉTODO

Estudo epidemiológico descritivo tendo como base o projeto multicêntrico “Aplicação de tecnologias moleculares, imunológicas e de geoprocessamento para a caracterização epidemiológica, diagnóstico e monitoramento da hanseníase em área hiperendêmica do Maranhão” do qual participam o Centro de Referência Nacional em Hanseníase/Dermatologia Sanitária-CREDESH/UFU-MG, Universidade Federal do Maranhão-UFMA/Laboratório de Biologia Molecular e Genética/UFMA e a Fundação Osvaldo Cruz-BA.

A pesquisa, objeto desta tese, foi realizada em São Luís, capital do Estado, com uma população estimada, de acordo com o censo 2012 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), de 1.039.610 habitantes, o que equivale a 15,48% da população total do Estado (6.714.314), com densidade demográfica de 1.249,98 habitantes/km² (IBGE, 2012), e ocupa uma área de 831,7Km². Está situada ao norte do Estado, onde se limita com o Oceano Atlântico; ao Sul com o Estreito dos Mosquitos, que a separa do continente; a Leste com a Bahia de São José e a Oeste com a Bahia de São Marcos.

O Programa de Controle da Hanseníase desenvolvido no Hospital Universitário Unidade Presidente Dutra, foi implantado em 1996, funcionando no Serviço de Dermatologia do referido hospital.

3.1 Amostra do estudo

Amostra de conveniência sendo incluídos neste estudo, os contatos domiciliares, que convivem ou conviveram com portadores de hanseníase nos últimos cinco anos, alcançados por demanda espontânea, campanhas, encaminhamento, que compareceram ao Serviço de Dermatologia do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão Unidade Presidente Dutra - HUUPD, assim como os que foram atendidos e encaminhados das unidades de referência do município de São Luís, no período de outubro de 2009 a outubro de 2011,

Foram avaliados 599 contatos de pacientes de hanseníase, que tiveram exame dermatoneurológico normal.

Para inclusão dos sujeitos na pesquisa foram considerados contatos domiciliares quem convive ou conviveu com pacientes de hanseníase nos últimos cinco anos. Esses contatos foram reunidos em uma sala de acolhimento, onde esta pesquisadora e uma equipe multiprofissional apresentou os objetivos desta pesquisa e após a concordância em participar do estudo, estes foram encaminhados para consultórios reservados onde foi realizado o exame clínico dermatoneurológico.

Os contatos que apresentaram normalidade no diagnóstico clínico na realização do exame dermatoneurológico, foram incluídos na pesquisa, preenchendo um formulário denominado protocolo de abordagem e seguimento de contato, contendo informações relativas ao caso índice, dados gerais do contato e procedimentos na abordagem e acompanhamento (ANEXO B).

Aqueles considerados suspeitos na avaliação foram encaminhados para avaliação médica e realização de exames de confirmação do diagnóstico.

Foram excluídos da pesquisa aqueles contatos suspeitos ou confirmados doentes durante a realização dos exames de diagnóstico.

Após a realização de todos os procedimentos era agendado um retorno para um ano ou assim que fosse observado qualquer sintoma ou sinal de hanseníase.

A caracterização epidemiológica foi feita pela avaliação das variáveis: gênero, idade, tipo de contato, forma clínica e classificação operacional dos casos índices. informações obtidas através do protocolo de acompanhamento de contato, preenchido a cada novo sujeito abordado.

Estudo epidemiológico, em que foram avaliados, 599 contatos de pacientes de hanseníase, no Serviço de Dermatologia do ambulatório do Hospital Universitário Presidente Dutra.

O recrutamento se deu através do atendimento da demanda espontânea, campanhas, encaminhamentos provenientes de outras unidades de saúde, no Serviço de Dermatologia do HUUPD entre outubro de 2009 a outubro de 2011. Os indivíduos foram esclarecidos sobre a importância do exame dos contatos, sendo solicitado o comparecimento dos mesmos, através de reuniões de sensibilização e seminários com coordenação municipal, com profissionais das equipes da Estratégia Saúde da Família (ESF), Estratégia Agentes Comunitários de Saúde (EACS), do município de São Luís, Estado do Maranhão, com gestores e profissionais das

Unidades de Saúde estaduais e municipais; vigilância epidemiológica; mídia, Rádio Universidade da UFMA, jornais escritos e de diversos canais de televisão locais, para maior esclarecimento e divulgação da pesquisa com o objetivo de solicitar apoio para as atividades a serem desenvolvidas.

Para os contatos que compareceram, explicou-se os objetivos da pesquisa e, aqueles que aceitaram participar, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE (APÊNDICE A) aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Maranhão (processo nº.23115-003005/2009-36) em 24 de janeiro de 2010. Os sujeitos da pesquisa não sofreram prejuízos decorrentes do estudo, tendo suas identidades preservadas, obedecendo os padrões exigidos pela resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

Os que apresentaram normalidade no diagnóstico clínico na realização do exame dermatoneurológico, foram incluídos na pesquisa preenchendo um formulário denominado protocolo de seguimento contendo informações relativas ao caso índice, dados gerais do contato, e procedimentos na abordagem e acompanhamento (ANEXO B).

Aqueles considerados suspeitos na avaliação foram encaminhados para realização de exames de confirmação do diagnóstico, dessa forma foram diagnosticados 187 pacientes correspondendo á 31% do total da amostra

Após a realização de todos os procedimentos, incluindo coleta de material para os exames, era agendado um retorno para um ano ou assim que fosse observado qualquer sintoma ou sinal suspeito de hanseníase.

3.2 Coleta e triagem das amostras

3.2.1 Procedimentos

Os sujeitos foram submetidos a exame clínico dermatoneurológico e outros procedimentos como: teste intradérmico de Mitsuda, análise de cicatriz vacinal pelo BCG, coleta de swab bucal, nasal, para realização da PCR, sangue periférico para

pesquisa de DNA de *M. leprae* e testes sorológicos ELISA anti-PGL1 e ML-Flow.

Quanto aos contatos de pacientes de hanseníase que não apresentaram cicatriz ou apenas uma cicatriz vacinal pelo BCG foram encaminhados para vacinar mais uma vez, depois do resultado do teste intradérmico de Mitsuda. Uma vez que é fato, a vacina BCG, garante certa imunidade contra hanseníase (DUPPRE, 2008).

As amostras coletadas foram encaminhadas para: Laboratório de Genética e Biologia Molecular e Imunofisiologia - UFMA que fez cadastro, armazenamento e processamento de amostras (ELISA, PCR), Teste sorológico para validação de novos marcadores; o Hospital Universitário da UFMA foi centro de referência para atendimento dos pacientes e contatos de hanseníase e unidade de realização do exame histopatológico; Laboratório Central da Secretaria de Saúde do Município de São Luís realizou baciloscopia do esfregaço dérmico; o Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz-FIOCRUZ-BA realizou capacitação e treinamento de pessoal; o Centro de Referência em Dermatologia Sanitária e Hanseníase do Hospital de Clínicas-UFU-MG responsabilizou-se pela produção de antígenos e novos marcadores moleculares, capacitação de pessoal (clínica e laboratorial), disponibilizou insumos e material permanente, para realização dos exames, bem como, desenvolvimento de software para gerenciamento de dados.

3.2.1.1 Exame dermatoneurológico

O diagnóstico da hanseníase é baseado na apresentação de um dos três principais sinais que são: manchas avermelhadas ou hipopigmentadas com perda de sensibilidade, troncos nervosos espessados (WHO, 2010).

Identificada a suspeita de hanseníase, o exame dermatoneurológico é feito para confirmação do diagnóstico e classificação da doença, para indicar o tratamento quimioterápico adequado. O exame dermatoneurológico inclui:

- exame da superfície corporal;
- teste de sensibilidade nas lesões suspeitas;
- avaliação neurológica simplificada;
- palpação de nervos;

- teste de força muscular;
 - teste de sensibilidade de córnea, palmas e plantas;
 - determinar o grau de incapacidade nas mãos, pés, olhos
- (BRASIL, 2002).

3.2.1.2 Teste de Mitsuda

Teste de Mitsuda - Reação intradérmica com 0,1 ml da Mitsudina humana, uma suspensão de 6×10^7 bacilos / ml mortos pelo calor, produzida pelo Instituto Lauro de Souza Lima - Bauru, SP (ILSL-Bauru,SP), realizada na superfície de flexão do antebraço direito, 4 cm abaixo da dobra antecubital, com leitura na 4^a semana, considerando como resultado, a medida do diâmetro da induração local, registrada em milímetros (mm). Utilizando-se os critérios da Organização Mundial de Saúde a reação de Mitsuda será descrita levando-se em conta os dados relacionados abaixo:

- Negativa (-): nada a observar e/ou sentir;
- Duvidosa (+/-): pápula menor ou igual a 3 mm de diâmetro;
- Positivo uma cruz (+): pápula com 4 a 6cm de diâmetro sem ulceração;
- Positiva duas cruzes (++) : pápula com 8 a 10mm de diâmetro sem ulceração;
- Positiva três cruzes (+++): nódulo maior que 10mm de diâmetro ou de qualquer tamanho, com ulceração (JOPLING; MCDOUGALL, 1991).

3.2.1.3 Extração do DNA total da mucosa nasal e bucal

O DNA total foi isolado segundo o protocolo padronizado pelo Laboratório de Patologia Molecular e Biotecnologia do CREDESH/UFU/MG. No tubo com a amostra do tecido submergida em TLN foram adicionados 30 μ L proteinase K (10mg/mL) e

40µL SDS 10% (para lise das membranas celulares e degradação de proteínas).

Posteriormente, as amostras foram incubadas em banho-maria à 65°C por 4h. Adicionou-se 600µL da solução de fenol: clorofórmio: álcool-isoamílico (25:24:1), centrifugou-se a 10.621g por 10min a 4°C e retirou-se a fase aquosa do sobrenadante, depositando-a em um tubo limpo (passo este, que foi repetido três vezes).

O DNA foi ressuspenso com etanol absoluto gelado e foi novamente centrifugado a 20.817g por 10 min a 4°C. por último, o sobrenadante foi descartado, restando só o *pellet* de dna, que foi ressuspenso em 30 µL de tampão TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 7.4). O DNA extraído das amostras foi armazenado em microtubos de 1,5L a -20°C até o momento de utilização dos mesmos para a amplificação por reação em cadeia da polimerase (GOULART et al., 2007).

3.2.1.4 Amplificação do DNA por PCR convencional

Segundo o mesmo protocolo padronizado pelo Laboratório de Patologia Molecular e Biotecnologia do CREDESH (MG). A técnica de PCR (Reação em cadeia da polimerase) foi utilizada para amplificar um fragmento de 130pb do DNA de *M leprae*. Para isso foram desenhados primers específicos com base nas sequências da região RLEP3 (X17153) do genoma da bactéria. Desta forma, o par de primers utilizado foi: (*forward*: 5' - GCA CGT AAG CAT GTC GGT GG - 3') e (*reverse*: 5' - CCG CGG CGC TAA CAA CTA TC - 3'), descritos anteriormente por Goulart et al. (2007). Para controle endógeno da reação foi co-amplificado em cada reação um fragmento de 200pb do gene humano NRAMP-1 (*Natural Resistance Associated Macrophage Protein One*). O par de *primers* utilizado para a amplificação deste gene foi: (*forward*: 5' - CTC GCA TTA GGC CAA CGA 3') e (*reverse*: 5' - TTC TGT GCC TCC CAA GTT AGC - 3') (COLE et al., 2001),

Para amplificação, uma mistura de reagentes foi adicionada a 2µL do DNA extraído: tampão de PCR (1x), MgCl₂ (1,5mM), *pool* de desoxinucleotídeos (200µM), os pares de primers (10 pmol) e a enzima Taq polimerase (1U), totalizando um volume final de 25µL. As amostras foram submetidas a desnaturação inicial (95°C

por 5 minutos), seguida de 34 ciclos de desnaturação (a 95°C por 40 segundos), anelamento (a 58°C por 40 segundos) e extensão (a 72°C por 40 segundos). Após os ciclos, houve a extensão final a 72°C por 10 minutos, seguida de resfriamento a 4°C por 1h.

A Figura 4 ilustra os resultados da amplificação do DNA das amostras de swab bucal e nasal pela técnica de PCR, após eletroforese e fotodocumentação.

