

MAGALI CHAVES LUIZ

**PERFIL DE ALGUNS PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS
APÓS O TÉRMINO DA POLIQUIMIOTERAPIA
PARA HANSENÍASE.**

FLORIANÓPOLIS

2000

MAGALI CHAVES LUIZ

**PERFIL DE ALGUNS PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS
APÓS O TÉRMINO DA POLIQUIMIOTERAPIA
PARA HANSENÍASE.**

**Dissertação apresentada ao Curso de
Mestrado em Ciências Médicas do Centro
de Ciências da Saúde da Universidade
Federal de Santa Catarina para obtenção
do grau de Mestre em Ciência Médicas**

Coordenador: Mário Sérgio Soares de Azeredo Coutinho

Orientador: Edelson Flávio Morato

FLORIANÓPOLIS

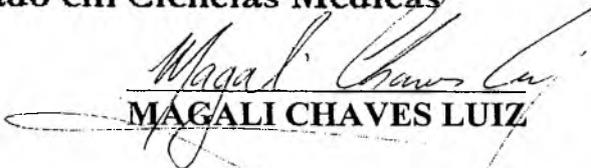
2000

**“Toda caminhada é de descoberta
A pé, nos damos tempo de ver as
coisas por inteiro”.**

Hal Borland

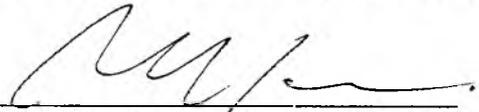


Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências da Saúde
Mestrado em Ciências Médicas

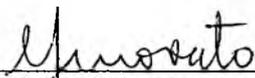

MAGALI CHAVES LUIZ

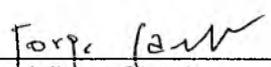
ESSA DISSERTAÇÃO FOI JULGADA ADEQUADA PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
MESTRE EM CIÊNCIAS MÉDICAS

COM ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CLÍNICA MÉDICA E APROVADA EM SUA
FORMA FINAL PELO PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

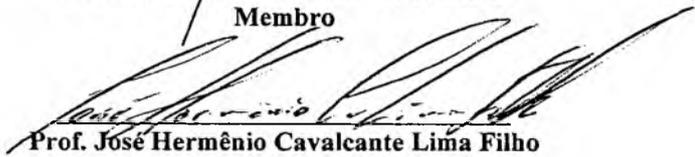

Prof. Mário Sérgio Soares de Azeredo Coutinho
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:


Prof. Edelson Flávio Morato
Orientador


Prof. Jorge Casseb
Membro


Profa. Heloisa Helena Ramos Fonseca
Membro


Prof. José Hermênio Cavalcante Lima Filho
Membro

Florianópolis, 29 de agosto de 2000.



AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Edelson Flávio Morato**, por sua preciosa orientação neste trabalho e pela amizade que permanecerá após seu término.

À **Dra. Heloísa Helena Ramos**, pelo incentivo, ajuda e sugestões no desenvolvimento deste trabalho. Além disso, obrigada por ter me ensinado um pouco do muito que sabe sobre a Hanseníase.

À **Samira Bühler**, pelo apoio e fornecimento das placas e fitas para pesquisa de Ac IgM anti PGL-1.

À **Enf. Rochele da Silva**, pela ajuda no encontro dos pacientes e na coleta das amostras. Obrigada por ser uma pessoa maravilhosa.

Aos bioquímicos **Márcia Volpato Siqueira e Miguel Strazzer Neto**, pela realização dos testes laboratoriais e pela paciência com a minha inexperiência com placas, pipetas, reagentes, etc...

A **Mair Chaves Luiz e Nilo José Luiz**, meus pais, pelo apoio e por me ensinarem os valores que hoje fazem parte da minha personalidade.

À amiga **Silvia Cristina Flôres** pelas palavras que precederam a realização deste trabalho. Obrigada pelo exemplo de força e dedicação que nunca esquecerei.

Ao amigo **Henrique Villela**, que enriqueceu este trabalho com a confecção dos mapas e pela amizade que nos aproxima um pouco mais todos os dias.

Ao **Centro de Produção de Imunobiológicos** da Secretaria de Saúde do Estado do Paraná pelo fornecimento da Mitsudina.

À **Dra. Maria de Lurdes Rovaris**, pela ajuda na realização das eletroforeses de proteína, quando achávamos que não conseguiríamos.

Aos integrantes do Programa de Controle da Hanseníase da Policlínica de Referência Regional: **Dr. Álvaro Thadeu Bender, Dr. Jorge José de Souza Filho, Enf. Marivone Muller Alves, Tec. Enf. Josina N. Flôres Gaidzinski e Assist. Social Zaida Luzia Maes**, pelo incentivo e colaboração na execução deste trabalho.

À **Enf. Denize N. Sousa**, pela ajuda na execução deste trabalho na cidade de Imbituba.

À **Tânia Regina Tavares Fernandes**, secretária do Curso de Mestrado em Ciências Médicas, pela ajuda e paciência.

Aos bioquímicos **Geraldo Laudelino Sena Filho e Sandro Luiz da Silva**, da cidade de Imbituba, que não hesitaram em colaborar e incentivar o estudo.

Aos integrantes das equipes de **Infectologia e Terapia Intensiva do Hospital Nereu Ramos**, pela compreensão e ajuda no cumprimento de minhas tarefas profissionais.

Aos meus Amigos: **Nicolau, Ricardo, Débora, Luciane, Danielle, Antonio, Ivete, Mariette, Joyce, Clacir, Heda e Concetta**, pois "amigo é alguém que te conhece a fundo e, apesar disto, te ama" – Humblat.

Agradeço em especial às pessoas que fizeram parte dos três grupos estudados:

Grupo 1 (Tratado): por terem compreendido os objetivos do estudo e por terem colaborado, mesmo com o medo de adoecerem novamente. Obrigada por me mostrarem mais um dos muitos lados que compõem o fantasma do preconceito.

Grupo 2 (em Tratamento): pela colaboração e pelo sentimento de solidariedade demonstrado.

Grupo 3 (Sadio): pelo entusiasmo.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas.....	vi
Lista de Quadros, Tabelas e Figuras	vii
Resumo	viii
Abstract	ix
Introdução.....	10
Objetivo	19
Método.....	20
Resultados	28
Discussão	46
Conclusão	56
Referências Bibliográficas	57
Anexos	64

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac	Anticorpo
Ag	Antígeno
BB	Lepra borderline
BL	Lepra borderline lepromatosa
BT	Lepra borderline tuberculóide
CRP	Proteína C reativa
DO	Densidade óptica
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ENL	Eritema nodoso lepromatoso
FTA-ABS	Fluorescent treponemal antibody absorption test
Grupo 1	Grupo Tratado
Grupo 1-MB	Grupo Tratado Multibacilar
Grupo 1-PB	Grupo Tratado Paucibacilar
Grupo 2	Grupo em Tratamento
Grupo 3	Grupo Sadio
HLA	Antígenos leucocitários humanos
IB	Índice baciloscópio
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IFN	Interferon
LL	Lepra lepromatosa
LB	Linfócito B
LT	Linfócito T
MB	Multibacilar
OMS	Organização Mundial da Saúde
PGL-1	Glicolípido fenólico
PB	Paucibacilar
PQT	Poliquimioterapia
RR	Reação reversa
Th	Linfócito T helper
TNF	Fator de necrose tumoral
TT	Lepra tuberculóide
VDRL	Veneral Disease Research Laboratory

LISTA DE QUADROS, TABELAS E FIGURAS

Quadro I – Previsão da eliminação da Hanseníase até o ano 2000 nos 24 países onde a doença ainda é problema de saúde pública.	15
Tabela I – Prevalência e taxa de detecção nos países de maior endemicidade de Hanseníase.....	16
Tabela II – Classificação clínica e histopatológica dos pacientes multibacilares.....	22
Tabela III – Dados clínicos dos grupos analisados.....	23
Tabela IV – Correlação entre os testes de ELISA e da fita (ML Dipstick) na pesquisa de Ac IgM anti PGL-1.....	34
Tabela V – Correlação entre a positividade dos testes de FTA-ABS e VDRL nas 62 amostras estudadas no Grupo Tratado.....	39
Figura 1 – Coeficientes de prevalência da Hanseníase no Brasil, 1985–2000.....	17
Figura 2 – Coeficientes de prevalência e incidência da Hanseníase em Santa Catarina, 1989– 1998.	17
Figura 3 – Número de observações conforme o tempo de término da PQT (anos) nos Grupos Tratado MB e PB.....	21
Figura 4 – Número de observações conforme o tempo de início da PQT (meses) no Grupo em Tratamento.....	23
Figura 5 – Primeira dosagem de Ac IgM anti PGL-1 nos grupos estudados.	30
Figura 6 – Segunda dosagem de Ac IgM anti PGL-1 nos grupos estudados.....	30
Figura 7 – Níveis de Ac IgM anti PGL-1 conforme tempo de término da PQT.	32
Figura 8 – Primeira dosagem de gamaglobulina nos 3 grupos estudados.....	36
Figura 9 – Segunda dosagem de gamaglobulina nos 3 grupos estudados.....	36
Figura 10 – Primeira dosagem de Neopterina nos 3 grupos estudados.....	42
Figura 11 – Segunda dosagem de Neopterina nos 3 grupos estudados.....	42
Figura 12 – Primeira dosagem de Proteína C Reativa nos 3 grupos estudados.	44
Figura 13 –Segunda dosagem de Proteína C Reativa nos 3 grupos estudados.	45

RESUMO

Objetivo: Avaliar o perfil imunológico, através de alguns parâmetros humorais e celulares, de indivíduos clinicamente curados da Hanseníase, anos após o término da poliquimioterapia (PQT).

População de estudo: Vinte e cinco pessoas que foram classificadas como formas multibacilares (MB), e sete paucibacilares (PB), que terminaram a PQT (Grupo 1). Foram critérios de exclusão, o uso de drogas imunossupressoras ou a presença de alguma forma reacional da doença no momento do estudo. Dois grupos controles foram formados, um positivo (Grupo 2) com onze pacientes com forma MB, em tratamento e um grupo negativo (Grupo 3), com dez pessoas saudáveis, não contatantes de pacientes com hanseníase.

Método: Na avaliação da resposta imune humoral (RIH) foram realizados: a- Detecção de anticorpos IgM contra o glicolípido fenólico (PGL-1) do *M. Leprae* por ELISA e pelo teste rápido de fita (dipstick); b- Dosagem de gamaglobulina, pela eletroforese de proteínas; c- Detecção de anticorpos anti-cardiolipina (VDRL) e teste treponêmico (FTA-ABS). O teste cutâneo com a lepromina foi realizado para avaliar a resposta imune celular (CMI), assim como a dosagem de Neopterina e Proteína C Reativa (CRP). Duas avaliações foram realizadas, uma antes e outra após, o teste cutâneo.

Resultados:

As RIH e CMI não foram alteradas pela PQT, mantendo-se a deficiência da CMI e excesso de RIH para o pólo Lepromatoso e o inverso no pólo Tuberculóide.

Não houve diferença significativa na média das densidade ópticas dos Ac IgM anti PGL-1, entre o grupo I e seu controle positivo. Da mesma forma, não houve dentro do grupo 1, diferença significativa quando analisados os níveis de anti-PGL-1 nos diferentes tempos de término da PQT. A concordância entre os testes de ELISA e teste de fita (dipstick) foi alta ($\kappa=0,96$). A gamaglobulina foi positiva em 24% e 21,7% das amostras no grupo tratado MB, na primeira e na segunda avaliação, respectivamente. No grupo tratado PB a positividade foi de 28,5% em ambas as avaliações.

Este estudo mostrou no grupo Tratado, 18% de FTA-ABS IgG, aparentemente falso positivo, e 6,1% de positividade para o teste de VDRL.

O teste da lepromina permaneceu negativo no grupo MB, com exceção de três indivíduos com forma Dimorfa que tornaram-se positivos. No grupo PB todos permaneceram positivos. A Neopterina e a CRP foram negativas em todos os grupos.

Conclusões :

Nos indivíduos tratados MB, o padrão de resposta imune não diferiu daquele encontrado no grupo controle positivo, independentemente do tempo de tratamento, mantendo assim, a suscetibilidade à doença.

Nos indivíduos do Grupo Tratado, classificados como MB (forma Dimorfa), houve uma reversão a favor da resposta celular, expressa pela reação de Mitsuda positiva, o que indica uma maior resistência à doença (recidiva ou re-infecção).

No Grupo Tratado PB (pólo Tuberculóide), foi observada a presença de uma boa resposta celular, o que indica uma maior resistência à doença (recidiva ou re-infecção).

É importante o acompanhamento clínico e laboratorial contínuo, principalmente dos indivíduos tratados que mantiverem um predomínio do padrão humoral de resposta imune.

ABSTRACT

Objective: To analyse, through humoral and cell-mediated immune (CMI) tests, the immunological profile of individuals who were considered clinically cured from Leprosy after undergoing multidrug therapy (MDT) years before this study was conducted.

Patients: Twenty-five people who finished MDT were classified as multibacillary (MB) Leprosy patients, and seven classified as paucibacillary (PB) Leprosy patients (Group 1). The use of immunosuppressive drugs and the presence of any reaction form of the disease were considered reasons for exclusion. Two control groups were formed: a positive control group (Group 2), with eleven MB patients, still in treatment with MDT; and a negative control group (Group 3), with ten healthy people who had no contact with leprosy patients.

Methods: In order to study the humoral response, antibodies IgM to phenolic glycolipid-I (PGL-1) of *M. leprae* were detected by ELISA and a simple dipstick tests; protein electrophoresis were performed in order to dose gamma globulin; anti cardiolipin antibodies (VDRL) and Treponemic tests (FTA-ABS) were measured. Lepromin test was performed to study the CMI response, as well as the measure of Neopterin and reactive C protein (CRP). Two analysis were conducted, one before and another after the skin test.

Results: The results showed that the humoral and CMI responses didn't change with the MDT, keeping the CMI deficiency from tuberculoid pole to lepromatous pole. There wasn't a significant difference in the average rate of Ac IgM anti PGL-1 DO between the Treated and the Positive group. The same was observed among patients with the different MDT end times in the Treated group. The agreement between ELISA and dipstick tests were high ($\kappa = 0,96$).

In the MB group, the blood samples showed 24% and 21,7% of positive gamma globulin in the first and second analysis, respectively. In the PB group there was a 28,5% of positivity in both analyses.

This study showed 18% of positive FTA-ABS IgG in the Treated group and observed positive VDRL tests in 6,1% of the blood samples. Lepromin test remained negative in MB group and positive in PB group. However, there were three subjects classified as Dimorf form whose skin tests turned positive after MDT. The entire PB group remained positive. Neopterin and CRP were negative in all groups.

Conclusion: Regardless of the length of the treatment, the immunological response pattern of the MB subjects did not differ from the pattern found in the positive control group, thus keeping the patients' susceptibility to the disease. On the other hand, three Dimorf subjects demonstrated a greater resistance to Leprosy.

The immunological response pattern of the PB subjects demonstrated resistance to the disease.

As a stronger humoral response determines the susceptibility to Leprosy, it would be necessary a longer clinical and laboratorial follow up of patients who demonstrated such response.

1- INTRODUÇÃO

O *Mycobacterium leprae* foi descoberto em 1873 por G.A. Hansen, sendo a primeira bactéria a ser identificada como causadora de uma doença humana, a Hanseníase.^{1,2} É um parasita intracelular obrigatório, tendo como alvo os macrófagos, as células endoteliais e as células de Schwann.¹ É caracterizado como bacilo Gram positivo, álcool-ácido resistente, que se cora em vermelho pelo Ziehl Neelsen e não é cultivável em meios artificiais. Apresenta multiplicação lenta, tendo período de incubação em média de 5 anos, podendo chegar até 20 anos em alguns casos.¹

A bactéria consiste de um núcleo espiralado, circundado por um citoplasma homogêneo e denso, membrana plasmática, fina parede celular e um envelope com camada lipídica.^{3,4} Os dois maiores lipopolissacarídeos da parede celular, arabinogalactana e lipoarabinomanana, são comuns a todas as micobactérias. A identificação de proteínas presentes na parede celular associadas ao envelope bacteriano tem sido estudada, e presumivelmente estas proteínas estariam envolvidas na patogenicidade do bacilo.^{4,5} A camada externa do envelope bacteriano é constituída por um glicolípido fenólico específico, denominado PGL – 1.^{3,4,5}

O PGL – 1 foi isolado em sua forma primitiva por Hunter e Brenner em 1981, e é encontrado em altas concentrações no soro e nos tecidos de pacientes multibacilares não tratados.⁶ Apresenta um único componente trissacarídeo, que é espécie-específico, e tem forte atividade imunogênica.^{6,7} Após a identificação de seu açúcar terminal como determinante antigênico, antígenos semi-sintéticos foram produzidos como formas naturais di ou trissacarídeos (ND ou NT) e conjugadas a uma proteína (soro albumina bovina – BSA) com anel octil (O) ou fenólico (P). Desta forma, quatro diferentes antígenos são obtidos (ND–O–BSA, NT–O–BSA, ND–P–BSA, NT–P–BSA). Todos apresentam antigenicidade semelhante, sendo pesquisados, em estudos sorológicos, através da técnica de enzima imuno ensaio (ELISA).^{6,7,8}

A Hanseníase é uma doença infecto-contagiosa de evolução insidiosa, com grande potencial incapacitante, conseqüente às lesões neurológicas periféricas, associadas ao

diagnóstico tardio.^{1,2} O homem é o reservatório com importância epidemiológica e, conseqüentemente, os doentes com baciloscopia positiva representam a principal fonte de infecção. A mucosa nasal tem sido considerada a principal porta de entrada do bacilo e, possivelmente, além dos doentes multibacilares, os carreadores nasais assintomáticos poderiam ser também responsáveis pela manutenção do bacilo circulante, em uma determinada comunidade.⁹ Rabello, no Brasil, introduziu o conceito de polarização das formas clínicas da doença. A Hanseníase indeterminada (I) precede a polarização espectral, evoluindo, quando não tratada, para as formas Tuberculóide ou Virchowiana (Lepromatosa).^{1,10} Em 1953, no Congresso de Leprologia realizado em Madri, foi acrescentado um novo grupo de pacientes à classificação de Rabello, denominado Borderline ou Dimorfo, que também evoluía a partir da forma indeterminada.¹ Em 1966, Ridley e Jopling, baseados em critérios clínicos, histopatológicos e imunológicos classificaram de forma espectral a Hanseníase.¹¹ Num extremo, encontra-se a forma Virchowiana ou Lepromatosa (LL), caracterizada pela fraca resposta imune celular frente aos antígenos do *Mycobacterium leprae*, e associada a uma intensa resposta humoral, podendo resultar em hipergamaglobulinemia.^{10,11} A diminuição seletiva da imunidade celular determina o crescimento e a disseminação tecidual da bactéria. É a forma contagiosa, com carga bacteriana elevada, mensurada no índice bacilosκόpico (IB)^{# 1,3,10,12,13,14} No outro pólo, situa-se a forma Tuberculóide (TT), caracterizada pela forte resposta celular e menor resposta humoral, determinando a forma localizada da doença, com maior comprometimento de nervos periféricos. Neste pólo o IB é zero e não há, comprovadamente, a transmissão da doença. Entre os extremos foram classificadas formas interpolares – Dimorfa ou Borderline (BB), Dimorfa Tuberculóide ou Borderline Tuberculóide (BT) e Dimorfa Lepromatosa ou Borderline Lepromatosa (BL), que apresentam-se instáveis imunologicamente, com características clínicas, bacterioscópias e histopatológicas variáveis, o que faz com que, ora se aproximem do pólo Virchowiano, ora do pólo Tuberculóide.^{1,3,10,12,13,14}

[#] IB : somatória do N° de cruzes encontrada nos esfregaços da baciloscopia, dividido pelo N° de áreas coletadas. É recomendado pelo menos quatro regiões diferentes de coleta. Locais mais frequentes: lesão cutânea, lóbulos auriculares, cotovelos e joelhos. Exemplo: 8 cruzes +, em 4 áreas de exame (IB=2)

Do ponto de vista operacional, visando ao tratamento com a poliquimioterapia, a OMS, em 1982, adotou uma classificação baseada na baciloscopia e no número de lesões^{2,14}:

- 1- Hanseníase paucibacilar (PB): baciloscopia negativa, com 5 ou menos lesões na pele.
- 2- Hanseníase multibacilar (MB): baciloscopia positiva, com 6 ou mais lesões na pele.

Assim, a Hanseníase, do ponto de vista imunológico, pode ser classificada em função dos achados dérmicos, das alterações sensoriais e motoras, e pelos resultados de biópsias, o que caracteriza a classificação de Ridley-Jopling. Mas, na maioria das situações, as formas PB e MB da OMS, além de serem mais simples, são geralmente equivalentes, respectivamente, às formas I, TT e BT, próximas do pólo Tuberculóide, e às formas BB, BL e LL, próximas do pólo Virchowiano.^{1,2,14}

A resposta imunológica exacerbada, frente à invasão do *M. leprae*, determina as chamadas formas reacionais. Ocorrem comumente nas primeiras fases da doença, durante o tratamento. Algumas vezes, as reações ocorrem após o término da PQT, ou como manifestação inicial da doença.^{12,13,14} Entre as formas reacionais, encontramos as reações reversas (RR), que estão associadas com um rápido aumento na resposta celular, levando à lesão de nervos periféricos, e expressando-se clinicamente como neurites. Por outro lado, a outra forma reacional, o eritema nodoso lepromatoso (ENL), ocorre por deposição de imunocomplexos, decorrentes do aumento de anticorpos circulantes.^{12,13}

Como o *M. leprae* é um patógeno intracelular, é a resposta imune do tipo celular quem confere proteção, determinando a susceptibilidade ou a resistência do hospedeiro frente ao bacilo.^{4,12,13} Abulafia e col. sugeriram que a resposta imune frente ao bacilo seria secundária às alterações metabólicas dos macrófagos.⁴ Assim, naqueles pacientes onde o teste cutâneo de hipersensibilidade tardia com lepromina (reação de Mitsuda) apresentasse resultado positivo, os bacilos, após serem fagocitados, seriam completamente lisados pelas fosfolipases lisossomiais. Nos pacientes com a reação de Mitsuda negativa, a destruição dos bacilos seria parcial, ficando vacúolos com fosfolipídeos bacilares (células de Virchow) e presença de microorganismos íntegros.⁴ Nos pacientes com as formas Dimorfas, seriam encontrados os dois tipos de macrófagos, correspondentes às reações de Mitsuda positiva e negativa.⁴