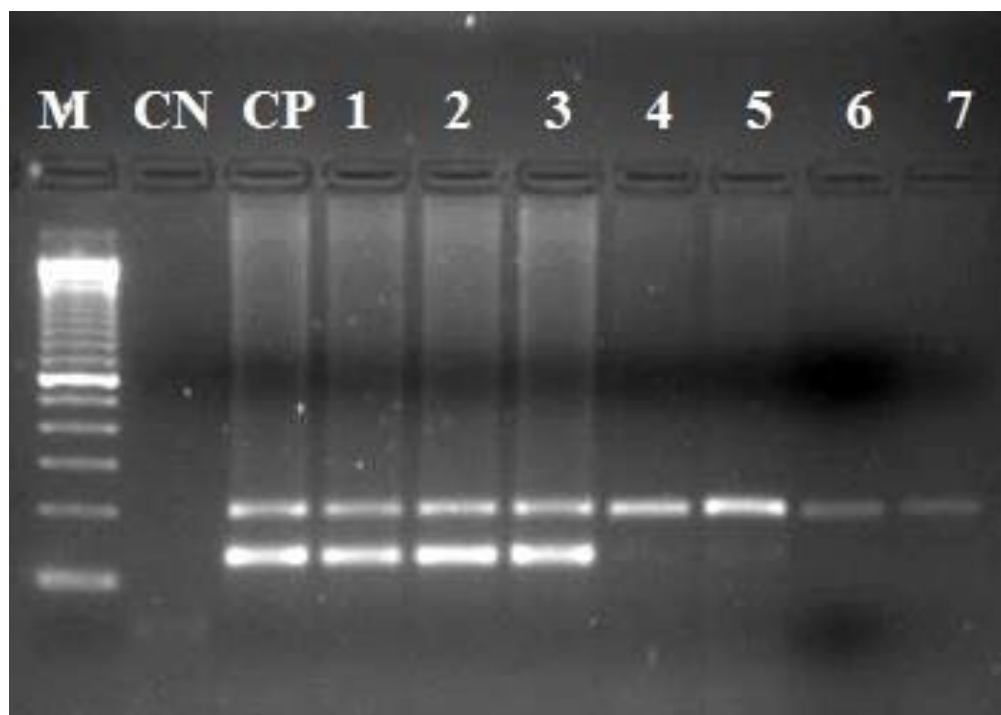


Figura 4 - Gel de agarose mostrando os resultados da amplificação de DNA de *M. leprae* em amostras de mucosa bucal e nasal. M= marcador de peso molecular 100 pb, CN= controle negativo, CP= controle positivo, Fragmento 200 pb= gene constitutivo (N-RAMP1), Fragmento 130 pb= *M. leprae*: Colunas 1, 2,3 correspondem á amplificação da região RLEP3 do genoma do *M. leprae*.

3.2.1.5 Eletroforese e foto documentação

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1,5%) com 5µL de brometo de etídio (10mg/mL), em cuba de eletroforese com TBE (0,5x). Os amplicons foram submetidos à tensão de 100 V por 1 h, gerando padrões de banda. Para análise dos padrões de banda, o gel foi exposto à luz ultravioleta e posteriormente fotodocumentado. A positividade dos exames de PCR é dada quando, em uma mesma amostra, amplificam dois fragmentos distintos: um de 200 pares de base (gene NRAMP1) e um de 130 pares de base (região RLEP3 do

genoma da bactéria (COLE et al., 2001).

3.2.1.6 Teste do fluxo lateral (ML-FLOW)

O teste sorológico de fluxo lateral, que detecta anticorpos IgM contra o glicolípido fenólico 1 (PGL-1), está relacionado à presença do *Mycobacterium leprae* no hospedeiro, e a positividade nos pacientes correlaciona-se com a carga bacilar (ANDRADE et al., 2008; BUHRER-SEKULA et al., 2003).

O dispositivo do teste compreende uma faixa de nitrocelulose contendo anti-IgM PGL-1, avaliando de forma rápida a quantidade circulante de anticorpos para este peptídeo (GROSSI et al., 2008a; GROSSI et al., 2008b).

O teste consistiu na punção do dedo anelar esquerdo com uma lanceta ou agulha de insulina; o sangue total coletado com um tubo capilar foi colocado no receptáculo do cartucho e adicionado solução tampão, os resultados são obtidos entre cinco a dez minutos. O resultado positivo foi indicado pela presença de uma linha vermelha na zona do teste.

As leituras foram realizadas após 5 min, sendo consideradas positivas aquelas cujas faixas apresentavam coloração avermelhada e negativas aquelas sem nenhuma ou apenas leve coloração.

Os resultados positivos foram expressos de forma semi-quantitativa, de acordo com a intensidade da coloração observada (+, ++ ou +++).

Todos foram então submetidos ao ML-Flow, que consiste em um teste imunológico composto por uma fita de nitrocelulose que apresenta, de um lado, uma superfície contendo anticorpos IgM marcados com ouro e no outro lado, uma superfície de absorção. Um trissacarídeo semi-sintético similar ao PGL-1, ligado à albumina humana, é usado como antígeno em linha de 1mm na superfície da fita, Figura 5



Figura 5 – Teste rápido para detectar hanseníase

Fonte: O teste desenvolvido pelo Instituto de Pesquisa de Doenças Infecciosas, de Seattle, nos EUA, e pela empresa Brasileira Orange Life. ANVISA, 2013.

3.2.1.7 Swab bucal e swab nasal

Em cada contato foi realizada a coleta de material da cavidade oral através da introdução de escovinhas de fio de nylon flexíveis, umedecidas em TLN (50 μ L) (tampão de lise nuclear), para coleta de swabs, esfregando-se gentilmente, algumas vezes pela mucosa bucal e sobre a mucosa do septo nasal através das fossas nasais, respectivamente e armazenadas em microtubos 1,5 μ L.

As hastes com o material foram introduzidas e vascolejadas em tubos estéreis contendo 500 μ L de tampão de lise nuclear (TLN – NaCl 400mM, EDTA, pH 8,050mM e Tris-Cl pH 8,025 mM) e encaminhado ao Laboratório de Genética e Biologia Molecular da UFMA, para extração de DNA das amostras.

3.2.1.8 Sangue Periférico

Foi realizada antissepsia com algodão embebido em álcool 70%, seguida por punção da veia braquial com sistema BD Vacutainer. Para a PCR em tempo real, foi coletado um tubo de 4 mL, com EDTA, de sangue venoso periférico dos pacientes virgens de tratamento e dos contatos domiciliares de

pacientes com hanseníase. Para a sorologia, o sangue periférico de pacientes e contatos foi coletado em tubo de 8 mL com gel separador.

As amostras foram mantidas em geladeira e encaminhadas em gelo reciclável ao Laboratório de Genética e Biologia Molecular da UFMA, para separação do soro e extração do DNA e posterior encaminhamento ao Laboratório para realização da sorologia ELISA Anti-PGLI.

3.2.1.9 ELISA para Detecção de Anticorpos Anti-PGL-1

O protocolo para o ELISA indireto utilizando o antígeno PGL-1 nativo segue o descrito por Young et al. (1984), com algumas modificações. Para titulação dos níveis de anti-PGL-1 foi realizado o método ELISA indireto padronizado no Laboratório de Patologia Molecular e Biotecnologia do CREDESH/HC/UFU-MG.

As placas de microtitulação de 96 poços foram incubadas por 1 hora com 50µL da solução contendo 10,0µg/ml de PGL-1 + BSA, a 37° C. A seguir foram feitas três lavagens com PBS e as placas foram novamente incubadas com 300µL/poço da solução de bloqueio contendo PBS-BSA 1%.

Decorrido o tempo de bloqueio, realizou-se 3 lavagens com PBS. Após esta etapa, seguiu-se a incubação dos soros diluídos em PBS-BSA 1% e incubados por duas horas, a 37°C. Novamente os poços foram lavados com PBS e incubados durante 1 hora a 37°C, com anticorpos anti-IgM humano produzidos em camundongo e marcados com peroxidase, diluídos em 1:10000.

Após novas lavagens com PBS o substrato e-phenilenediamine dihydrochloride. Seguir-se-á um tempo de incubação de 20 minutos para que a reação da enzima ocorra e, então, será adicionado H₂S₀₄ 2N para parar a reação.

A leitura realizada no leitor de ELISA MULTISCAN em 492 nm. Em diferentes estudos, os critérios adotados para definir níveis positivos de anticorpos anti-PGL-1 variam bastante (ULRICH et al., 1991; CELLONA et al., 1993). Nesta pesquisa foram considerados positivos soros cujo índice ELISA (IE) foi igual ou superior a 1,1.

3.3 Análise dos Dados

Os dados foram digitados no Sistema para Estudo e Controle da Hanseníase - SECH-CREDESH-UFU-MG, software construído exclusivamente para armazenagem e processamento de dados do projeto. As informações foram posteriormente transportadas para planilha eletrônica EXCEL versão 2010, e em seguida processadas no aplicativo Biostat v. 10, que opera com índices e variáveis voltadas para estudos biológicos, culminando nos resultados encontrados e discutidos neste trabalho.

Utilizou-se o teste exato de Fisher para dados de contagem. Nessa situação, o teste exato de Fisher é superior ao teste qui-quadrado (AGRESTI, 1992). Os testes foram realizados no software R, através da função `fisher.test`. Por regra de decisão, serão consideradas dependentes as variáveis cujo valor descritivo do teste de Fisher for menor que 5% (nível de significância).

A prova de Fisher constitui uma técnica não-paramétrica útil para analisar dados discretos (nominais ou ordinais) quando o tamanho das duas amostras é pequeno.

A prova determina se os dois grupos nas linhas diferem na proporção em que se enquadram nas duas classificações.

4 RESULTADOS

A tabela 1 resume informações sobre as características dos contatos. Verificou-se que a maioria dos contatos está representada pelo gênero feminino (57,3%) e a faixa etária predominante está acima de 15 anos (64,9%) com maior frequência na faixa etária de 20 a 59 anos, ou seja, idade adulta e produtiva. Entretanto, a média de idade foi de 27,7% anos, população eminentemente jovem, sendo que os adolescentes representam 44,4% da população estudada e 67,8% estavam na faixa etária de 1 a 35 anos de idade.

Na distribuição dos contatos segundo local de convívio com o caso índice, a maioria (75,0%) convive no meio intradomiciliar com os doentes, seguido do convívio extradomiciliar (24,6%). A maioria dos contatos apresentou cicatriz de BCG única (60,8%), a forma clínica foi HT e a classificação operacional mais frequente foi a multibacilar (62,6%).

Tabela 1 - Características dos contatos de pacientes com hanseníase. Setor de Dermatologia do HUUPD, São Luís-MA, 2013.

Características	N	%
Gênero		
Masculino	256	42,7
Feminino	343	57,3
Faixa etária (anos)		
1 a 15	210	35,1
Acima de 15	389	64,9
Tipo de contato		
Intradomiciliar	372	62,1
Intradomiciliar-íntimo	77	12,9
Extradomiciliar	141	23,4
Extradomiciliar-íntimo	7	1,2
Ocupacional	2	0,4
Cicatriz BCG		
Nenhuma	128	21,4
Uma cicatriz	364	60,8
Duas cicatrizes	107	17,8
Caso índice		
MB	375	62,6
PB	224	37,4
Total	599	100,0

Houve predomínio dos contatos da forma clínica HT (34,4%) na faixa etária ≤ 15 anos (tabela 2). A classificação multibacilar foi predominante na faixa etária maior de 15 anos (64,9%) (tabela 3). O teste de Fisher sugere que não há associação entre forma clínica e classificação operacional do caso índice com a faixa etária dos contatos.

Tabela 2 – Distribuição percentual de contatos de pacientes com hanseníase quanto à idade relacionado com a forma clínica do caso índice HUUPD, São Luís-MA, 2013.

Forma Clínica do caso índice	Idade				Total N
	≤ 15 anos		> 15 anos		
	N	%	N	%	
DD	39	18,4	55	14,2	94
DT	41	19,3	83	21,4	124
DV	10	4,7	29	7,5	39
HI	11	5,2	27	7,0	38
HT	73	34,4	96	24,8	169
VV	6	2,8	18	4,7	24
NI*	32	15,2	79	20,4	109
Total	212	100,0	387	100,0	599

(*) NI = não informado. Legenda das Formas Clínicas: I- Indeterminada; T- Tuberculóide; DT-Dimorfo-Tuberculóide ; DD- Dimorfa-Dimorfa; DV- Dimorfo-Virchowiana; VV-Vrichowiana-Virchowiana;

Tabela 3 – Distribuição percentual de contatos de pacientes com hanseníase quanto ao gênero relacionado com a classificação operacional do caso índice. São Luís-MA, 2013.

Classificação Operacional	Idade				Total N
	≤ 15 anos		> 15 anos		
	N	%	N	%	
MB	120	56,6	251	64,9	371
PB	90	42,5	132	34,1	222
NI	2	0,9	4	1,0	6
Total	212	100,0	387	100,0	599

Quanto à vacinação com BCG (tabela 4), verificou-se predomínio de cicatriz vacinal única no gênero masculino (63,2%) enquanto no feminino (60,7%). A faixa etária menor ou igual a 15 anos, predominou quanto a presença de cicatriz vacinal única (74,0%) (tabela 4).

Tabela 4 – Distribuição percentual de contatos de pacientes de hanseníase quanto ao gênero e idade relacionado à cicatriz vacinal de BCG HUUPD, São Luís-MA, 2013.

VARIÁVEIS	CICATRIZ VACINAL DE BCG						Total N	p
	0		1		2			
	N	%	N	%	N	%		
Gênero								0,6743
Feminino	73	21,1	210	60,7	63	18,2	346	
Masculino	48	19,0	160	63,2	45	17,8	253	
Total	131	100,0	362	100,0	104	100,0	599	
Idade								0,0001
≤ 15 anos	8	3,8	157	74,0	47	22,2	212	
> 15 anos	121	31,3	206	53,2	60	15,5	387	
Total	129	100,0	363	100,0	107	100,0	599	

O número de cicatrizes vacinais não mostrou associação relevante com o resultado de nenhum dos testes diagnósticos realizados com valores do teste de Fisher iguais a 0,3502, 0,2494 e 0,0960 respectivamente para Elisa, Mitsuda e ML-Flow (tabela 5).

Tabela 5 - Distribuição percentual de contatos de pacientes com hanseníase quanto ao Elisa, Mitsuda e ML-FLOW relacionados com a cicatriz de BCG HUUPD, São Luís-MA, 2013.

VARIÁVEIS	BCG						Total N
	0		1		2		
	N	%	N	%	N	%	
ELISA							
Negativo	90	78,3	288	80,5	90	84,9	468
Positivo	23	20,0	54	15,0	14	13,2	91
Sem amostra	2	1,7	16	4,5	2	1,9	20
Total	115	100,0	358	100	106	100,0	579
MITSUDA							
Negativo	12	11,2	53	16,5	12	11,9	77
Positivo	54	50,5	139	43,2	43	42,6	236
Não administrado	17	15,9	71	22,0	29	28,7	117
Perdeu leitura	24	22,4	59	18,3	17	16,8	100
Total	107	100,0	322	100,0	101	100,0	530
ML-FLOW							
Negativo	85	84,1	250	75,3	87	85,3	422
Positivo	3	3,0	22	6,7	6	5,8	31
Não realizado	13	12,9	60	18,0	9	8,9	82
Total	101	100,0	332	100,0	102	100,0	535

Os resultados dos testes diagnósticos foram analisados segundo a distribuição por gênero e faixa etária dos contatos, classificação operacional e forma clínica dos casos índices. Em relação ao gênero, o teste de Fisher não mostrou predomínio de positividade (tabela 6), com valores-p iguais a 0,7586, 0,1405, 0,6936, 0,0528 e 0,1187 para os testes swab bucal, swab nasal, teste de Mitsuda, teste ELISA e ML-Flow, respectivamente.

Em amostra de swab bucal a detecção molecular de *M leprae* foi de 3,2% em gênero feminino e 1,6% em gênero masculino e em swab nasal foi de 2,6% no feminino e 0,8 no gênero masculino. O índice de positividade encontrado nesse estudo é proporcional ao número amostral e condizente com os achados na literatura. Martinez (2010) verificaram 6,8% de positividade em amostra de swab

bucal de contatos. Almeida et al., (2004) encontraram 1,7% em amostra de *swab* nasal.

Os anticorpos anti-PGL1, a sorologia ELISA e ML-FLOW foram positivos em maior frequência, respectivamente, nas seguintes formas clínicas HT e DT de contatos de casos MB.

Tabela 6 – Distribuição percentual de contatos de pacientes com hanseníase quanto ao gênero relacionado com os teste/exames HUUPD, Luís-MA, 2013.

Teste/Exame	Variáveis	Gênero				Total	p
		Feminino		Masculino			
is		N	%	N	%	N	
PCR Swab Bucal	Negativo	302	89,8	228	90,5	530	0,76
	Positivo	10	3,2	4	1,6	14	
	Amost. Insufic.	23	6,8	19	7,5	42	
	Sem Amostra	1	0,2	1	0,4	2	
Total		336	100,0	252	100,0	588	
PCR Swab Nasal	Negativo	281	84,2	226	90,0	507	0,14
	Positivo	9	2,6	2	0,8	11	
	Amost. Insufic	41	12,2	22	8,7	63	
	Sem Amostra	3	1,0	1	0,5	4	
Total		334	100,0	251	100,0	585	
Mitsuda	Negativo	45	14,9	32	14,0	77	0,6
	Positivo	138	45,8	99	43,6	237	
	Não Admin.	60	19,8	55	24,2	115	
	Perdeu leitura	59	19,5	41	18,2	100	
Total		302	100,0	227	100,0	529	
Elisa	Negativo	256	77,40	210	85,0	466	0,053
	Positivo	63	19,0	29	11,7	92	
	Sem Amostra	12	3,6	8	3,3	20	
Total		331	100,0	247	100,0	578	
ML-Flow	Negativo	227	75,6	196	83,0	423	0,12
	Positivo	20	6,7	11	4,7	31	
	Não Realizado	53	17,7	29	12,3	82	
Total		300	100,0	236	100	536	

A relação dos resultados dos testes e a faixa etária dos contatos mostrou que o Mitsuda e ML-Flow apresentaram predomínio de positividade no grupo acima de 15 anos confirmados pelo teste de Fisher com valores-p iguais a 0,0087 e 0,0120 respectivamente (tabela 7).

Tabela 7 - Distribuição percentual de contatos de pacientes com hanseníase quanto à idade relacionada com os testes/exames HUUPD, Luís-MA, 2013.

Teste/Exame	Variáveis	Idade				Total N	p
		≤ 15 anos		> 15 anos			
		N	%	N	%		
PCR Swab Bucal	Negativo	189	90,5	341	89,9	530	0,2
	Positivo	8	3,8	6	1,5	14	
	Amost.Insuf.	12	5,7	30	7,9	42	
	Sem Amost.	-	-	2	0,7	2	
Total		209	100,0	379	100,0	588	
PCR Swab Nasal	Negativo	185	88,5	322	85,4	507	0,65
	Positivo	2	1,0	9	2,4	11	
	Amost.Insuf.	21	10,0	43	11,4	64	
	Sem Amost.	1	0,5	3	0,8	4	
Total		209	100,0	377	100,0	586	
Mitsuda	Negativo	33	17,3	43	12,8	76	0,0087
	Positivo	72	37,7	164	48,5	236	
	Não Admin.	38	19,9	79	23,4	117	
	Perdeu leitura	48	25,1	52	15,3	100	
Total		191	100,0	338	100,0	529	
Elisa	Negativo	172	82,3	296	80,2	468	0,195
	Positivo	27	12,9	63	17,0	90	
	Sem Amost.	10	4,8	10	2,8	20	
Total		209	100,0	369	100,0	578	
ML-Flow	Negativo	151	76,7	271	80,6	422	0,012
	Positivo	6	3,0	24	7,0	30	
	Não Realizado	40	20,3	42	12,4	82	
Total		197	100,0	337	100,0	534	

A tabela 8 mostra o resultado dos testes conforme a forma clínica do caso índice. O teste de Fisher aponta a forma clínica como fator relevante na positividade dos testes Mitsuda e ML-flow, com níveis descritivos respectivamente iguais a 0,001 e 0,005.

Tabela 8 - Distribuição percentual de contatos de pacientes com hanseníase quanto a exames e forma clínica do caso índice HUUPD, São Luís-MA, 2013.

Forma Clínica do caso índice	PCR Swab Bucal				PCR Swab Nasal				Mitsuda				Elisa			ML-Flow		
	Neg.	Pos.	Amst. Insuf.	Sem Amost	Neg.	Pos.	Amst. Insuf.	Sem Amost	Neg.	Pos.	Não Adm.	Perd. Leit.	Neg.	Pos.	Sem. Amost	Neg.	Pos.	Não Realizo
DD	90	2	3	-	82	2	9	-	13	40	13	13	69	17	2	64	4	18
%	16,9	14,3	7,1	-	15,9	18,2	14,2	-	16,6	16,8	11,2	13,0	14,7	18,2	10,0	15,1	12,9	21,9
DT	112	1	12	-	107	2	14	2	10	41	28	29	96	21	6	82	12	16
%	20,9	7,1	28,5	-	20,8	18,2	22,2	50,0	12,8	17,3	23,9	29,0	20,4	22,5	30,0	19,5	38,7	19,5
DV	35	4	1	-	34	4	2	-	11	18	4	3	28	11	1	21	-	12
%	6,5	28,5	2,4	-	6,6	36,4	3,2	-	14,2	7,5	3,4	3,0	5,9	11,8	5,0	5,0	-	14,7
HI	32	-	1	1	33	-	1	1	3	21	3	4	33	2	-	24	3	2
%	5,9	-	2,4	50,0	6,4	-	1,7	25,0	3,8	8,9	2,5	4,0	7,0	2,1	-	5,8	9,7	2,5
HT	152	4	14	1	145	2	22	1	19	73	30	33	135	30	5	111	8	32
%	28,4	28,5	33,3	50,0	28,2	18,2	34,9	25,0	24,4	30,9	25,7	33,0	28,7	32,3	25,0	26,2	25,8	39,0
VV	21	1	2	-	21	-	2	-	3	7	4	5	20	3	-	20	1	1
%	3,9	7,1	4,8	-	4,0	-	3,2	-	3,8	2,9	3,4	5,0	4,2	3,3	-	4,7	3,2	1,2
NI	94	2	9	-	91	1	13	-	19	37	35	13	90	9	6	101	3	1
%	17,5	14,3	21,5	-	18,1	9,0	20,6	-	24,4	15,7	29,9	13,0	19,1	9,8	30,0	23,7	9,7	1,2
Total	536	14	42	2	513	11	63	4	78	237	117	100	471	93	20	423	31	82
%	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Total de Sujeitos				594				591				532			584			536
p		0,154		100,0		0,28		100,0		0,001			0,149			0,005		100,0

(*)NI=não informado. Não foram observadas algumas notificações nos protocolos quanto a forma clínica do caso índice por serem contatos extradomiciliares. Legenda das Formas Clínicas: I- Indeterminada; T- Tuberculóide; DT-Dimorfo-Tuberculóide ; DD- Dimorfa-Dimorfa; DV- Dimorfo-Virchowiana; VV-Virchowiana-Virchowiana;

A positividade dos resultados dos testes imunológicos foi preponderante para a forma multibacilar (tabela 9). A classificação operacional foi apontada como fator relevante para o resultado do teste Mitsuda, com um valor-p de 0,0296 no teste de Fisher.

Tabela 9 - Distribuição percentual de contatos de pacientes com hanseníase quanto a exames e classificação operacional do caso índice HUUPD, São Luís-MA, 2013.

Classif Operac.	PCR Swab Bucal				PCR Swab Nasal				Mitsuda				Elisa			ML-Flow		
	Neg.	Pos.	Amost. Insufic.	Sem Amost	Neg.	Pos.	Amost. Insufic	Sem Amost	Neg.	Pos.	Não Adm.	Perd. Leit.	Neg.	Pos.	Sem. Amost	Neg.	Pos.	Não Realiz
MB	339	10	25	-	323	8	38	2	54	137	84	58	292	60	12	276	20	47
%	63,2	71,4	59,6	-	62,9	72,7	60,3	50,0	69,3	57,8	71,8	58,0	61,9	64,5	60,0	65,2	64,5	57,3
PB	197	4	17	2	190	3	25	2	24	100	33	42	179	33	8	147	11	35
%	36,8	28,6	40,4	100,0	37,1	27,3	39,7	50,0	30,7	42,2	28,2	42,0	38,1	35,5	40,0	34,8	35,5	42,7
Total	536	14	42	2	513	11	63	4	78	237	117	100	471	93	20	423	31	82
%	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Total				594				591				532			584			536
				100,00				100,00				100,00			100			100,00
p		0,31				0,79				0,03				0,89			0,38	

As tabelas 10 e 11 resumem os valores-p dos testes de independência realizados para cada par cruzado de variáveis de interesse. O teste de Fisher confirma e suporta todas as afirmações feitas nessa seção.

Tabela 10 – Níveis descritivos (valores – p) para os testes nas tabelas de contingência 2 a 10.