A sorologia utilizando a pesquisa de Ac IgM anti PGL – 1 tem sido amplamente estudada como um possível instrumento laboratorial para auxiliar no diagnóstico precoce da doença, e da doença subclínica em contatantes.^{3,15,16,17,18} Em geral, 90 a 100% dos pacientes no pólo Virchowiano têm altos níveis de anticorpos, enquanto que apenas 40 a 60% no pólo tuberculóide apresentam níveis detectáveis, comumente baixos.¹⁶ Portanto, o teste de ELISA para pesquisa do Ag PGL – 1, avaliando Ac da classe IgM, seria de utilidade no diagnóstico e no acompanhamento das formas multibacilares, porém de menor utilidade nas formas paucibacilares.^{4,16,19}

As pesquisas de Ac anti PGL – 1 da classe IgM têm apresentado valor na monitorização da eficácia da quimioterapia, pois foi demonstrado que o declínio das titulações corresponde à queda da carga bacilar.^{20,21,22,23}

A utilização de Ac anti PGL – 1 (IgM), como marcador prognóstico de formas reacionais, é ainda controversa. O envolvimento da classe IgM na formação dos imunocomplexos foi sugerido, em função da observação de queda nos títulos desses Ac, mesmo com IB elevado, na vigência de reação do tipo ENL.²³ No entanto, Stefani e col. em estudo mais recente demonstraram que indivíduos com a forma virchowiana, independentemente de forma reacional, apresentavam altos títulos de anticorpos específicos anti PGL – 1, questionando, desta forma, seu uso como marcador das formas reacionais.²⁴

A presença de Ac IgM anti PGL – 1 pode ser indicativo de infecção recente ou passada pelo *M. leprae*, o que dificulta sua utilização como rastreador de doentes. Porém, é sugerido por alguns autores que a alta prevalência de anticorpos em crianças poderia indicar transmissão ativa em seu meio.²⁵ Em pesquisa realizada com escolares na Indonésia, foi demonstrado que a soroprevalência de anticorpos contra PGL – 1 poderia ser utilizada como um indicador da prevalência real da Hanseníase, em uma área endêmica.²⁵

O desenvolvimento recente do teste de fita (dipstick) para a detecção de Ac contra o Ag PGL – 1 do *M. leprae* talvez seja um caminho para utilização da sorologia com este propósito, pois é rápido, facilmente realizado e barato²⁶.

Estudos recentes sobre o papel das outras classes de imunoglobulinas na resposta humoral frente ao *M. leprae* têm sido publicados. Beuria e col. encontraram queda nos níveis de IgG1, IgG2 e IgG3 durante a PQT e, nos casos avaliados, após o término do tratamento houve negação dos Ac anti PGL – 1 da subclasse IgG3.²⁷ Resultados

semelhantes foram encontrados por outros autores.^{28,29} Também a presença da subclasse IgA1 tem sido evidenciada no soro de pacientes, em alguns estudos.^{30,31} Apesar da possível participação de diferentes classes de imunoglobulinas, ocorre nítido predomínio da classe IgM frente ao Ag PGL – 1, sendo esta, portanto, a pesquisa mais utilizada nos testes sorológicos.^{27,28,30}

A presença de auto-anticorpos é comum, principalmente na forma Virchowiana da Hanseníase.¹² Níveis elevados de Fator Reumatóide, presença de anticorpos antinucleares, anticardiolipina, e a ocorrência de hipergamaglobulinemia policlonal têm sido relatados na literatura.^{32,33,34,35,36}

O deslocamento do pólo Tuberculóide para o Virchowiano é caracterizado pelo declínio progressivo da hipersensibilidade tardia frente aos antígenos do *M. leprae*. A avaliação da resposta imunológica tem sido efetuada através da reação de Mitsuda, que consiste na inoculação intradérmica de suspensão de bacilos mortos pelo calor, cuja leitura é feita 4 semanas após, resultando em pápula infiltrada ou ausência de alteração cutânea. A susceptibilidade à doença está associada ao fluxo bacilar (medido pelo índice baciloscópico) e à ausência de resposta imune (reação de Mitsuda negativa), enquanto que a resistência está diretamente relacionada à hiper-reatividade imunológica (reação de Mitsuda positiva) e à ausência de bacilos nas lesões. Nas formas Dimorfas podem ocorrer equilíbrio entre estes dois fatores.^{10,12,17}

A neopterinina é uma pteridina de baixo peso molecular produzida por macrófagos ativados pelo interferon gama (IFN- γ), e tem sido utilizada, em algumas situações, como marcador de atividade da imunidade celular.³⁷ As aplicações clínicas mais importantes são: como indicador de prognóstico nas doenças neoplásicas; no acompanhamento de algumas doenças infecciosas crônicas; na monitorização de terapia imunoestimulatória; no diagnóstico diferencial de doenças virais e bacterianas; como marcador prognóstico na infecção pelo HIV e como marcador precoce de rejeição em transplantes.³⁷ Alguns estudos sugerem a aplicabilidade da dosagem de neopterinina como marcador para o acompanhamento da Hanseníase durante o tratamento e como indicativo de estados reacionais.^{38,39}

Em novembro de 1999 a OMS, associada à Nippon Foundation, Novartis e International Federation of the Anti Leprosy Associations, na presença de representantes dos países onde a Hanseníase é endêmica, anunciaram a formação da Aliança Global para Eliminação da Hanseníase como problema de Saúde Pública até o ano de 2005. Eliminar significa alcançar taxas de prevalência menores que um caso para cada 10.000 habitantes.⁴⁰

Atualmente, a Hanseníase permanece como problema de saúde pública em 24 países, sendo que 12 alcançarão a meta da OMS ainda no ano 2000.⁴⁰ O Brasil encontra-se entre os 12 países onde será necessário intensificar a atuação dos programas de controle da doença, pois o mesmo ocupa o segundo lugar em número de casos (Quadro I e Tabela I).

Quadro I – Previsão da eliminação da Hanseníase até o ano 2000 nos 24 países onde a doença ainda é problema de saúde pública

Países que eliminarão a Hanseníase como problema de saúde pública ainda no ano 2000:

Camarões, Chade, Congo, Costa do Marfim, Etiópia, Gabão, Gâmbia, Guiné-Bissau, Mali, Nova Guiné, Paraguai e Serra Leoa.

Países que não eliminarão a Hanseníase como problema de saúde pública ainda no ano 2000*:

Angola, Brasil, República Centro-Africana, República Democrática do Congo, Índia, Indonésia, Guiné, Madagascar, Moçambique, Myanmar, Nepal e Nigéria.

* Juntos representaram 90% da prevalência mundial em 1999

OMS – 1999

Apesar de a Hanseníase ser uma doença milenar, somente nos anos 40 do século XX, com a descoberta da dapsona, é que se iniciou o controle da infecção.¹ Porém, pelo desenvolvimento elevado de resistência bacteriana, alto índice de recidivas e longos períodos de tratamento, chegando em muitos casos a ser por toda a vida, se fez necessário mudar a estratégia terapêutica.^{1,2} Assim, aproximadamente 20 anos após a descoberta da rifampicina e da clofazimina, ou seja, em 1981, a OMS recomendou o uso da poliquimioterapia com a dapsona, clofazimina e rifampicina (PQT) para o tratamento da Hanseníase.^{1,2,40,41} A partir da implantação da PQT, houve uma queda expressiva na

prevalência da doença. Os casos registrados no mundo caíram de 5,4 milhões, em 1985, para menos de 1 milhão em 1999. Apesar de a taxa de prevalência mundial estar atualmente em 1,4 /10.000, quando analisados os países de maior endemicidade a taxa passa a ser de 4,5/10.000, demonstrando a necessidade de esforços maiores para o controle da endemia (Tabela I).⁴⁰

Tabela I – Prevalência e taxa de detecção nos países de maior endemicidade de Hanseníase – 1999

Países	Número de casos em registro ativo –1999	Prevalência Por 10.000	Número de casos novos – 1998	Detecção por 10.000
Índia	577.200	5,9	634.901	64,3
Brasil	72.953	4,3	43.933	25,9
Indonésia	23.378	1,1	18.367	8,9
Myanmar	11.906	2,4	14.357	29,0
Madagascar	12.989	8,0	8.957	55,2
Nepal	8.446	3,6	6.570	27,8
Etiópia	7.764	1,3	4.457	7,4
Moçambique	5.861	3,3	3.764	21,1
República D. Congo	4.863	1,0	3.781	7,9
Nigéria	2.885	2,9	2.549	25,2
Guiné	2.399	3,3	3.684	50,3
Camboja	1.921	1,7	2.438	22
Total	734.853	4,5	751.440	46,4

OMS – setembro 1999

Em 1999, a cobertura com a PQT chegou a 97% no Brasil, mostrando um aumento significativo, se comparada com a taxa de 36% em 1985. Houve queda expressiva neste período nas taxas de prevalência da doença (Figura 1).⁴²

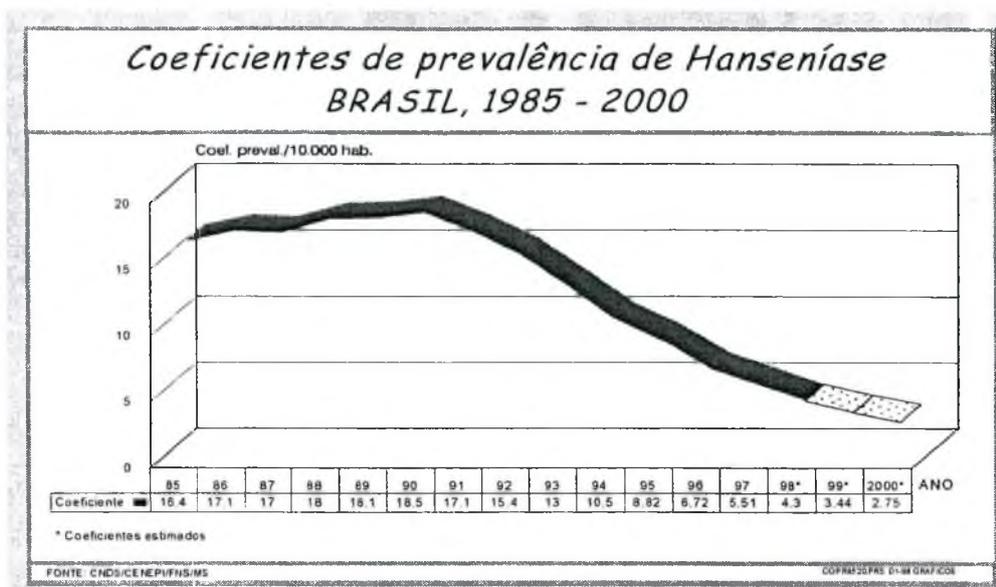


Figura 1 – Coeficientes de prevalência da Hanseníase no Brasil, 1985 – 2000

Os Estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul foram os únicos a alcançarem, antes do ano 2000, a meta da OMS. Atualmente, Santa Catarina é considerada região de baixa endemicidade, com prevalência de 0,9 (Anexo 1).^{42,43}

Apesar da queda na prevalência em Santa Catarina, a taxa de detecção teve comportamento linear, com discreta tendência de queda. O número de casos novos manteve-se estável, com o predomínio de multibacilares (Figura 2).⁴³

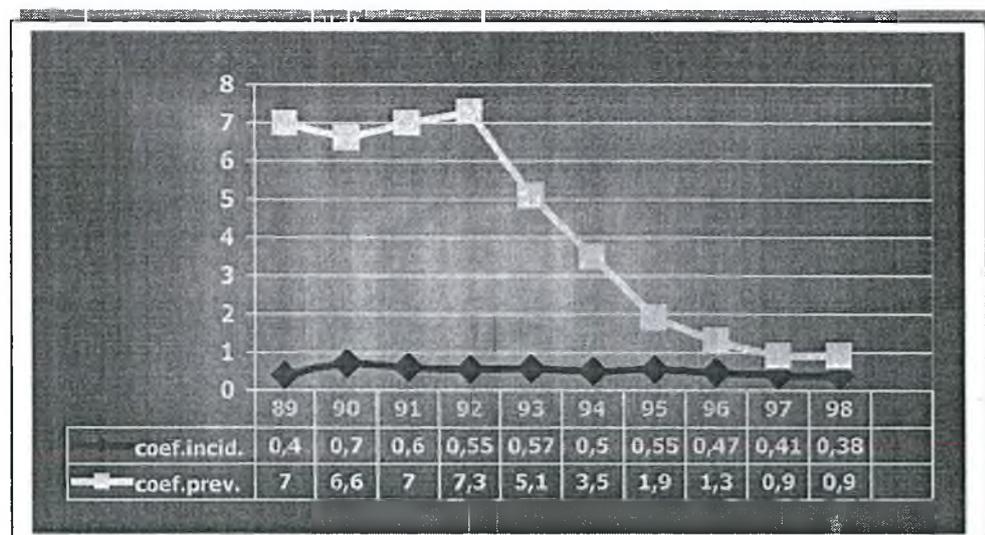


Figura 2 - Coeficientes de prevalência e incidência da Hanseníase em Santa Catarina, 1989-1998

Baseado nos aspectos fisiopatológicos e epidemiológicos da doença, e na escassez de trabalhos na literatura avaliando marcadores imunológicos em pacientes portadores de Hanseníase, após o final da PQT, este estudo propôs-se a avaliar alguns parâmetros das respostas imunes humoral e celular neste grupo de indivíduos, uma vez que os mesmos são considerados curados clinicamente, após o término do tratamento. Assim, os parâmetros utilizados na avaliação da resposta imune humoral, incluíram a pesquisa de Ac IgM anti PGL – 1, a eletroforese de proteínas séricas, a pesquisa de Ac anti treponêmicos (FTA-ABS) ou não treponêmicos (cardiolipina); e na avaliação da resposta imune celular, o teste de lepromina, e as dosagens séricas da Neopterinina e da Proteína C Reativa.

OBJETIVO

O presente trabalho teve por objetivo avaliar alguns parâmetros humorais e celulares, de indivíduos clinicamente curados da Hanseníase, anos após o término da poliquimioterapia.

MÉTODO

POPULAÇÃO DE ESTUDO

A seleção da população de estudo foi realizada através de dados coletados na Unidade de Documentação e Informática da Secretaria de Estado da Saúde de Santa Catarina. A partir do sistema de controle da Hanseníase, foi feita uma listagem dos pacientes diagnosticados na 18ª regional de Saúde (Grande Florianópolis) e na 14ª Regional de Saúde, no município de Imbituba, e que haviam iniciado o tratamento a partir de 1993.

Foram selecionadas 81 pessoas que receberam alta por cura, sendo 53 delas classificadas como portadoras da forma multibacilar e 28 da forma paucibacilar e que, após o término do tratamento com a poliquimioterapia preconizada pelo Ministério da Saúde*, foram retiradas do registro ativo da doença.

Foram considerados critérios de exclusão: a vigência de tratamento com medicações imunossupressoras, associadas à presença de formas reacionais, no período do estudo (7 pacientes); o uso de corticosteróide, não relacionado à doença (3 pessoas). O tamanho da amostra foi também limitado pela dificuldade em se localizar as pessoas selecionadas, por mudança para endereço desconhecido (8 indivíduos); pela dificuldade de contato ou acesso ao local de endereço (10 indivíduos); e por óbito (1 indivíduo); além de 20 pessoas que não consentiram em participar do estudo.

Assim, foram estudadas 32 pessoas distribuídas em 4 municípios (Mapa 1 – Anexo 2): 14 em Florianópolis (Mapa 2 – Anexo 3), 2 em São José (Mapa 3 – Anexo 4), 5 na Palhoça, (Mapa 4 – Anexo 5) e 11 em Imbituba (Mapa 5 – Anexo 6), sendo que os três primeiros pertencem à região da Grande Florianópolis. Estes indivíduos corresponderam ao Grupo Tratado (Grupo 1).

* PQT – **Dosagem para MB:** dose diária com Clofazimina 50mg e Dapsona 100mg e 24 doses mensais supervisionadas com Rifampicina 600mg, Clofazimina 300mg e Dapsona 100mg. **Dosagem para PB:** dose diária com Dapsona 100mg e 6 doses mensais supervisionadas com Rifampicina 600mg, e Dapsona 100mg.

Os prontuários destes indivíduos foram analisados para coleta de dados referentes à classificação clínica e histopatológica da Hanseníase, ao resultado do teste da lepromina e índice baciloscópico, antes do início do tratamento, e ao desenvolvimento de formas reacionais, antes, durante, ou após a PQT (Anexo 7).

Foram utilizados como grupos controles: a) 11 pacientes MB, em vigência de tratamento (Grupo 2), e b) 10 indivíduos saudáveis (Grupo 3), não contactantes de Hansenianos.

GRUPO 1

Este grupo de 32 pessoas, de acordo com a classificação e com o tempo de término da PQT, apresentou a seguinte distribuição: 6 MB com término 1 ano antes do estudo; cinco MB e um PB terminaram a PQT dois anos antes do estudo; 14 pessoas classificadas como multibacilares (MB) e 3 como paucibacilares (PB) haviam terminado a PQT 3 anos antes deste estudo; 2 PB com término 4 anos antes do estudo; e 1 PB com término 5 anos antes do estudo (Figura 3).

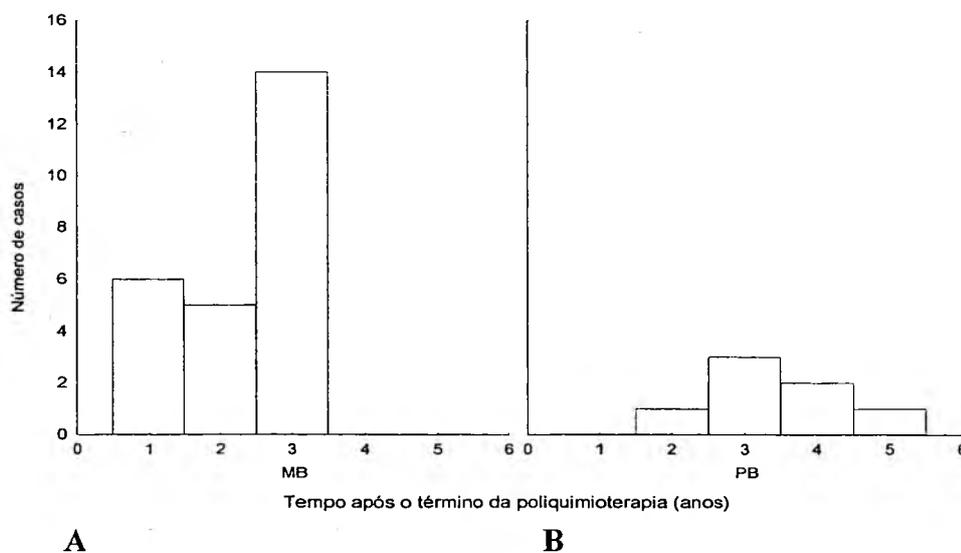


Figura 3 – Número de observações conforme o tempo de término da PQT (anos) no grupo 1-MB (A) e no grupo 1-PB (B).

Dos 25 pacientes multibacilares, 13 receberam diagnósticos histopatológico e clínico de forma Virchowiana, 7 de forma Dimorfa e 5 o diagnóstico histopatológico de pólo Virchowiana, porém com classificação clínica de forma Dimorfa (Tabela II).

Tabela II : Classificação Clínica e Histopatológica dos pacientes Multibacilares

	Classificação Clínica	Classificação Histológica
Virchowiana	13	18
Dimorfa	12	7
Total	25	25

Dos 7 pacientes paucibacilares, 3 receberam classificação clínica e histológica de forma Indeterminada e 4 de forma Tuberculóide.

14 eram do sexo feminino (43,75%) e 18 do masculino (56,25%), com média de idade de 43 anos (Tabela III).

GRUPO 2

Neste grupo constituído de onze pacientes, selecionados aleatoriamente no Ambulatório de Hanseníase do Hospital Universitário (H. U.) da UFSC, 7 foram classificados clínica e histologicamente como pertencentes ao pólo Virchowiano e 4 à forma Dimorfa. Nenhum apresentava forma reacional. O tempo de início da PQT variou de 0, ou seja, iniciando o tratamento, a 12 meses (Figura 4); 7 eram do sexo masculino e 4 do feminino, com média de idade de 40 anos (Tabela III).

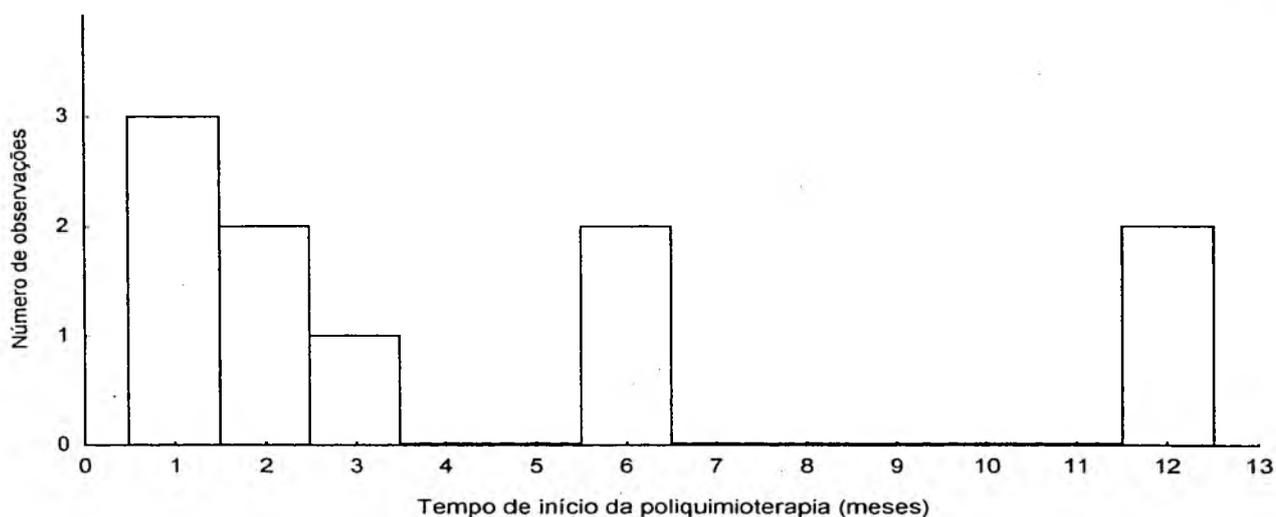


Figura 4 – Número de observações conforme o tempo de início da PQT (meses) no Grupo 2

GRUPO 3

Era constituído de 10 indivíduos saudáveis, escolhidos aleatoriamente entre os funcionários do Setor de Emergência do H. U. da UFSC não contatantes de pacientes portadores de Hanseníase; 9 pertenciam ao sexo feminino e 1 ao masculino, com idade média de 34 anos (Tabela III).