	Sexo	Idade
Forma clínica	0,7714	0,0707
Classificação operacional	0,7980	0,4116
BCG	0,6743	0,0000
Resultado Swab bucal	0,7586	0,2000
Resultado Swab nasal	0,1405	0,6517
Resultado Mitsuda	0,6936	0,0087
Resultado Elisa	0,0528	0,1946
Resultado ML-flow	0,1187	0,0120

Tabela 11 – Níveis descritivos para as variáveis nas tabelas 11 e 12.

	Forma clínica	Classificação operacional
Resultado Swab bucal	0,1544	0,3061
Resultado Swab nasal	0,2849	0,7889
Resultado Mitsuda	0,0010	0,0296
Resultado Elisa	0,1494	0,8859
Resultado ML-flow	0,0005	0,3846

5 DISCUSSÃO

O presente estudo, avaliou características epidemiológicas, clínicas e imunológicas dos contatos de hanseníase. Foi demonstrado que os contatos predominantemente convivem no meio intradomiciliar com casos índices multibacilares, destacando-se as formas clínicas HT, DT e DD como as mais frequentes. Encontrou-se a maior positividade dos testes imunológicos (ELISA, ML-Flow e Mitsuda) entre os contatos de casos multibacilares. A classificação operacional foi fator relevante para o teste Mitsuda. A presença de cicatriz de BCG única foi predominante em ambos os gêneros, mas não mostrou associação com o resultado de nenhum dos testes. Os testes Mitsuda e ML-Flow mostram prevalência de positividade para a faixa etária acima de 15 anos. Verificou-se ainda que ambos têm associação com a forma clínica do caso índice.

Estudos têm demonstrado que contatos domiciliares de pacientes multibacilares tem risco 5 a 10 vezes maior de desenvolver a doença do que a população geral. Para Beiguelman (2002), os contatos domiciliares, em geral, são geneticamente semelhantes ao caso índice e provavelmente mais susceptíveis que os não contatos. A elevada incidência da doença nesses pacientes reitera a importância de programas de acompanhamento dos contatos mesmo em áreas endêmicas (MATOS et al., 1999). O mesmo estudo demonstra que os contatos não vacinados com BCG, os que apresentaram um resultado inicial negativo para o teste Mitsuda, além dos que tiveram caso índice multibacilar em sua família constituíram um grupo com maior risco de contrair a hanseníase.

A classificação operacional multibacilar do caso índice tem sido predominante em diversos estudos. Segundo Grossi et al. (2008a), a classificação MB foi encontrada em 59% dos casos índices e a classificação PB em 41%. Esses dados assemelham-se aos do Ministério da Saúde no Brasil, do ano de 2001 a 2009, em que os casos multibacilares alcançaram uma frequência média de 53,4%, apresentando sempre a maior porcentagem em todo o período (BRASIL, 2011). Resultados semelhantes foram encontrados por Sanches et al. (2007) e Alves et al. (2010) que descreveram que 63% e 73% dos casos índices eram referentes a casos multibacilares respectivamente.

Fica evidenciado que os pacientes só estão procurando o serviço de saúde após a polarização para as formas graves e contagiosas da doença ou a ineficiência das atividades de diagnóstico precoce das unidades de saúde.

A predominância de contatos do gênero feminino (57,3%) e na faixa etária acima de 15 anos (64,9%) foi semelhante ao resultado encontrado por Vieira et al. (2008), onde o percentual maior de contatos era do gênero feminino (58%) e a faixa etária predominante foi a de 0 a 29 anos (72,1%), o que coincide com a fase produtiva e jovem da vida, havendo assim maiores relações sociais e afetivas, maior contato com as pessoas no seu cotidiano, o que acaba por contribuir para transmissibilidade da doença.

No que se refere à idade, acrescenta-se ainda que os achados diferem dos encontrados por Leite et al. (2009) que observou maior frequência de contatos na faixa etária de menores de 10 anos. Essa diferença pode ter sido influenciada pelo maior comparecimento da faixa etária acima de 15 anos ao serviço de saúde, pois seria maior a preocupação deste grupo com as deformidades físicas e dermatológicas que a doença poderia causar.

Segundo Lana et al. (2003), Silva et al. (2010) e Melão et al. (2011), a predominância de mulheres pode ser explicada por conta de se preocuparem mais com o corpo e a estética do que os homens, e também pela maior procura das mulheres às unidades de saúde. Além disso, Sales et. al (2011) mostrou que o sexo do caso índice não é parâmetro que modula o risco de desenvolver a doença.

A associação encontrada entre os testes diagnósticos e a classificação operacional do caso índice pode ser influenciada por estarem expostos a uma maior carga bacilar. Quanto ao teste Mitsuda, verificou-se que a maioria dos contatos de multibacilares apresentou resultado positivo, o que pode ser associado ao bom prognóstico da doença caso venham a desenvolvê-la.

O ML-Flow tem se mostrado superior a baciloscopia por ser um teste de confiabilidade e reprodutibilidade. A soropositividade ao teste tem sido associada a faixa etária com 15 anos ou mais de idade, mais de cinco lesões cutâneas, mais de um nervo acometido e com baciloscopia positiva, sugerindo que possa ser utilizado para a correta classificação dos pacientes, assegurando a qualidade no tratamento e o controle da endemia (GROSSI, et al., 2008b).

O teste do fluxo lateral (ML-FLOW), é rápido, de fácil utilização, menos invasivo e mais barato, é um teste de sorodiagnóstico (KAI et al., 2008). A

sensibilidade demonstrada por esse teste é parecida com a do ELISA e por isso deveria ser amplamente utilizado para facilitar a classificação de pacientes nas formas clínicas e o diagnóstico precoce em contatos (BÜHRER-SÉKULA et al., 2003). É uma alternativa à sorologia por ELISA para auxiliar na classificação de pacientes em PB e MB e auxiliar na decisão terapêutica (CONTIN et al., 2011).

A forma clínica predominante neste estudo foi a tuberculóide (34,8%) na faixa etária menor de 15 anos. Goulart et al (2002) e Gomes et al (2005) também constataram a predominância desta mesma forma clínica, com 63,3% e 54,6% respectivamente. Estes dados condizem com o padrão apresentado no Brasil e também na Região nordeste, onde este grupo de instabilidade imunológica é o mais observado nas regiões endêmicas (ARAÚJO, 2003; BRASIL 2009).

Conforme enfatiza Duppre et al. (2012), um fator importante em relação à infecção da doença e a presença da vacina BCG, que não impede a infecção, porém, melhora a resposta imune do hospedeiro, agindo como um agente protetor.

Contatos que não possuem proteção correm um risco 3,7 vezes maior de desenvolver a hanseníase, sendo, portanto, recomendado uma segunda dose como reforço. Assim, faz-se necessária a localização dos contatos para serem examinados e submetidos à vacinação.

Dessunti et al. (2008) ressalta que em seu estudo obteve um percentual de 19,6% que receberam a primeira dose e a segunda dose 4,2%. Entretanto, não se pode afirmar que esses indivíduos não receberam a vacina BCG, mas fica evidente a falta de controle do serviço sobre estes dados. Assim como neste estudo em que a maioria (74,9%) tinha realizado a primeira dose da vacina BCG e estavam na faixa etária menor ou igual quinze anos e (53,8%) na faixa etária maior que 15 anos. Ramadasan et al. (2005) relata que em indivíduos vacinados com BCG observa-se uma redução de incidência de reações do tipo 2 e deformidades, mas não necessariamente a manifestação clínica da doença.

O número de cicatriz vacinal em relação aos índices de positividade nos exames realizados em contatos de pacientes com hanseníase foi possível observar que não houve diferença entre essas variáveis. Da mesma forma, outros autores usando o exame ML-FLOW em contatos observaram que não havia associação entre a soropositividade com o número de cicatrizes vacinais de BCG (DUPPRE et al .,2012).

Os resultados deste estudo referentes a PCR *swab* bucal, *swab* nasal, Mitsuda, Elisa e ML Flow relacionados ao gênero e idade não apresentaram relevância, exceto os teste de Elisa e ML Flow que foram relevantes quanto a idade (>15 anos).

Relacionando forma clínica e resultados de exames e testes percebeu-se predominância da forma clínica HT e positividade de 32,3% para o teste de Elisa indicando uma resposta do organismo contra o PGL1 presente na membrana do *M leprae*. Martinez et al., (2011) encontraram uma positividade semelhante (15,2%). Frota et al., (2010) refere o mesmo padrão de positividade em contatos no Estado do Ceará.

O diagnóstico precoce da hanseníase e a correta classificação são importantes instrumentos para assegurar a qualidade no tratamento do doente e o controle da epidemia interrompendo assim a cadeia de transmissão.

O fato de encontrar positividade no resultado da PCR de *swab* bucal e nasal (pela presença de DNA bacteriano nas mucosas) bem como presença de anticorpos e IgM anti-PGL1 (Elisa e MI-Flow) em contatos onde o exame dermatoneurológico foi normal, já justifica a importância de utilizar essas ferramentas como complementares para o exame clínico tradicional no intuito de detectar estágios iniciais de infecção.

A técnica de PCR vem sendo amplamente utilizada há décadas para detecção do DNA de *M leprae* em diferentes amostras teciduais e trouxe novas perspectivas para diagnóstico precoce da hanseníase (WILLIAMS; GILLIS, 1999).

6 CONCLUSÃO

No presente estudo, dos contatos de pacientes com hanseníase permite afirmar que houve predominância do gênero feminino, idade acima de 15 anos, contato intradomiciliar, uma única cicatriz de BCG e casos multibacilares.

- As técnicas moleculares são importantes ferramentas na identificação precoce da infecção de contatos assintomáticos;
- Ao realizar o exame PCR swab bucal a forma clínica de maior positividade encontrada foi a HT e classificação operacional foi MB, já o exame PCR swab nasal a maior positividade foi na forma clínica DV e a classificação operacional também MB;
- A forma clínica interfere nos resultados dos testes Mitsuda e ML-Flow e a classificação operacional é fator relevante para o resultado do teste de Mitsuda;
- Este estudo reforça a utilização de técnicas imunológicas e moleculares como ferramentas necessárias para diagnóstico precoce, controle e vigilância dos contatos como forma de interromper a cadeia de transmissão da hanseníase;
- É importante ressaltar que a variação entre os dados totais, dar-se devido alguns dados omitidos pelos contatos, bem como por fatores, inerentes ao programa, em que os mesmos não se sentiram obrigados a procederem sequencialmente às etapas estabelecidas pela pesquisa, redundando em alterações nos resultados frequências;

É importante também considerar como limitação encontrada nesse estudo, não liberação do trabalho, dificuldade de adesão dos contatos no comparecimento para avaliação periódica, dificuldade de apoio dos gestores estaduais e municipais, carência de profissionais sensibilizados com causa da hanseníase nos serviços de saúde.

REFERÊNCIAS

- Agresti AA. Survey of Exact Inference for Contingency Tables. *Statistical Science*.1992; 7(1) :131-53.
- Akama T, Tanigawa K, Kawashima A, Wu H, Ishii N, Suzuki K. Analysis of *Mycobacterium leprae* gene expression using DNA microarray. *Microb Pathog*. 2010 Oct;49(4):181-5.
- Alcaïs A, Mira M, Casanova JL, Schurr E, Abel L. Genetic dissection of immunity in leprosy. *Current Opinion in Immunology*. *Curr Opin Immunol*. 2005 Feb;17(1):44-8.
- Almeida EC, Martinez AN, Maniero VC, Sales AM, Duppre NC, Sarno, EN, et al. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA by polymerase chain reaction in the blood and nasal secretion of Brazilian household contacts. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004 Aug;99(5):509-12.
- Alter A, Grant A, Abel L, Alcaïs A, Schurr E. Leprosy as a genetic disease. *Mamm Genome*. 2011 Feb;22(1-2):19-31
- Alves CJ, Barreto JA, Fogagnolo L, Contin LA, Nassif PW. Avaliação do grau de incapacidade dos pacientes com diagnóstico de hanseníase no Serviço de Dermatologia do Estado de São Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010 Jul-Aug;43(4):460-1.
- Alves L, de Mendonça Lima L, da Silva Maeda E, Carvalho L, Holy J, Sarno EN, et al. *Mycobacterium leprae* infection of human Schwann cells depends on selective host kinases and pathogen-modulated endocytic pathways. *FEMS Microbiol Lett*. 2004 Sep 15;238(2):429-37.
- Andersson JO, Andersson SG. Insights into the evolutionary process of genome degradation. *Curr Opin Genet Dev*. 1999 Dec;9(6):664-71.

Andrade ARC, Grossi MAF, Buhner-Sékula S, Antunes CMF. Soroprevalência do teste ML-Flow em contatos de hanseníase de Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008; (41 Supl 2): 56-9.