Tabela III – Dados Clínicos dos Grupos Analisados

Grupo	Média de Idade (anos)	Sexo		Classificação	
		M	F	MB	PB
1 (n=32)	43	18	14	25	7
2 (n=11)	40	7	4	11	-
3 (n=10)	34	1	9	-	-

Nos três grupos os parâmetros das respostas imunes humoral e celular estudados, foram avaliados antes (1ª avaliação) e 4 semanas após (2ª avaliação) a estimulação imune celular, através do teste cutâneo da lepromina. As amostras de sangue utilizadas para as dosagens da segunda avaliação foram obtidas quando da leitura da hipersensibilidade tardia.

1. Resposta humoral:

Testes sorológicos:

Foram pesquisados Ac IgM anti PGL – 1 pela técnica de ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) em placa, e pelo teste rápido de fita (ML[®] Dipstick), cedidos pela pesquisadora Samira Bühner, do Royal Tropical Institute (KIT), Amsterdam, Holanda.

As placas de ELISA foram cobertas com antígeno dissacarídeo ligado à proteína bovina (ND–O–BSA). A técnica utilizada foi a preconizada pelo KIT (Anexo 8). Valores de densidades ópticas (D.O) superiores a 0,200 foram considerados positivos. Antes da dosagem das amostras, avaliamos o método, através de diferentes controles, cujas leituras haviam sido efetuadas na Holanda. Os resultados obtidos foram praticamente idênticos àqueles encontrados pelo KIT.

O ML Dipstick é um teste de fita idealizado para detecção de anticorpos IgM específicos ao epítipo imunodominante 3,6-di-O-dimetil-glicopiranosil do componente trissacarídeo do antígeno glicolipídico fenólico (PGL – 1) do *M. leprae*. Para isto é utilizado como antígeno um análogo semi-sintético composto do penúltimo e último resíduos de açúcares do PGL – 1, ligados à albumina bovina, como proteína carreadora.

A fita é composta de duas tiras de nitrocelulose. A tira inferior é embebida com o antígeno (PGL – 1) e a superior com anticorpo anti PGL – 1 humano. A tira superior serve como controle interno do teste. O teste é realizado diluindo soro 1:50 em reagente detector, composto de um anticorpo policlonal anti IgM humano, conjugado a um corante (palanil) e incubando o dipstick nesta solução por três horas. Após a incubação, as fitas são lavadas e a leitura é feita. O aparecimento de cor na banda inferior é indicativo de um teste positivo. A banda superior deve sempre apresentar coloração, pois verifica a integridade dos componentes (Anexo 9).

Para avaliação da presença de auto-anticorpos foi realizado o teste de pesquisa de Ac anticardiolipina, através do método do Veneral Disease Research Laboratory (VDRL). O teste do VDRL foi efetuado em placa de Kline, segundo a técnica descrita no kit da Biolab–Mérieux (Anexo 10). Além disso, foi também realizado o teste antitreponêmico (FTA-ABS). A pesquisa de Ac anti treponêmicos foi realizada através de

imunofluorescência indireta, utilizando o kit do laboratório BIOLAB (Imunopallidum ®), com leitura em um microscópio de fluorescência, com epiluminação da Nikon (Anexo 11).

Com a finalidade de avaliar as alterações nos níveis de gamaglobulina foi realizada eletroforese de proteínas em todas as amostras coletadas. A técnica utilizada encontra-se no Anexo 12. Leituras da fração gama, com valores inferiores a 1,6 g/100ml, foram consideradas normais.⁴⁴

1. Resposta celular:

Teste de Mitsuda:

A Imunidade celular foi avaliada através do teste intradérmico de Mitsuda (Iepromina). A Mitsudina foi fornecida pela Secretaria da Saúde do Estado do Paraná, através do Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos.

O Ag para a intradermorreação de Mitsuda contém uma suspensão de *M. leprae*, em solução salina fisiológica fenolada a 0,5%, autoclavada. Cada frasco contém 1ml de Mitsudina padronizada com 40.000.000 de *M. leprae*/ml . O teste foi realizado através da inoculação de 0,1 ml da suspensão pela via intradérmica, na face anterior do antebraço direito. A leitura foi realizada 4 semanas após a inoculação.

Leitura do teste:

Reação negativa (0) = ausência de qualquer sinal no local da inoculação, ou presença de nódulo inferior a 5mm de diâmetro

Reação positiva (+) = nódulo igual ou superior a 5 mm de diâmetro ou presença de ulceração.

Dosagem de Neopterina:

A dosagem da Neopterina foi realizada através da técnica de ELISA. O kit utilizado foi procedente do Laboratório de Imunobiológicos (IBL), Hamburgo, Alemanha. A técnica seguida foi a descrita pelo fabricante (Anexo 13). Valores abaixo de 10 nmol/l foram considerados normais.

Dosagem de Proteína C Reativa:

A proteína C Reativa sérica foi dosada pelo método de nefelometria, utilizando o sistema nefelométrico da Behring. A técnica seguida foi a descrita pelo fabricante (Anexo 14). Valores até 5mg/l foram considerados normais.

PROCEDIMENTOS

Foram realizadas visitas domiciliares, onde houve o esclarecimento sobre a participação no estudo, conforme a resoluções 196 e 251 do Conselho Nacional de Saúde. Após esse procedimento, foi assinado termo de consentimento esclarecido por todos os participantes do estudo (Anexo 15). Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Nereu Ramos, da Secretaria de Estado da Saúde de Santa Catarina (Anexos 16 e 17)

O teste cutâneo e a primeira coleta de sangue foram realizados no próprio domicílio. Vinte e oito dias após, foi coletada uma segunda amostra de sangue e feita a leitura do teste da lepromina, no ambulatório de Dermatologia Sanitária, localizado na Policlínica de Referência Regional do Sistema Único de Saúde, sito à rua Esteves Júnior, na cidade de Florianópolis; na Unidade Sanitária Central na cidade de Imbituba; ou no Ambulatório de Dermatologia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

No Grupo 1, 2 pessoas não permitiram a coleta da segunda amostra de sangue, sendo, portanto, estudadas 62 amostras.

A coleta foi realizada através de punção venosa utilizando sistema a vácuo, sendo retirados aproximadamente 10 ml de sangue e armazenados em tubo seco apropriado. O transporte das amostras até o laboratório do Hospital Universitário da UFSC ocorreu dentro de um isopor com gelo. As amostras foram centrifugadas e os soros, após separação, foram colocados em tubos Ependorf individuais e estocados em freezer a -75°C . Os tubos foram numerados de 1 a 103. Os examinadores não sabiam a procedência de cada amostra em relação aos grupos estudados.

Os testes foram realizados em dois laboratórios do H. U. da UFSC: o de Imunologia, sob a supervisão dos bioquímicos Márcia Volpato Siqueira e Miguel Strazzer Neto, e o de Ensino da Bioquímica, sob a supervisão da Profa. Maria Rováris.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para comparação entre dois grupos foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Para comparação entre os grupos estudados foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. O teste de Wilcoxon foi utilizado na comparação intragrupo, dos resultados antes e após a estimulação com teste cutâneo. Foram considerados significantes os valores de $p < 0,05$ nos três testes realizados.

O índice de concordância *kappa* foi utilizado para avaliar os testes de pesquisa de Ac IgM anti PGL-1 pela técnica de ELISA e teste rápido de fita (dipstick). O valor de *Kappa* $> 0,6$, é considerado como boa medida de concordância entre os testes.

RESULTADOS

RESPOSTA HUMORAL

1- DOSAGEM DE Ac IgM ANTI PGL-1 (ELISA)

GRUPO 1

Primeira avaliação

Nos indivíduos MB (Figura 5), 17 amostras foram positivas (68%) e 8 negativas (32%). A média das DO foi de $0,348 \pm 0,241$ (Figura 5). A mediana foi igual a 0,276.

Nos indivíduos PB (Figura 5), 1 amostra foi positiva (14,3%) e 6 negativas (85,7%). A média das DO foi de $0,099 \pm 0,111$ (Figura 5). A mediana foi igual a 0,06.

Segunda avaliação

Nos indivíduos MB (Figura 6), 18 amostras foram positivas (78,3%), incluindo 2 amostras que apresentaram resultados negativos na primeira avaliação, e 5 amostras foram negativas (21,7%). No estudo 2 amostras foram perdidas. A média das DO foi de $0,407 \pm 0,314$. A mediana foi igual a 0,305.

Nos indivíduos PB (Figura 6), a mesma amostra da primeira avaliação foi positiva (16,7%) e 5 negativas (83,3%). Uma amostra foi perdida. A média das DO foi de $0,085 \pm 0,123$ (Figura 6). A mediana foi igual a 0,04.

GRUPO 2

Primeira avaliação

Observou-se (Figura 5) que 8 das amostras eram positivas (72,7%) e 3 negativas (27,2%). A média das DO foi de $0,482 \pm 0,319$. A mediana foi igual a 0,378.

Segunda avaliação

Observou-se (Figura 6) que 9 das amostras eram positivas (90%) e 1 era negativa (10%). Uma amostra foi perdida. A média das DO foi de $0,448 \pm 0,283$. A mediana foi igual a 0,552.

GRUPO 3

A pesquisa de Ac IgM anti PGL-1 foi negativa em todas as amostras, tanto na primeira avaliação (Figura 5), quanto na segunda (Figura 6). A média das DO, na primeira avaliação, foi de $0,093 \pm 0,031$, e na segunda avaliação de $0,095 \pm 0,037$. Nas 2 avaliações as medianas foram, respectivamente, iguais a 0,093 e 0,101.