Anvisa. Novo teste rápido pode detectar hanseníase antes dos sintomas: com exame, tratamento pode começar antes que a doença se manifeste na pele. Anvisa já concedeu licença para o uso do produto no Brasil [homepage na internet. São Paulo [atualizada em 2013 fev 21; acesso em 2013 mar 05]. Disponível em <http://g1.globo.com/bemestar/noticia/2013/02/novo-teste-rapido-pode-detectar-hanseniase-antes-dos-sintomas.html>.

Araújo MG. Hanseníase no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003; 3 (36):373-82.

Associação Internacional da Hanseníase (ILA). Report of the International Leprosy Association Technical Forum: epidemiology and control." *Leprosy Review.* 2002;73:46.

Astarie-Decqueker C, Passemar C, Nigou J, Guilhot C. The role of mycobacterial lipids in host pathogenesis *Discov Today.* 2010 7(1):33-41.

Bakker MI, Hatta M, Kwenang A, Van Mosseveld P, Faber WR, Klatser PR, et al. Risk factors for developing leprosy-a population-based cohort study in Indonesia. *Lepr Rev.* 2006 Mar;77(1):48-61.

Baptista IMFD, Sartori BCS, Trino LM. Guia de conduta para realização do exame baciloscópico. *Hansen Int.* 2006; 31(2): 39-41.

Barbieri CLA, Marques, HHS. Hanseníase em crianças e adolescentes: revisão bibliográfica e situação atual no Brasil. *Pediatria.* 2009; 4(31) 281-90.

Barreto JA, Carvalho CV, Cury Filho M, Garbinio JA, Nogueira MES, Soares CT. Hanseníase multibacilar com baciloscopia dos esfregaços negativa: a importância de se avaliar todos os critérios antes de definir a forma clínica. *Hansen Int.* 2007; 1(32): 75-9.

Beiguelman B. Genética e hanseníase. Cien Saude Colet. 2002; 7: 117-28.

Blackwell JM, Searle S, Goswami T, Miller EN. Understanding the multiple functions of Nrampl. Microbes Infect. 2000 Mar;2(3):317-21.

Blau S, Yagodin V. Osteoarchaeological Evidence for Leprosy from Western Central Asia. Am J Phys Anthropol. 2005 Feb;126(2):150-8.

Brasil.Lei n. 8.080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. Diário Oficial da União 19 set 1990.

Brasil. Lei n. 8.142, de 28 de dezembro de 1990b. Dispõe sobre a participação da comunidade na gestão do Sistema Único de Saúde (SUS) e sobre as transferências intergovernamentais de recursos financeiros na área da saúde e dá outras providências. Diário Oficial da União 31 dez 1990b;25.694 .

Brasil. Ministério da Saúde. Secretária e Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Guia para o controle da hanseníase.Brasília. Caderno de Atenção Básica.2002;10.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Controle da Hanseníase. Brasília; 2008a.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Epidemiológica, Secretaria de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de Controle da Hanseníase. Agregação de casos de hanseníase no Brasil. 2003-2005. Brasília; 2008b.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância e Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de Vigilância Epidemiológica. 7 ed. Brasília ; 2009.

Brasil. Ministério da Saúde. Portaria n. 3.125 de 7 de outubro de 2010. Aprova as Diretrizes para Vigilância, Atenção e Controle da Hanseníase. Brasília; 2010.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 8. ed. rev. – Brasília : Ministério da Saúde; 2010. 444 p. Il. – (Série B. Textos Básicos de Saúde)

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde Sistema de Informação de Agravos de Notificação- SINAN - NET. Hanseníase. Casos confirmados notificados no SINAN-NET; 2010.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema Nacional de Vigilância em Saúde: relatório de situação: Maranhão- 5. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

Brasil. Ministério da Saúde. Distribuição da Hanseníase no Brasil. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde; 2012.

Britton WJ, Lockwood DN.. Leprosy. Lancet. 2004 Apr 10;363(9416):1209-19.

Brosch R, Gordon SV, Eiglmeier K, Garnier T, Cole ST. Comparative genomics of the leprosy and tubercle bacilli. Res Microbiol. 2000 Mar;151(2):135-42.

Browne SG. Some aspect of the History of Leprosy: The Leprosy of Yesterday. Proc R Soc Med. 1975 Aug;68(8):485-93.

Bührer-Sékula S, Smits HL, Gussenhoven GC, van Leeuwen J, Amador S, Fujiwara T, et al. Simple and fast lateral flow test for classification of leprosy patients and identification of contacts with high risk of developing leprosy. J Clin Microbiol. 2003 May;41(5):1991-5.

Cellona RV, Walsh GP, Fajardo TT Jr, Abalos RM, dela Cruz EC, Guido-Villahermosa L, et al. Cross-sectional assessment of ELISA reactivity in leprosy patients, contacts, and normal population using the semisynthetic antigen natural disaccharide octyl bovine serum albumin (ND-O-BSA) in Cebu, The Philippines. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1993 Jun;61(2):192-8.

Chacha JJ, Sotto MN, Peters L, Lourenço S, Rivitti EA, Melnikov P. Sistema nervoso periférico e pressupostos da agressão neural na hanseníase. *An Bras Dermatol.* 2009 Sep-Oct;84(5):495-500.

Chiplunkar SV, Deshmukh MV, Samson PD, Butlin R, Bhatki WS, Chulawalla RG, et al. Natural killer cell mediated and antibody-dependent cellular cytotoxicity in leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1990 Jun;58(2):334-41.

Cho SN, Yanagihara DL, Hunter SW, Gelber RH, Brennan PJ. Serological specificity of phenolic glycolipid I from *Mycobacterium leprae* and use in serodiagnosis of leprosy. *Infect Immun.* 1983 Sep;41(3):1077-83.

Cho SN, Brennan PJ. New biological tools for leprosy surveillance. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1999 Dec;67(4 Suppl):S59-62.

Cole ST, Supply P, Honoré N. Repetitive sequences in *Mycobacterium leprae* and their impact on genome plasticity. *Lepr Rev.* 2001 Dec;72(4):449-61.

Contin LA, Alves CJ, Fogagnolo L, Nassif PW, Barreto JA, Lauris JR, et al. Use of the ML-FLOW test as a tool in classifying and treating leprosy. *An Bras Dermatol.* 2011 Jan-Feb;86(1):91-5.

Cooper AM, Adams LB, Dalton DK, Appelberg R, Ehlers S. IF- γ and NO in mycobacterial disease: new jobs for old hands. *Trends Microbiol.* 2002 May;10(5):221-6.

Danielsen DC, Boeck W. *Traité de la Spédalskdhed*. Paris: Chez. J.B. Bailliére; 1848.

Daumerie D. Current World Health Organization sponsored studies in the chemotherapy of leprosy. *Lepr Rev*. 2000 Dec;71 Suppl:S88-90.

Desikan KV. Viability of *Mycobacterium leprae* outside the human body. *Lepr Rev*. 1977 Dec;48(4):231-5.

Dessunti EM, Soubhia Z, Alves E, Aranda CM, Barro MPAA. Hanseníase: controle dos contatos nos municípios de Londrina-PR em período de dez anos. *Rev Bras Enferm*. 2008; 61 (esp): 689-93.

Donoghue HD, Marcsik A, Matheson C, Vernon K, Nuorala E, Molto JE, et al. Co-infecção of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium leprae* in human archaeological samples: a possible explanation for the historical decline of leprosy. *Proc Biol Sci*. 2005 Feb 22;272(1561):389-94.

Doull JA, Guinto RS, Rodriguez JN, Bancroft H. The incidence of leprosy in Cordova and Talisay, Cebu, Philippines. *Int J Lepr*.1942; 10: 107-31.

Duppre NC. Efetividade do BCG-ID em Comunicantes de Pacientes com as Formas Multibacilares de Hanseníase. [Tese de Doutorado- Programa de Pós- Graduação em Saúde Pública]. Rio de Janeiro; 2008.

Düppre NC, Camacho LA, Sales AM, Illarramendi X, Nery JA, Sampaio EP, et al. Impact of PGL-I seropositivity on the protective effect of BCG vaccination among leprosy contacts: a cohort study. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(6):e1711.

Eidt LM. Breve história da hanseníase: sua expansão do mundo para as Américas, o Brasil e o Rio Grande do Sul e sua trajetória na saúde pública brasileira. *Saude soc*. 2004 Mai /Ago ;13(2) .

Eiglmeier K, Simon S, Garnier T, Cole ST. The integridated genome map of *Mycobacterium leprae*. *Lepr Rev*. 2001 Dec;72(4):462-9.

Faget, GH, Pogge FA, Johansen JF, Dinan and CG, et al. The. promin treatment of leprosy. *Public Health Rep*. 1943; 58 (26); 1729-841.

Fine PE, Sterne JA, Pönnighaus JM, Bliss L, Sauti J, Chihana A, et al. Household and dwelling contact as risk factors for leprosy in northern Malawi. *Am J Epidemiol*. 1997 Jul 1;146(1):91-102.

Fine PE. Leprosy: what is being "eliminated". *Bull World Health Organ*. 2007 Jan;85(1):2.

Forno C, Häusermann P, Hatz C, Itin P, Blum J. The difficulty in diagnosis and treatment of leprosy. *J Travel Med*. 2010 Jul-Aug;17(4):281-3.

Foss NT. Aspectos imunológicos da hanseníase. . *Ribeirão Preto*. 1997;30(3): 335-9.

Frota CC, Freitas MV, Foss NT, Lima LN, Rodrigues LC, et al .Seropositivity to anti-phenolic glycolipid-I in leprosy cases, contacts and no known contacts of leprosy in an endemic and a non endemic area in northeast Brasil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2010 Jul; 104(7):490-5

Gelber RH, Iranmanesh A, Murray L, Siu P, Tsang M.. Activities of various quinolone antibiotics against *Mycobacterium leprae* in infected mice. *Antimicrob Agents Chemother*. 1992 Nov;36(11):2544-7.

Geluk A, Ottenhoff TH. HLA and leprosy in the pre and postgenomic eras. *Hum Immunol*. 2006 Jun;67(6):439-45.

Gillis TP, Williams DL. Polimerase chain reaction and leprosy .Int J Lepr Other Mycobact Dis. 1991 Jun;59(2):311-6.

Gillis TP, Krahenbuhl JL. Global elimination of leprosy. Rev Med Microbiology. 1998; 9(1): 39-48.

Gomes CCD, Pontes MAA, Gonçalves, HS, Penna, GO. Perfil clínico-epidemiológico dos acientes diagnosticados com hanseníase em um centro de referência na região nordeste do Brasil. An. Bras Dermatol.2005; 80(Supl 3): 73 -85.

Gomes FG, Frade, MAC, Foss NT, Úlceras. Cutâneas na hanseníase: perfil clínico-epidemiológico dos pacientes. An. Bras Dermatol.2007; 82(5):433-7.

Goulart IM, Bernardes S, Marques CR, Pimenta VL, Gonçalves MA, Goulart LR. Risk and Protective Factors for Leprosy Development Determined by Epidemiological Surveillance of Household Contacts. Clin Vaccine Immunol. 2008 Jan;15(1):101-5.

Goulart IM, Goulart LR. Leprosy: diagnostic and control challenges for a worldwide disease. Arch Dermatol Res. 2008 Jul;300(6):269-90

Goulart IM, Cardoso AM, Santos MS, Gonçalves MA, Pereira JE, Goulart LR. Detection of Mycobacterium leprae DNA in skin lesions of leprosy patients by PCR may be affected by amplicon size. Arch Dermatol Res. 2007 Aug;299(5-6):267-71.

Goulart IM, Penna GO, Cunha G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos de resposta imune do hospedeiro ao Mycobacterium Leprae. Rev Soc Bras Med Trop. 2002 Jul-Aug;35(4):365-75.

Goulart LR, Goulart IM. Leprosy pathogenetic background: a review and lessons from other mycobacterial diseases. *Arch Dermatol Res.* 2009 Feb;301(2):123-37.

Grossi MAF, Buhner- Sékula S , Andrade ARC, Antunes CMF. Soroprevalência do teste ML Flow em contatos de hanseníase de Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008a; 41: 56-9

_____. A influência do teste sorológico ML-Flow na classificação da hanseníase. 2008b; 41 (Suppl 2): 34-8.

Gulia A, Fried I, Massone C. New insights in the pathogenesis and genetics of leprosy. *F1000 Med Rep.* 2010 Apr 27;2.