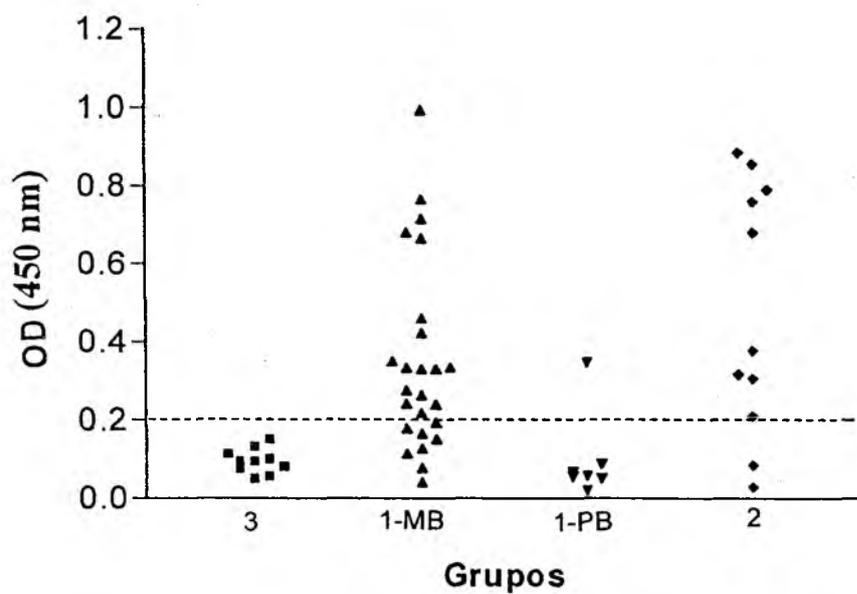


Figura 5 – Primeira dosagem de Ac IgM anti PGL-1 nos grupos estudados

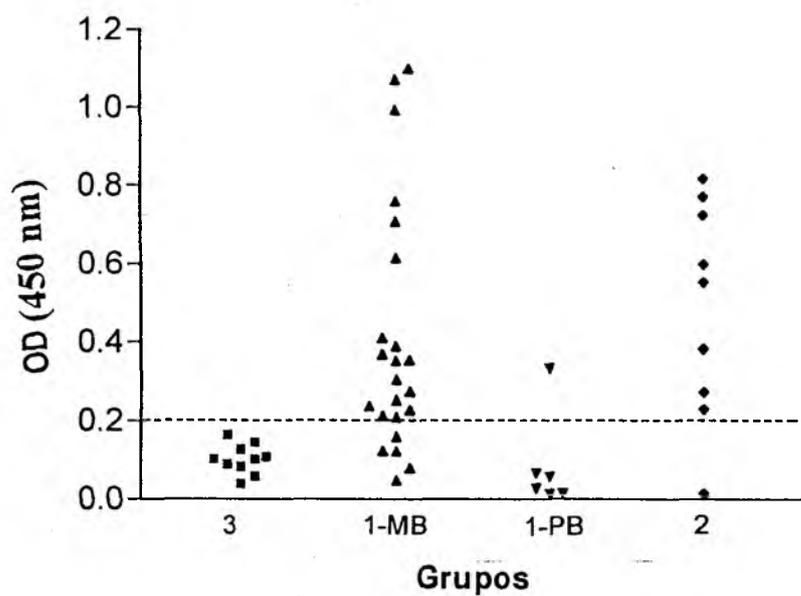


Figura 6 – Segunda dosagem de Ac IgM anti PGL-1 nos grupos estudados

COMPARAÇÃO INTERGRUPOS

Primeira e segunda avaliações

Houve diferença significativa na pesquisa de Ac IgM anti PGL-1, quando comparados os grupos estudados, tanto na primeira avaliação (Kruskal-Wallis: $H(3, N=53)$, $p = 0,0001$), quanto na segunda avaliação (Kruskal-Wallis: $H(3, N = 48)$, $p = 0,0001$).

O Grupo 3 apresentou, na primeira e na segunda avaliações, títulos de anticorpos significativamente mais baixos, quando comparados ao Grupo 1-MB (teste de Mann-Whitney, $p = 0,0001$ e $p = 0,0002$, respectivamente) e ao Grupo 2 (teste de Mann-Whitney, $p = 0,006$ e $p = 0,004$, respectivamente). Não houve diferença significativa, nas duas avaliações, entre o Grupo 3 e o Grupo 1-PB (teste de Mann-Whitney, $p = 0,17$ e $p = 0,08$, respectivamente).

Ao se comparar o Grupo 2 com o Grupo 1-PB, na primeira e segunda avaliações, houve diferença significativa em ambas ocasiões ($p = 0,012$ e $p = 0,013$, respectivamente). Na comparação entre o Grupo 2 e o Grupo 1-MB, nas duas avaliações, a diferença não foi significativa (teste de Mann-Whitney, $p = 0,26$ e $p = 0,34$, respectivamente).

Ao se comparar o Grupo 1-MB) com o Grupo 1-PB, na primeira e segunda avaliações, houve diferença significativa em ambas ocasiões (teste de Mann-Whitney, $p = 0,0032$ e $p = 0,003$, respectivamente)

COMPARAÇÃO DENTRO DE CADA GRUPO ANTES E APÓS O TESTE DA LEPRIMINA

Não houve diferença significativa na titulação de Ac IgM anti PGL-1 entre as amostras coletadas antes e após a estimulação com a lepromina, em nenhum dos grupos estudados (teste de Wilcoxon, $p > 0,10$, em todas as comparações).

RESULTADOS CONFORME TEMPO DE ALTA DA PQT (GRUPO 1)

Duas das amostras de indivíduos MB, que terminaram a PQT 1 ano antes do estudo, foram positivas (33,3%) e 4 foram negativas (66,7%).

Quatro amostras de indivíduos classificados como MB foram positivas (80%) entre aqueles que terminaram a PQT, 2 anos antes do estudo, e 1 negativa (20%). O único indivíduo PB, neste mesmo período, apresentou resultado negativo.

A pesquisa de Ac IgM anti PGL-1 foi positiva em 11 (78,6%) e negativa em 3 (21,4%) dos 14 indivíduos MB, com alta há três anos. As amostras dos 3 indivíduos PB, também com alta há três anos, foram todas negativas.

As 2 amostras coletadas 4 anos após o término do tratamento, de indivíduos classificados como PB, foram negativas.

A única amostra coletada 5 anos após, também de um PB, foi positiva (Figura 7).

Estes resultados correspondem apenas aos valores encontrados na Segunda avaliação, pela similaridade com aqueles obtidos na primeira avaliação.

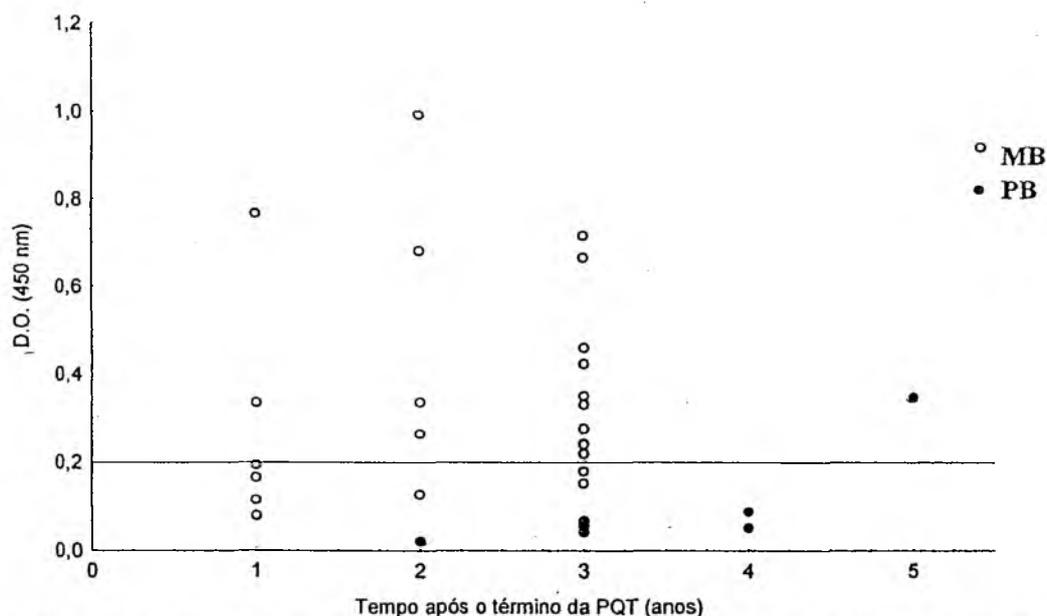


Figura 7 – Níveis de Ac IgM anti PGL-1 conforme tempo de término da PQT.

2 – PESQUISA DE Ac IgM ANTI PGL–1 COM TESTE DE FITA (DIPSTICK)

GRUPO 1

Primeira avaliação

Nos indivíduos MB, a pesquisa de anticorpos pelo teste de fita foi positiva em 18 amostras (72%) e negativa em 7 (28%).

Nos indivíduos PB, 1 amostra foi positiva (14,3%) e 6 negativas (85,7%).

Segunda avaliação

Nos indivíduos MB, a pesquisa de anticorpos pelo teste de fita foi positiva em 17 amostras (73,9%) e negativa em 6 (26,1%). Duas amostras foram perdidas.

Nos indivíduos PB, 2 amostras foram positivas (28,5%) e 5 negativas (71,5%).

GRUPO 2

Primeira avaliação

Observou-se que 8 amostras eram positivas (72,7%) e 3 foram negativas (27,3%).

Segunda avaliação

Observou-se que 9 amostras eram positivas (90%) e 1 era negativa (10%). Uma amostra foi perdida.

GRUPO 3

A pesquisa de Ac IgM anti PGL–1 pelo teste rápido de fita foi negativa em todas as amostras, tanto na primeira avaliação, quanto na segunda.

CORRELAÇÃO ENTRE OS TESTES DE ELISA E DIPSTICK

A Tabela IV correlaciona os testes de pesquisa de Ac IgM anti PGL-1 pela técnica de ELISA, e o teste rápido de fita (dipstick). O índice de concordância encontrado entre os testes foi de 96% (Kappa = 0,96).

Tabela IV – Correlação entre os testes de ELISA e dipstick na pesquisa de Ac IgM anti PGL-1

ELISA	Ac a- PGL-1 (teste de fita)		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	53	2	55
Negativo	0	48	48
Total	53	50	103

GAMAGLOBULINA

GRUPO 1

Primeira avaliação

Nos indivíduos MB, a dosagem de gamaglobulina foi positiva em 6 amostras (24%) e negativa em 19 (76%). A média das dosagens de gamaglobulina foi de $1,356 \pm 0,282$. A mediana foi de 1,300.

Nos indivíduos PB, a dosagem foi positiva em 2 amostras (28,5%). A média das dosagens de gamaglobulina foi de $1,342 \pm 0,304$ (Figura 8). A mediana foi de 1,300.

Segunda avaliação

Nos indivíduos MB, a dosagem de gamaglobulina foi positiva em 5 amostras (21,7%), incluindo 2 amostras que eram negativas na primeira avaliação. Duas amostras

foram perdidas. A média da dosagem de gamaglobulina foi de $1,413 \pm 0,337$. A mediana encontrada foi 1,300.

Nos indivíduos PB, a dosagem foi positiva em 2 amostras (28,5%). A média da dosagem de gamaglobulina foi de $1,257 \pm 0,305$ (Figura 9). A mediana encontrada foi de 1,200.

GRUPO 2

Primeira avaliação

A dosagem de gamaglobulina foi positiva em 3 amostras (27,2%). A média das dosagens encontrada foi de $1,527 \pm 0,508$ (Figura 8). A mediana encontrada foi de 1,400.

Segunda avaliação

Encontraram-se 6 amostras positivas (60%), incluindo 4 amostras que eram negativas na primeira avaliação. Uma amostra foi perdida. A média encontrada das dosagens foi de $1,840 \pm 0,488$ (Figura 9). A mediana encontrada foi de 1,950.