Hashimoto K, Maeda Y, Kimura H, Suzuki K, Masuda A, Matsuoka M, et al. *Mycobacterium leprae* infection in monocytederived dendritic cells and its influence on antigen-presenting function. *Infect Immun.* 2002 Sep;70(9):5167-76.

Hett EC, Rubin EJ. Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2008 Mar;72(1):126-56

Hsieh NK, Chu CC, Lee NS, Lee HL, Lin M. Association of HLA-DRB1_0405 with resistance to multibacillary leprosy in Taiwanese. *Hum Immunol.* 2010 Jul;71(7):712-6.

Hulse EV. Leprosy and ancient Egypt. *Lancet.* 1972 Dec 2;2(7788):1203-4.

Ilangumaran S, Arni S, Poincelet M, Theler JM, Brennan PJ, et al. Integration of mycobacterial lipoarabinomannans into glycosylphosphatidylinositol-rich domains of lymphomonocytic cell plasma membranes. *J Immunol.* 1995 Aug 1;155(3):1334-42.

Imbiriba EB, Hurtado-Guerrero JC, Garnelo L, Levino A, Cunha MG, Pedrosa V. Perfil epidemiológico da hanseníase em menores de quinze anos de idade, Manaus (AM), 1998-2005. Rev Saúde Pública. 2008; 42(6): 1021-1026.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [homepage na internet]. População do município de São Luís. Censo populacional 2010 [acesso em 15 mai 2010] Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/população/censo2010/>.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [homepage na internet]. Metodologia das estimativas da população residente nos municípios brasileiros com data de referência em 1º de julho de 2012 [acesso em 25 agos 2012]. Disponível em: <http://saladeimprensa.ibge.gov.br/noticias?view=noticia&id=1&busca=1&idnoticia=2204>.

Jamieson SE, Miller EN, Black GF, Peacock CS, Cordell HJ, Howson JM, et al. Evidence for a cluster of genes on chromosome 17q11-q21 controlling susceptibility to tuberculosis and leprosy in Brazilians. Genes Immun. 2004 Jan;5(1):46-57.

Janeway CA. Imunobiologia: o sistema imunológico na saúde e na doença. 4ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2000.

Jardim MR, Antunes SL, Simons B, Wildenbeest JG, Nery JA, Illarramendi X, et al. Role of PGL-1 antibody detection in the diagnosis of pure neural leprosy. Lepr Rev. 2005 Sep;76(3):232-40.

Ji B, Jamet P, Perani EG, Sow S, Lienhardt C, Petinon C, et al. Bactericidal activity of single dose of clarithromycin plus minocycline, with or without ofloxacin, against *Mycobacterium Lepae* in patients. Antimicrob Agents Chemother. 1996 Sep;40(9):2137-41.

Jopling WH, Mc Dougall. A doença. In: Manual de hanseníase, 4ª ed. São Paulo: Atheneu; 1991:11-59.

Kai M, Heisenberg CP, Tada M. A esfingosina-1-fosfato regular comportamentos individuais de células subjacentes a migração dirigida de células progenitoras placa precordial durante a gastrulação peixe-zebra. *Development*.2008; 135 (18): 3043-305.

Katoch VM. Molecular techniques for leprosy: present applications and future perspectives. *Indian J Lepr*. 1999 Jan-Mar;71(1):45-59.

Kwiatkowska K, Sobota A. Signaling pathways in phagocytosis. *Bioessays*. 1999 May;21(5):422-31.

Lana FCF, Lanza FM, Velasquez- Melendez G, Branco AC, Teixeiras S, Malaquias LCC. Distribuição da hanseníase segundo sexo no município de Governador Valadares, Minas Gerais, Brasil. *Hansen International*.2003;28 (2):131-7.

Leite KKC, Costa JML, Barral A, Caldas AJM, Corrêa RGCF, Aquino DMC. Perfil Epidemiológico dos contatos de casos de hanseníase em área hiperendêmica na Amazônia do Maranhão. *Cad Saúde Colet* 2009; 17(1)235-49.

Likovsky J, Urbanova M, Hajek M, Cerny V, Cech P. Two cases of leprosy from Zatec(Bohemia), dated to the turn of the 12th century and confirmed by DNA analysis for *Mycobacterium leprae*. *J Archaeol Sci* .2006;33:1276-83.

Lindoso JA, Lindoso AA. Neglected tropical diseases in Brasil. *Rev Inst Med Trop*. 2009 Sep-Oct;51(5):247-53.

Lyon S, Grossi MAF. Hanseníase. Rio de Janeiro: MedBook; 2013. p. 57-9.

Maeda Y, Gidoh M, Ishii N, Mukai C, Makino M.. Assessment of cell mediated immunogenicity of *Mycobacterium leprae*-derived antigens. *Cell Immunol*. 2003 Mar;222(1):69-77.

Manchester K.. Tuberculosis and leprosy in antiquity: an interpretation. *Med Hist.* 1984 Apr;28(2):162-73.

Mariotti V, Dutour O, Belcastro MG, Facchini F, Brasili F. Probable early presence of leprosy in Europe in a Celtic skeleton of the 4th-3rd century BC. *Int. J. Osteoarch.* 2005; 15(5):311-25.

Marques MA, Mahapatra S, Sarno EN, Santos S, Spencer JS, Brennan PJ, et al. Further biochemical characterization of *Mycobacterium leprae* laminina binding proteins. *Braz J Med Biol Res.* 2001 Apr;34(4):463-70.

Martelli CMT, Stefani MMA, Penna GO, Andrade ALSS. Endemias e epidemias brasileiras, desafios e perspectivas de investigação científica: hanseníase. *Rev Bras Epidemiol.* 2002;(5) 3: 274-85.

Martinez TS. Presença do micoleaterium leprare na mucosa bucal. Identificação de uma potencial via de infecção e transmissão da hanseníase. [Mestrado em ciências da Saúde]. Minas Gerais : Universidade Federal de Uberlândia; 2010.

Martinez TS, Figueira MM, Costa AV, Gonçalves MA, Goulart LR, Goulart IM. M. Oral mucosa as a source of *Mycobacterium leprae* infection and transmission, and implications of bacterial DNA detection and the immunological status. *Clin Microbiol Infect.* 2011 Nov;17(11):1653-8

Martins AC, Miranda A, Oliveira ML, Bühner-Sékula S, Martinez A. Estudo da mucosa nasal de contatos de hanseníase, com positividade para o antígeno glicolipídico fenólico¹. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2010 Sep-Oct;76(5):579-87.

Matos HJ, Duppre N, Alvim MFS, Vieira LMM, Sarno Em, Struchiner CJ. Epidemiologia da hanseníase em coorte de contatos intradomiciliares no Rio de Janeiro (1987-1991). *Cad Saúde Publ* .1999; 15(3):533-42.

Matsuoka M. Drugs Resistance in leprosy. *Jpn J Infect Dis*. 2010 Jan;63(1):1-7.

Maurano F .Tratado de leprologia. Rio de Janeiro: Serviço Nacional de Lepra; 1944;1 – História da lepra no Brasil e sua distribuição geográfica.[acessoem 28 jul 2012]. Disponível em <[http:// bvsms.saude.gov.br/bvs/publicações/cd06 -15-1.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicações/cd06-15-1.pdf).>

Mehra NK. Role of HLA linked factors in governing susceptibility to leprosy and tuberculosis. *Trop Med Parasitol*. 1990 Sep;41(3):352-4.

Melão S, Blanco LFO, Mounzer N, Veronezi CCD, Simões PWTA. Perfil epidemiológico dos pacientes com hanseníase no extremo sul de Santa Catarina, no período de 2001 a 2007. *Rev Soc Bras Med Trop* 2011 jan/fev; 44(1): 79-84.

Mendonça VA, Costa RD, Melo GEBA, Antunes CM, Teixeira AL. Imunologia da hanseníase. *An Bras Dermatol*. 2008; 83:343-50.

Miller EN, Jamieson SE, Joberty C, Fakiola M, Hudson D, Peacock CS, et al. Genome-wide scans for leprosy and tuberculosis susceptibility genes in Brazilians. *Genes Immun*. 2004 Jan;5(1):63-7.

Mira MT, Alcaïs A, Van Thuc N, Thai VH, Huong NT, Ba NN, et al. Chromosome 6q25 is linked to susceptibility to leprosy in Vietnamese population. *Nat Genet*. 2003 Mar;33(3):412-5.

Mira MT, Alcaïs A, Nguyen VT, Moraes MO, Di Flumeri C, Vu HT, et al. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. *Nature*. 2004 Feb 12;427(6975):636-40.

Misch EA, Hawn TR. Toll-like receptor polymorphisms and susceptibility to human disease. *Clin Sci (Lond)*. 2008 Mar;114(5):347-60.

Misch EA, Macdonald M, Ranjit C, Sapkota BR, Wells RD, Siddiqui MR, et al. TLR1 deficiency is associated with impaired mycobacterial signaling and protection from leprosy reversal reaction. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008 May 7;2(5):231.

Mocellin S, Marincola F, Rossi CR, Nitti D, Lise M. The multifaceted relationship between IL-10 and adaptive immunity: putting together the pieces of a puzzle. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004 Feb;15(1):61-76.

Modlin RL, Bloom BR. Immune regulation: learning from leprosy. *Hosp Pract (Off Ed)*. 1993 Nov 15;28(11):71-4, 77-80, 83-4.

Modlin RL. The innate response in leprosy. *Curr Opin Immunol*. 2010 Feb;22(1):48-54.

Monot M, Honoré N, Garnier T, Araoz R, Coppée JY, Lacroix C, et al. On the origin of leprosy. *Science*. 2005 May 13;308(5724):1040-2.

Nakamura K, Akama T, Bang PD, Sekimura S, Tanigawa K, Wu H, et al. Detection of RNA expression from pseudogenes and non-coding genomic regions of *Mycobacterium leprae*. *Microb Pathog*. 2009 Sep;47(3):183-7.

Nath I, Vemuri N, Reddi AL, Bharadwaj M, Brooks P, Colston MJ, et al. Dysregulation of IL-4 expression in lepromatous leprosy patients with and without erythema nodosum leprosum. *Lepr Rev*. 2000 Dec;71 Suppl:S130-7.

Newport MJ, Huxley CM, Huston S, Hawrylowicz CM, Oostra BA, Williamson R, et al. A mutation in the interferon-gamma-receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. *N Engl J Med.* 1996 Dec 26;335(26):1941-9.

Ng V, Zanazzi G, Timpl R, Talts JF, Salzer JL, Brennan PJ, et al. Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. *Cell.* 2000 Oct 27;103(3):511-24.

Oliveira BFA, Ignotti E, Hartwig SV, Scatena JH, Andrade VLG. Acréscimo na detecção de casos de hanseníase como resultado da vigilância de comunicantes em 15 municípios considerados prioritários do estado do Mato Grosso, Brasil. *Rev Espaço Para a Saúde.* 2007; 8(2): 11-9.].

Opromolla DVA, editor. *Noções de hansenologia*. Bauru: Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato; 2000.

Penna GO. Hanseníase: Epidemiologia e Controle. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1994 out/dez ;(27 Supl 3):37-44.

Pessolani MC, Marques MA, Antonio VL, Sarno EN, Brenna PJ. Characterization of *Mycobacterium leprae* laminin binding proteins: A candidate adhesin involved in bacteria attachment to Schwann cells. In: *IV International Conference on the Pathogenesis of Mycobacterial Infections*, 130, Suécia; 1999.

Pessolani MC, Marques MA, Reddy VM, Loch C, Menozzi FD. Systemic dissemination in tuberculosis and leprosy: do mycobacterial adhesins play a role? *Microbes Infect.* 2003 Jun;5(7):677-84.

Pieters J, Gatfield J. Hijacking the host: survival of pathogenic mycobacteria inside macrophages. *Trends Microbiol.* 2002 Mar;10(3):142-6.

Pochmann M, Amorin R. Atlas da exclusão social no Brasil. São Paulo: Cortez; 2003.

Prasad PV, Kaviarasan PK. Leprosy therapy past and present: can we holpe eliminate it? Indian J Dermatol. 2010 Oct;55(4):316-24.

Prevedello FC, Mira MT. Hanseníase: uma doença genética? An Bras Dermatol.2007;5 (82): 451-9.

Ramadasan P, Das AL, Patra AK. Effects of BCG vaccination on evolution of leprosy, Medical Journal Forças Armadas da Índia. 2005; 1(61):26-8. Volume 61, Issue 1, p.26-28, 2005.

Ramasesh N, Adams LB, Franzblau SG, Krahenbuhl JL. Effects of activated macrophages on *Mycobacterium leprae*. Infect Immun. 1991 Sep;59(9):2864-9.