GRUPO 3

Foram todas as amostras negativas tanto na primeira avaliação, quanto na segunda. As médias das dosagens encontradas foram, respectivamente, $1,160 \pm 0,189$ e $1,180 \pm 0,139$ (Figuras 8 e 9). As medianas encontradas foram, respectivamente, 1,100 e 1,150.

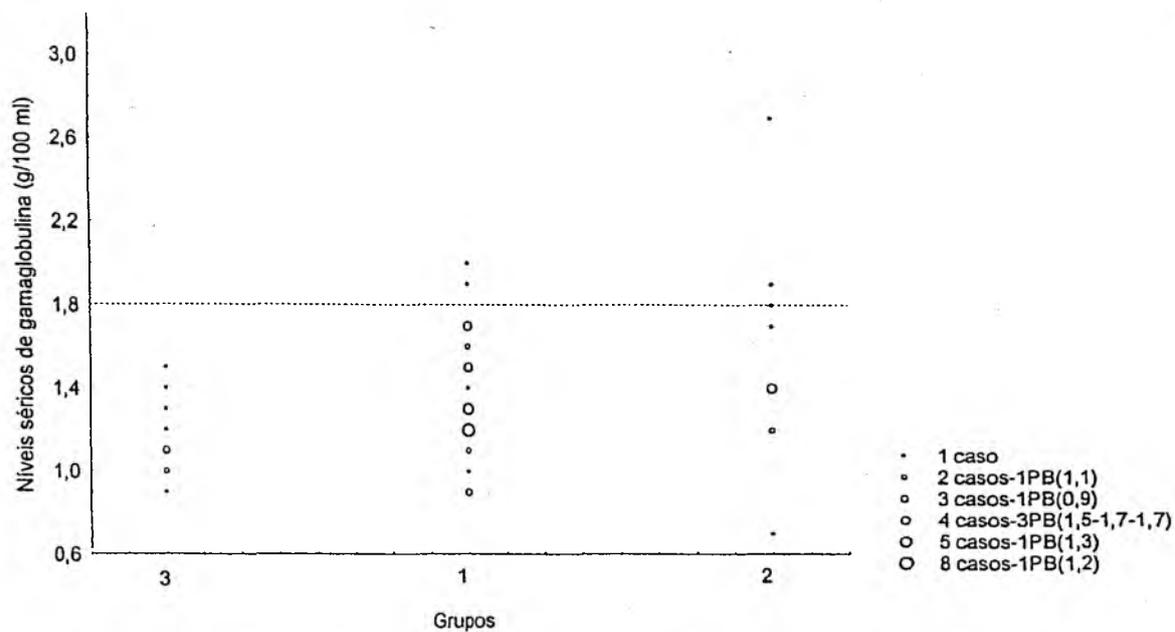


Figura 8 – Primeira dosagem de gamaglobulina nos três grupos estudados.

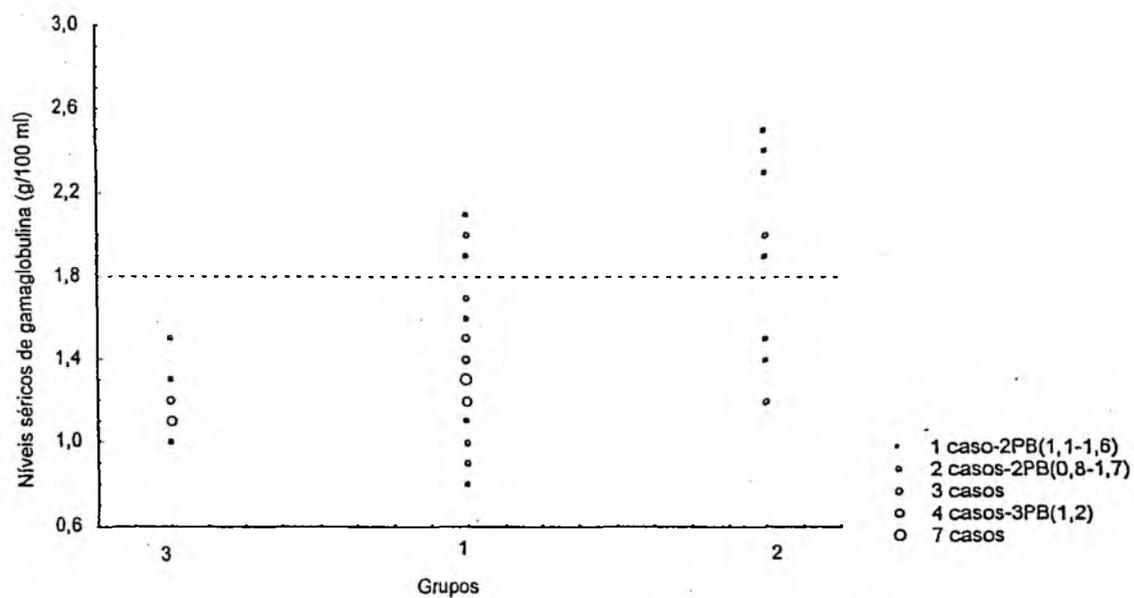


Figura 9 – Segunda dosagem de gamaglobulina nos três grupos estudados.

COMPARAÇÃO INTERGRUPOS

Primeira avaliação

Houve diferença significativa das médias das dosagens de gamaglobulina, quando comparados os grupos estudados (Kruskal-Wallis: $H(3, N = 53)$ $p = 0,038$).

O Grupo 3 apresentou diferença significativa nos níveis de gamaglobulina sérica se comparado aos Grupos 1 e 2 (teste de Mann-Whitney, $p < 0,04$).

Ao comparar os Grupos 1 e 2 a diferença nas médias das dosagens não foi significativa (teste de Mann-Whitney, $p = 0,232$).

COMPARAÇÃO INTERGRUPOS

Segunda avaliação

Houve diferença significativa das médias de dosagem da gamaglobulina, quando comparados os grupos estudados (Kruskal-Wallis: $H(3, N = 53)$, $p < 0,002$).

O Grupo 3 apresentou diferença significativa nos níveis de gamaglobulina sérica se comparado aos Grupos 1 e 2 (teste de Mann-Whitney, $p < 0,04$).

Ao comparar os Grupos 1 e 2 a diferença nas médias das dosagens foi significativa (teste de Mann-Whitney, $p < 0,02$).

COMPARAÇÃO DENTRO DE CADA GRUPO ANTES E APÓS O TESTE DA LEPROMINA

Não houve diferença significativa nos níveis de gamaglobulina entre as amostras coletadas antes e após a estimulação com a lepromina em nenhum dos três grupos estudados (Wilcoxon, $p = 0,242$).

PESQUISA DE ANTICORPOS ANTICARDIOLIPINA E ANTI -TREPONÊMICO

GRUPO 1

VDRL

No grupo MB, houve 2 amostras positivas (8%) na primeira avaliação, com títulos de 1:16 e 1:8. Estas titulações se repetiram na segunda avaliação.

No grupo PB, todas as amostras foram negativas tanto na primeira avaliação, quanto na segunda.

FTA-ABS

No grupo MB observou-se em 1 amostra dosagem de FTA-ABS IgM positiva, que não se repetiu na segunda avaliação. Este indivíduo não tinha história clínica prévia de tratamento para Sífilis, e na análise de prontuário encontrou-se um VDRL negativo anterior.

Na primeira avaliação, encontraram-se no grupo MB 8 amostras positivas (32%) na pesquisa de FTA-ABS, classe IgG, permanecendo positivas na segunda avaliação. Seis indivíduos não tinham história prévia de diagnóstico e tratamento de Sífilis ou pesquisa positiva na análise de prontuário.

O grupo PB apresentou uma amostra positiva (14,2%) na primeira avaliação, que se repetiu na segunda.

A Tabela V mostra a relação de positividade entre VDRL e FTA-ABS. As 4 amostras de 2 indivíduos classificados como MB, que eram VDRL positivas, também tinham títulos positivos de FTA-ABS da classe IgG.

Tabela V– Correlação entre a positividade dos testes de FTA–ABS e VDRL nas 62 amostras estudadas no Grupo 1.

	VDRL		Total
	Positivo	Negativo	
FTA–ABS IgM			
Positivo	-	1	1
Negativo	-	61	61
FTA–ABS IgG			
Positivo	4	14	18
Negativo	-	44	44

GRUPO 2

Na primeira avaliação encontrou-se 1 amostra positiva (9,1%) na pesquisa de FTA–ABS IgG, que persistiu na segunda avaliação. Este paciente não tinha história prévia de tratamento para Sífilis.

GRUPO 3

A pesquisa foi negativa para os testes anticardiolipina e antitreponêmico em todas as amostras analisadas, tanto na primeira avaliação quanto na segunda.

RESPOSTA CELULAR

1–TESTE DE MITSUDA

GRUPO 1

Após a leitura do teste da lepromina observou-se que no Grupo 1-MB, 3 Dimorfos (12%) apresentaram teste positivo. Estes eram Mitsuda negativos no período que precedeu o início da PQT. Todos os indivíduos MB, classificados previamente como Virchowianos, mantiveram-se com teste cutâneo negativo .

Neste estudo, todos os indivíduos do Grupo 1-PB foram Mitsuda positivos.

GRUPO 2

Nos 11 pacientes estudados, o teste de Mitsuda foi negativo.

GRUPO 3

Das 10 pessoas avaliadas, 8 tiveram resposta positiva à Mitsudina (80%) e 2 foram negativas (20%).

2 – DOSAGEM DE NEOPTERINA

GRUPO 1

Primeira e Segunda avaliações

O valor da mediana das dosagens na primeira avaliação, tanto para os MB quanto para os PB, foi de 2,9 nmol/l. As dosagens mínima e máxima, para os PB, foram de 1,47 nmol/l e 4,73 nmol/l. No caso dos MB, estas dosagens foram de 1,0 nmol/l e 6 nmol/l, respectivamente (Figura 10).

O valor da mediana das dosagens na segunda avaliação foi 3,0 nmol/l para os MB e de 3,2 nmol/l, para os PB. As dosagens mínima e máxima foram 1,17 nmol/l e 13,0 nmol/l para os MB, e de 1,53 nmol/l e 4,6 nmol/l para os PB (Figura 11).

As dosagens médias de Neopterina encontravam-se dentro dos valores normais nos três grupos estudados, tanto na primeira quanto na segunda avaliações (Figuras 10 e 11).

GRUPO 2

Primeira avaliação

O valor da mediana das dosagens foi 4,3 nmol/l. As dosagens mínima e máxima foram 1,12 nmol/l e 8,09 nmol/l. Todas as amostras encontradas estavam dentro dos limites normais do teste (Figura 10).

Segunda avaliação

O valor da mediana das dosagens foi 3,8 nmol/l. As dosagens mínima e máxima foram 1,1 nmol/l e 5,3 nmol/l. Todos os valores encontrados estavam dentro dos limites normais do teste (Figura 11).

GRUPO 3

Primeira avaliação

O valor da mediana das dosagens foi 3,0 nmol/l, sendo inferior ao valor de referência. As dosagens mínima e máxima foram 2,1 nmol/l e 6,0 nmol/l. Todos os valores encontrados estavam dentro dos limites normais do teste (Figura 10).