Rambukkana A, Burggraaf JD, Faber WR, Harboe M, Teeling P, Krieg S, et al. The major secreted antigen 85 complex possesses epitopes that are differentially expressed in human leprosy lesions and *Mycobacterium leprae* infected armadillo tissues. Infect Immun. 1993 May;61(5):1835-45.

Rambukkana A, Salzer JL, Yurchenco PD, Tuomanen EI. Neural targeting of *Mycobacterium leprae* mediated by the G domain of the laminin- α 2 chain. Cell. 1997 Mar 21;88(6):811-21.

Rambukkana A, Zanazzi G, Tapinos N, Salzer JL.. Contact-dependent demyelination by *Mycobacterium leprae* in the absence of immune cells. Science. 2002 May 3;296(5569):927-31.

Ranque B, Nguyen VT, Vu HT, Nguyen TH, Nguyen NB, Pham XK, et al. Age is a importante risk fator for onset and sequelae of reversal reactions in Vietnamese patients wih leprosy. Clin Infect Dis. 2007 Jan 1;44(1):33-40.

Raposo MT. Avaliação da implantação do programa do controle da hanseníase na rede básica de Aracajú. Sergipe. [Tese de Doutorado em Ciências] São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.

Ridley DS, Jopling WH. Classification of Leprosy According to Immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1966 Jul-Sep;34(3):255-73.

Robbins G, Tripathy VM, Misra VN, Mohanty RK, Shinde VS, Gray KM, et al. Ancient skeletal evidence for leprosy in India (2000 B.C.). *PLoS One.* 2009 May 27;4(5):5669.

Sales AM, Ponce de Leon A, Düppre NC, Hacker MA, Nery JA, Sarno EN, et al. Leprosy among Patient Contacts: A Multilevel Study of risk factors. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011 Mar 15;5(3):1013.

Sanches LA, Pittner E, Sanches HF, Monteiro MC. Detecção de casos novos de hanseníase no município de Prudentópolis, PR: uma análise de 1998 a 2005. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2007; 40(5): 541-5.

Sapkota YD, Sunuwar M, Naito T, Akura J, Adhikari HK. The prevalence of blindness and cataract surgery in rautahat district, Nepal. *Ophthalmic Epidemiol.* 2010 Mar;17(2):82-9.

Schlesinger LS, Horwitz MA. Phenolic glycolipid-1 of *Mycobacterium leprae* binds complement component C3 in serum and mediates phagocytosis by human monocytes. *J Exp Med.* 1991 Nov 1; 174(5):1031-8.

Schlesinger PH, Mattsson JP, Blair HC. Osteoclastic acid transport: mechanisms and implications for physiological and pharmacological regulation. *Miner Electrolyte Metab.* 1994;20(1-2):31-9.

Schröder O, Blumenstein I, Schulte-Bockholt A, Stein J. Combining infliximab and methotrexate in fistulizing Crohn's disease resistant or intolerant to azathioprine. *Aliment Pharmacol Ther.* 2004 Feb 1;19(3):295-301.

Schurr E, Alcaïs A, de Léséleuc L, Abel L. Genetic predisposition to leprosy: A major gene reveals novel pathways of immunity to *Mycobacterium leprae*. *Semin Immunol.* 2006 Dec;18(6):404-10.

Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev.* 2006 Apr;19(2):338-81.

Secretaria do Estado do Maranhão- SES- MA . Dados Epidemiológico e Operacionais do Programa de Controle da hanseníase segundo municípios do Maranhão; 2007.

Secretaria do Estado do Maranhão - SES-MA. Dados Epidemiológico e Operacionais do Programa de Controle da hanseníase segundo municípios do Maranhão; 2009.

Sharma N, Sharma VK, Gupta A, Kaur I, Ganguly NK. Immunological defect in leprosy patients: altered T-lymphocyte signals. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1999 Apr; 23(4):355-62.

Shaw MA, Donaldson IJ, Collins A, Peacock CS, Lins-Lainson Z, Shaw JJ, et al. Association and linkage of leprosy phenotypes with HLA class II and tumour necrosis factor genes. *Genes Immun.* 2001 Jun;2(4):196-204.

Shepard CC. Temperature optimum of *Mycobacterium leprae* in mice. *J Bacteriol.* 1965 Nov;90(5):1271-5.

Shimoji Y, Ng V, Matsumura K, Fischetti VA, Rambukkana A. A 21-kDa surface protein of *Mycobacterium leprae* binds peripheral nerve laminin-2 and mediates Schwann cell invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Aug 17; 96(17): 9857-62.

Shimura H, Hattori N, Kubo Si, Mizuno Y, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N, et al. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet.* 2000 Jul;25(3):302-5.

Siddiqui MR, Meisner S, Tosh K, Balakrishnan K, Ghei S, Fisher SE, et al. A major susceptibility locus for leprosy in India maps to chromosome 10p13. *Nat Genet.* 2001 Apr;27(4):439-41.

Sieling K, Gunther – Borstel O, Teebken T, Hanus H. Soil mineral N and N net mineralization during autumn and winter under an oilseed rape-winter wheat-winter barley rotation in different crop management systems. *Journal Agricultural Sci. Cambridge.* 1999; 132:127-7.

Sieling PA, Abrams JS, Yamamura M, Salgame P, Bloom BR, Rea TH, et al. Immunosuppressive roles for IL-10 and IL-4 in human infection. *J Immunol.* 1993 Jun 15;150(12):5501-10.

Silva AR, Santos ARR, Santos GMC, Silva VEB, Gonçalves EGR. Hanseníase no Município de Buriticupu, Estado do Maranhão: busca ativa de casos na população adulta. [acesso em: 15 jun. 2012] *Rev Soc Bras Med Trop.* 2012 Mar-Apr;45(2):199-202. <www.scielo.br/pdf/rsbmt/v40n6/a12v40n6.pdf>..

Silva CL, Faccioli LH, Foss NT. Suppression of human monocyte cytokine release by phenolic glycolipid-1 of *Mycobacterium leprae*. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1993 Mar;61(1):107-8.

Skinsnes OK. *Mycobacterium leprae* and its affinity for nerves. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1971 Jul-Sep;39(3):762-5.

_____. Leprosy in archaeologically recovered bamboo book in China. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1980 Sep;48(3):333.

Smith WW, Pei Z, Jiang H, Moore DJ, Liang Y, West AB, et al. . Leucinerich repeat kinase 2 (LRRK2) interacts with parkin, and mutante LRRK2 induces neuronal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Dec 20;102(51):18676-81

Spierings E, De Boer T, Zulianello L, Ottenhoff TH. Novel mechanisms in the immunopathogenesis of leprosy nerver damage: the role of Schwann cells, T cells and *Mycobacterium leprae*. *Immunol Cell Biol*. 2000 Aug;78(4):349-55.

Sreenivasan P, Misra RS, Wilfred D, Nath I . Lepromatous leprosy patients show T helper 1-like cytokine profile differential expression of interleukin-10 during type 1 and 2 reactions. *Immunology*. 1998 Dec;95(4):529-36.

SVS/MS. Sistema Nacional de Vigilância em Saúde: relatório de situação : Maranhão / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 5. ed. – Brasília: Ministério da Saúde; 2011.

Swindle EJ, Hunt JA, Coleman JW.. A comparison of reactive oxygen specimes generation by Rat Peritoneal Macrophages and Mast Cells Usin the Highly Sensitive Real-Time Chemiluminescent Probe Pholasin: Inhibition of Antigen-Induced Mast Cell degranulation by macrophage-derived hydrogen peroxide. *J Immunol*. 2002 Nov 15;169(10):5866-73.

Takiff HE, Salazar L, Guerrero C, Philipp W, Huang WM, Kreiswirth B, et al. Cloning and nucleotide sequence of *Mycobacterium tuberculosis gyrA* and *gyr B* genes and detection of quinolone resistance mutations. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994 Apr;38(4):773-80.

Tan EK, Puong KY, Chan DK, Yew K, Fook-Chong S, Shen H, et al. Impaired transcriptional upregulation of Parkin promoter variant under oxidative stress and proteasomal: clinical association. *Hum Genet*. 2005 Dec;118(3-4):484-8.

Tapinos N, Rambukkana A. Insights into regulation of human Schwann cell proliferation by Erk ½ via a MEK-independent and p56Lck-dependent pathway from leprosy bacilli. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jun 28;102(26):9188-93

Taylor GM, Widdison S, Brown IN, Young D: A mediaeval case of lepromatous leprosy from 13-14th century Orkney, Scotland. *J Archaeol Sci*. 2000, 27: 1133-8.

Ulric H, Smith PG, Sampson C, Zuniga M, Centeno M, Garcia V, et al. Anticorpos IgM para fenólica nativa glycolipid-1 em contatos de hanseníase em Venezuela: observações epidemiológicas e um estudo prospectivo sobre o risco de lepra. *Int J Lepr Outros Mycobact Dis*. 1991; 59: 405-15.

van Beers S, Hatta M, Klatser PR. Seroprevalence rates of antibodies to phenolic glycolipid-I among school children as an indicator of leprosy endemicity. *Int. J. Lepr*. N(67) p.243-249, 1999. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1999 Sep;67(3):243-9.

van Eden W, Gonzalez NM, de Vries RR, Convit J, van Rood JJ. HLA-linked control of predisposition to lepromatous leprosy. *J. Infect. J Infect Dis*. 1985 Jan;151(1):9-14.

Vieira CSCA, Soares MT, Ribeiro CSX, Silva LFG. Avaliação e controle de contatos faltosos de doentes com Hanseníase. *Brasília Rev Bras Enferm*. 2008;61(esp.):682-8.

Visca P, Fabozzi G, Milani M, Bolognesi M, Ascenzi P. Nitric oxide and *Mycobacterium leprae*, pathogenicity. *IUBMB Life*. 2002 Sep;54(3):95-9.

Weerdenburg EM, Peters PJ, van der Wel NN. How do mycobacteria activate CD8+ T cells? *Trends Microbiol*. *Trends Microbiol*. 2010 Jan;18(1):1-10.

World Health Organization – WHO. Global leprosy situation 2009. *Wkly Epidemiol Rec*. 2009. 84: 333-40.

World Health Organization- WHO. Global leprosy situation. Wkly Epidemiol Rec. 2010; 85: 337-48.

Williams DL, Gillis TP. Detection of drug-resistant *Mycobacterium leprae* using molecular methods. Indian J Lepr. 1999 Jan-Mar;71(1):137-53.

Wilkinson RJ, Lockwood DN. Antigenic trigger for type I reaction in leprosy. J Infect. 2005 Apr;50(3):242-3.

Yamamura M, Wang XH, Ohmen JD, Uyemura K, Rea TH, Bloom BR, et al. Cytokine patterns of immunologically mediated tissue damage. J Immunol. 1992 Aug 15;149(4):1470-5.

Yamanouchi AA, Caron CR, Shiwaku DT. Hanseníase e sociedade: um problema sempre atual. An Bra Dermatol. 1993; 6(68) 396-404.

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIAMENTO

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO BIOMÉDICO
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOPATOLOGIA CLÍNICA
E EXPERIMENTAL – FISCLINEX
CURSO DE DOUTORADO INTERINSTITUCIONAL (DINTER – UFMA/UERJ)**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIEMNTO

Titulo da pesquisa: Estudo de aspectos epidemiológicos, clínicos e imunológicos da hanseníase em município hiperendêmico.

Pesquisadora: Prof^a. Msc. Maria de Fátima Lires Paiva

Orientadora: Prof^a. Dr^a Marcia Maria Jardim Rodrigues

Co-orientador: Prof. Dr. Ivan Abreu Figueiredo

O objetivo desta pesquisa é determinar o que leva algumas pessoas a desenvolverem a doença hanseníase (MH). Estamos convidando você e a sua família para participarem deste estudo, porque vocês residem em uma região onde a MH é comum. Acompanharemos sua família através de visitas domiciliares e/ou consultas agendadas, nas unidades de saúde de referência, com o objetivo de identificar se alguém da família foi infectado pelo parasita que causa a hanseníase. Solicitaremos que vocês doem um pouco de sangue. Este sangue será usado para avaliar a resposta imune ao parasita que causa MH, realizaremos ainda coleta de material da mucosa nasal e oral para tentar identificar o parasita da MH. Se alguém apresentar algum sinal da doença será encaminhado ao centro de saúde de referência, onde realizaremos exames laboratoriais e tratamento, caso seja necessário.

PROCEDIMENTOS

1. Abaixo estão descritos os procedimentos a serem seguidos para aqueles que concordarem em participar do estudo:
2. Responder um questionário referente às condições de sua moradia e de sua saúde;
3. Realização de exame clínico dermatoneurológico, avaliação do grau de incapacidade no diagnóstico e na alta;
4. Realização da coleta do esfregaço dérmico para baciloscopia e biópsia de pele para exame histopatológico dos pacientes;
5. Faremos limpeza da superfície de flexão do antebraço direito, 4 cm abaixo da dobra antecubital, para realização nos pacientes e contatos de procedimento como: teste intradérmico de Mitsuda, o qual você deverá retornar com 28 dias para leitura da resposta do exame,
6. Será feito análise de cicatriz vacinal pelo BCG;
7. Coleta de swab nasal e swab bucal, esfregando-se algumas vezes gentilmente, sobre o cepto nasal e pela mucosa bucal com escovinhas flexíveis respectivamente;
8. Coleta de sangue periférico para pesquisa de DNA de *M. leprae* e testes sorológicos (ELISA anti-PGL1 e ML-Flow), faremos antisepsia com algodão embebido em álcool 70% seguida por punção da veia braquial com sistema BD e Vacutainer;

9. Revacinação, após o resultado do teste intradérmico de Mitsuda.

RISCOS

Os procedimentos a serem realizados têm risco mínimo. A realização do teste de Mitsuda deixará o local de aplicação vermelho, endurecido e dolorido.

Após revacinação com BCG haverá a formação de escantema (bolha vermelha), em seguida formação de pústula.

BENEFÍCIOS POTENCIAIS

Sua participação neste trabalho lhe proporcionará como benefício a possibilidade do diagnóstico da Hanseníase ainda em fase inicial, quando a doença não se manifestou ou assim que ela se manifeste por meio de marcadores imunológicos e moleculares aplicados a saúde pública visando o tratamento no tempo adequado, prevenindo as reações hansênicas e os danos neurais graves que podem levar ao estigma. Além disso, o estudo trará maior conhecimento da doença em questão.

TEMPO DE PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

A sua participação neste estudo será de um ano a contar do primeiro dia dos exames. Diante de qualquer sinal e/ou sintoma de hanseníase procure o serviço de saúde, onde será feito exames que comprovem o desenvolvimento da doença. Se o diagnóstico for positivo, você será encaminhado à um serviço de referência para tratamento e acompanhamento.

CONFIDENCIALIDADE DO ESTUDO

O registro da participação neste estudo será mantido confidencial. Nós guardaremos os registros de cada indivíduo, em sala trancada, e somente os profissionais trabalhando na equipe terão acesso a estas informações. Cada indivíduo receberá um número a ser utilizado no laboratório. Se qualquer relatório ou publicação resultar deste trabalho, a identificação do paciente não será revelada. Resultados serão relatados de forma sumarizada e o indivíduo não será identificado.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

Sua participação é **voluntária**. **Não há penalidade para caso decida não participar deste estudo**. Também não será penalizado se decidir desistir de participar do estudo, em qualquer época. O tratamento para hanseníase não será diferente caso você adoeça ou decida participar ou não desta pesquisa.

ESCLARECIMENTOS

Você pode fazer perguntas a respeito da pesquisa, sempre que você achar necessário. Se você quiser mais esclarecimentos a respeito da pesquisa ou se surgir alguma dúvida, entre em contato com a Prof^a. Msc. Maria de Fátima Lires Paiva, no Depo. De Saúde Pública da Universidade Federal do Maranhão – UFMA, pelo telefone (3221-

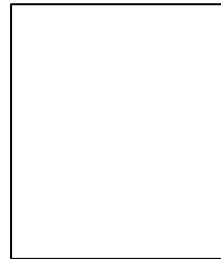
3380) ou Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário/UFMA, situado à Rua Barão de Itapary, nº 227, Centro ou pelo telefone (98) 2109-1223.

Nome da Pessoa (letra de forma): _____

Responsável

Testemunha

Impressão digital para aqueles
que não sabem escrever



COMPROMISSO DO INVESTIGADOR

Eu discuti as questões acima apresentadas com os indivíduos participantes no estudo ou com o seu representante legalmente autorizado. É minha opinião que o indivíduo entende os riscos, benefícios e obrigações relacionadas a esse projeto.

São Luís-MA, _____ de _____ de 200____.

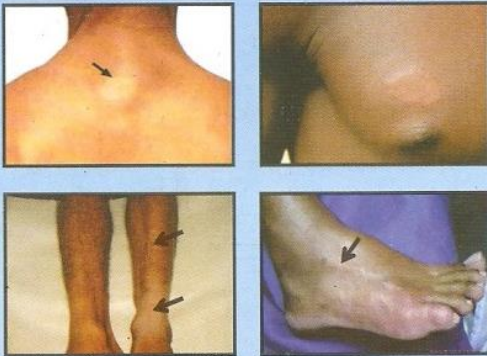
Assinatura do Pesquisador

APENDICE B – PANFLETO DA CAMPANHA

II Campanha de Prevenção da Hanseníase

06 a 10 de Junho de 2011

Local: Verifique o local de atendimento mais próximo de sua casa.



Atenção aos sinais e sintomas da hanseníase:

- Manchas brancas, avermelhadas ou caroços;
- Sensação de coceira e/ou de dormência;
- Dor em trajeto dos nervos das pernas e braços.

**HANSENÍASE TEM CURA!
PROCURE UM POSTO DE SAÚDE.
O TRATAMENTO É GRATUITO.**

DATA	Locais de Atendimento
06/06	USF Genésio Ramos Filho – COHAB
07/06	USF do Pirapora
08/06	USF Unidade I Drº Antonio Carlos Reis – Cidade Olímpica
09/06	USF Antônio Guanaré - Coroadinho
10/06	USF Centro de Saúde da Vila Embratel

Para mais informações disque:

ILA/ UFMA: 2109-1243
LabGeM/ UFMA: 3301-8543
Disque Saúde: 0800 61 1997

Realização:



Apoio:



Patrocínio:

- CNPQ/Ministério da Ciência e Tecnologia.
- DECIT/Ministério da Saúde.

APENDICE C – CHAMADA DA CAMPANHA

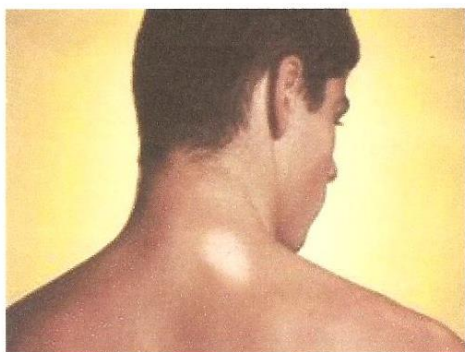
UFMA NOTÍCIAS

Imprimir esta pagina

28/04 - 12h35

2ª Campanha de Prevenção da Hanseníase no Estado contará com a participação da UFMA

Entre os dias 6 e 10 de junho, será realizada a 2ª Campanha de Prevenção da Hanseníase



O Estado do Maranhão é hiperendêmico em hanseníase, fazendo parte do principal agrupamento de casos do Brasil. Em dezembro de 2008, foi aprovado pelo CNPq o projeto de pesquisa "Aplicação de tecnologias moleculares, imunológicas e de geoprocessamento para a caracterização epidemiológica, diagnóstico e monitoramento da hanseníase em área hiperendêmica do Maranhão" sob a coordenação local da Profa Dra. Silma Regina Ferreira Pereira e sob a coordenação geral da Profa. Dra. Isabela Maria Bernardes Goulart, do Centro de Referência Nacional em Hanseníase e Dermatologia Sanitária, da Universidade Federal de Uberlândia (CREDESH/UFU), Minas Gerais.

Nesse projeto são aplicados testes moleculares e imunológicos para detecção de infecção subclínica e condição de portador sadio em contatos domiciliares de pacientes com hanseníase. Adicionalmente, está sendo realizado o georreferenciamento de todos os casos para produção de mapas de densidade dos casos de hanseníase e de contatos soropositivos e portadores sadios, por meio do sistema de informação geográfica (SIG). Essas análises epidemiológicas, utilizando ferramentas moleculares, clínicas e de geoprocessamento para o mapeamento dos principais focos de ocorrência de hanseníase, deverão identificar áreas de alto risco e permitirão que políticas de saúde pública sejam mais efetivas no controle desta doença hiperendêmica no Maranhão.

Em maio de 2010, foi realizada a "Campanha de Prevenção da Hanseníase em Contatos", na qual foram atendidos e coletados materiais biológicos de cerca de 300 contatos para realização de exames genéticos e sorológicos para detecção precoce da infecção.

Como previsto no projeto inicial, após um ano do primeiro exame de contatos, os mesmos deverão ser reavaliados e colhidos novos materiais para exames, bem como é necessário aumentar o número de contatos acompanhados de modo que os objetivos deste trabalho sejam alcançados.

Dessa forma, será realizada a 2ª Campanha de Prevenção da Hanseníase em Contatos que acontecerá de 06 a 10 de junho deste ano. A meta é atender cerca de 1000 pacientes e contatos familiares de hanseníase durante uma semana.

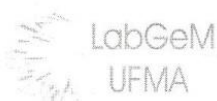
A fim de garantir que essa intervenção proposta possa impactar os coeficientes hiperendêmicos de hanseníase deste município, é essencial a participação das Secretarias Estadual e Municipal de Saúde, bem como da Coordenação Municipal da Estratégia Saúde da Família e das Equipes de Saúde da Família. Estarão também participando ativamente da campanha, professores e profissionais de saúde da Universidade Federal do Maranhão, profissionais de saúde do CREDESH/UFU, além de estudantes de graduação e pós-graduação.

Revisão de texto: Carla Morais

Lugar: Campus do Bacanga/SLZ

Fonte: Camila Carneiro/Ascom/UFMA

ANEXO B – PROTOCOLO DE ABORDAGEM E SEGUIMENTO



PROTOCOLO DE ABORDAGEM E SEGUIMENTO DE CONTATO EM HANSENÍASE – CÓD _____

DADOS GERAIS DO CONTATO		
Nome:		
Mãe:		
Data nascimento ____ / ____ / ____	Sexo: F <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/>	Data da abordagem ____ / ____ / ____
Endereço:		
		CEP
Ponto de referência:		
Município:	Fones:	

INFORMAÇÕES DO CASO ÍNDICE		
Caso índice:		CÓD:
Grau de Parentesco:	Tempo de exposição (meses):	Idade na abordagem:
Caso índice já foi tratado anteriormente: <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim, de ____ / ____ / ____ a ____ / ____ / ____ local		
Classificação Operacional	Tipo de contato	Forma clínica
<input type="checkbox"/> PB <input type="checkbox"/> MB	<input type="checkbox"/> Intradomiciliar <input type="checkbox"/> Intradomiciliar-intimo <input type="checkbox"/> Ocupacional <input type="checkbox"/> Extradomiciliar <input type="checkbox"/> Extradomiciliar-intimo <input type="checkbox"/> Ignorado	<input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> Ts <input type="checkbox"/> DT <input type="checkbox"/> DD <input type="checkbox"/> DV <input type="checkbox"/> Vsp <input type="checkbox"/> VV <input type="checkbox"/> TR <input type="checkbox"/> DTR <input type="checkbox"/> DDR <input type="checkbox"/> DVR <input type="checkbox"/> HNPT <input type="checkbox"/> HNPDT <input type="checkbox"/> HNPDD

PROCEDIMENTOS NA ABORDAGEM E ACOMPANHAMENTO		
Profilaxia BCG: <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2	Administração BCG: 1ª dose ____ / ____ / ____ 2ª dose ____ / ____ / ____	
1º Exame dermatoneurológico: <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim ____ / ____ / ____		
Observações:		
2º Exame dermatoneurológico: <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim ____ / ____ / ____		
Observações:		
3º Exame dermatoneurológico: <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim ____ / ____ / ____		
Observações:		
4º Exame dermatoneurológico: <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim ____ / ____ / ____		
Observações:		
5º Exame dermatoneurológico: <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim ____ / ____ / ____		
Observações:		
Mitsuda		
Abordagem <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim	Término <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim	
Administração ____ / ____ / ____	Leitura ____ / ____ / ____	
<input type="checkbox"/> Negativo ____ mm	<input type="checkbox"/> Negativo ____ mm	
<input type="checkbox"/> Positivo ____ mm	<input type="checkbox"/> Positivo ____ mm	
<input type="checkbox"/> Flutuante	<input type="checkbox"/> Flutuante	
<input type="checkbox"/> Ulcerado	<input type="checkbox"/> Ulcerado	
<input type="checkbox"/> Perdeu Leitura	<input type="checkbox"/> Perdeu Leitura	
<input type="checkbox"/> Uso de corticóide	<input type="checkbox"/> Uso de corticóide	