Segunda avaliação

O valor da mediana das dosagens foi 2,2 nmol/l. As dosagens mínima e máxima foram 1,6 nmol/l e 3,6 nmol/l. Todos os valores encontrados estavam dentro dos limites normais do teste (Figura 11).

Não foram feitos estudos estatísticos comparativos intragrupos e intergrupos em nenhuma das duas avaliações, uma vez que os valores médios de todos os grupos encontravam-se dentro da faixa de normalidade sérica da neopterinina.

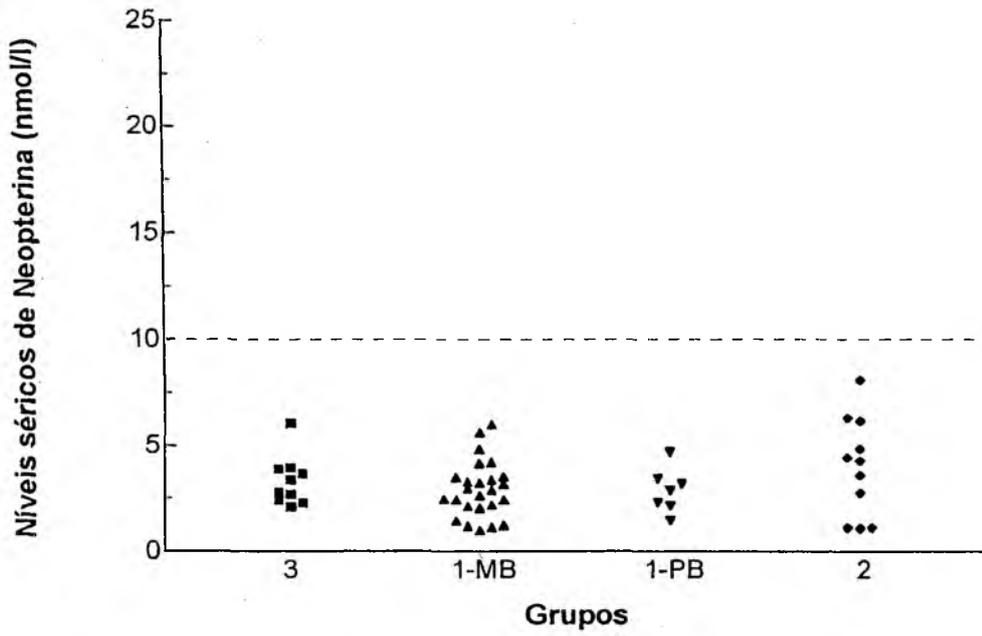


Figura 10 – Primeira dosagem de Neopterina nos 3 grupos estudados.

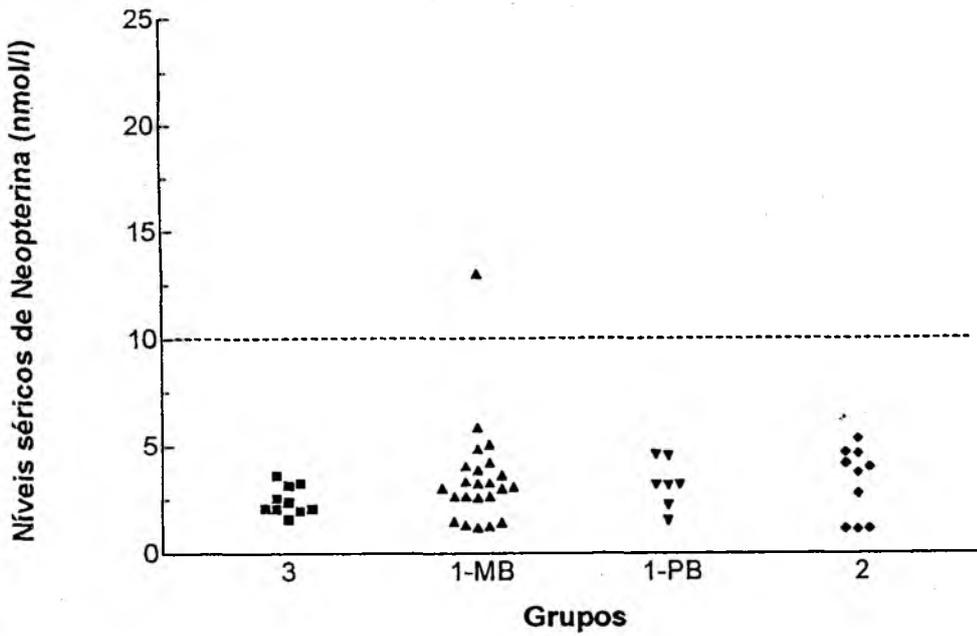


Figura 11 – Segunda dosagem de Neopterina nos 3 grupos estudados.

3- DOSAGEM DE PROTEÍNA C REATIVA (CRP)

GRUPO 1

Primeira avaliação

O valor da mediana das dosagens foi 3 mg/l, tanto para os MB quanto para os PB. As dosagens mínima e máxima foram de 3,0mg/l e 17,1 mg/l para os MB e de 3mg/l e 21,4 mg/l para os PB. Seis MB e três PB apresentaram valores séricos acima da normalidade (Figura 12).

Segunda avaliação

O valor da mediana das dosagens foi 3,4 mg/l tanto para os MB quanto para os PB. As dosagens mínima e máxima foram de 3,4 mg/l e 14,5 mg/l para os MB e de 3,4 mg/l e 11,8 mg/l para os PB. Sete MB e dois PB apresentaram níveis séricos acima dos valores normais (Figura 13).

GRUPO 2

Primeira avaliação

O valor da mediana para as dosagens foi de 3,0 mg/l. As dosagens mínima e máxima foram de 3,0 mg/l e 7,5 mg/l. Três amostras apresentaram resultados discretamente aumentados (Figura 12).

Segunda avaliação

O valor da mediana das dosagens foi de 7,45 mg/l. As dosagens mínima e máxima foram de 3,4 mg/l e 11,8 mg/l. Seis amostras apresentaram resultados aumentados (Figura 13).

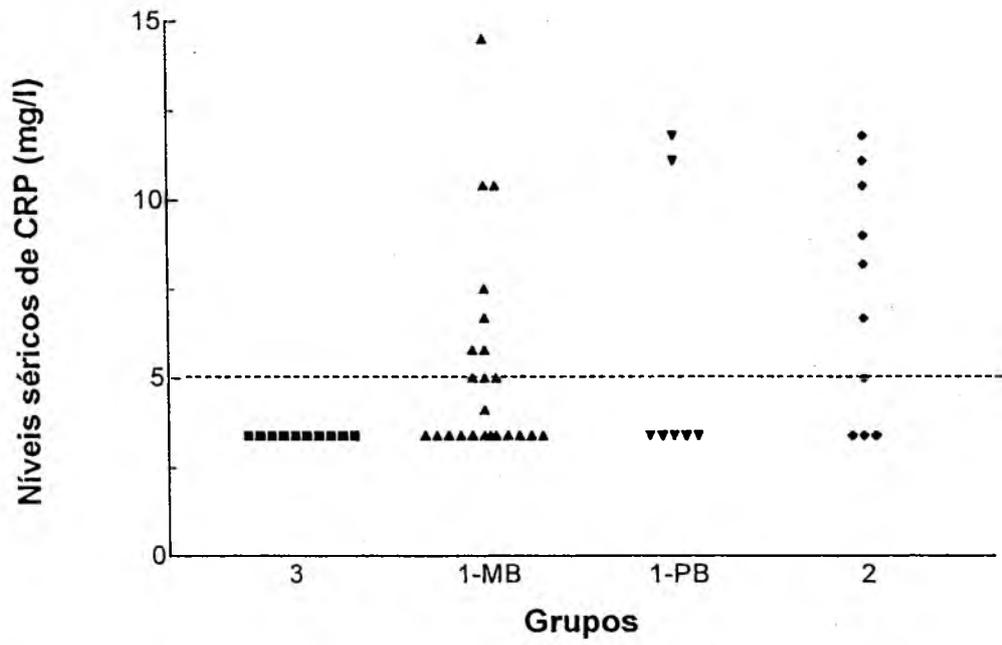


Figura 13 – Segunda dosagem de Proteína C reativa nos 3 grupos estudados.

DISCUSSÃO

A introdução, no Brasil, da poliquimioterapia em 1986 determinou a queda da prevalência da Hanseníase. Porém, fato interessante, observou-se um aumento na taxa de detecção das formas multibacilares em grande parte dos Estados brasileiros. Isto sugere que o novo esquema terapêutico teve um impacto expressivo na classificação clínica, principalmente quando ocorria dúvida quanto ao aspecto e número das lesões, aumentando, assim, o número de prováveis falsos Dimorfos.⁴⁵ Apesar da queda na prevalência, não houve alteração significativa na incidência da doença, que expressa o real controle da infecção. Santa Catarina, diferentemente dos outros Estados, manteve, historicamente, o predomínio de multibacilares, com taxas de detecção estáveis.⁴³

Para que ocorra queda da transmissão da doença é necessário que se limite a circulação da bactéria na comunidade.^{3,14} Com a poliquimioterapia, ocorre encurtamento do tempo de doença e controle sobre os multibacilares tratados, diminuindo, desta forma, esta fonte de infecção. A poliquimioterapia é a principal arma usada pelos Programas Nacionais de Saúde para atingir suas metas de eliminação da doença.^{40,41} Estudos têm demonstrado que os pacientes portadores da forma multibacilar que receberam menos de 24 doses mensais de poliquimioterapia responderam tão favoravelmente quanto os que receberam 24 ou mais doses do tratamento. Assim, a OMS considerou que a duração do tratamento para os pacientes multibacilares pode ser reduzida a 12 meses, sem comprometer a eficácia do tratamento, mesmo naqueles com Índice Baciloscópico muito elevado.⁴¹ Estes pacientes devem ser acompanhados com cautela, pois têm um risco maior de desenvolverem lesão neural, formas reacionais da doença e melhora lenta das lesões cutâneas. Caso não se observe melhora em 12 meses com a PQT, recomenda-se 12 meses adicionais.⁴¹ Com a fixação de um menor tempo de tratamento, ocorrerá uma aceleração em direção às metas da Aliança Global e à eliminação da Hanseníase como problema de Saúde Pública, talvez antes do ano 2005.⁴⁰

O impacto epidemiológico no controle da disseminação do *M. leprae*, através da descoberta de doentes, tem sido discutido.⁵⁶ A presença, transitória, de carreadores nasais

assintomáticos, contatos ou não de doentes com formas multibacilares, são possíveis fontes de infecção do bacilo, que manteriam, junto aos pacientes multibacilares, a micobactéria circulante.⁹ Quando os pacientes considerados curados são retirados do registro ativo da doença, retornam para o mesmo ambiente, podendo ser re-expostos ao bacilo. Ao mapearmos os indivíduos do Grupo 1, observamos que a distribuição no município de Palhoça (Anexo 5) ficou concentrada em uma determinada região, ao contrário dos outros municípios onde a distribuição na comunidade foi mais heterogênea. Eram 5 pessoas, sendo 3 classificadas como multibacilares. Além destes fatores de persistência bacteriana na comunidade, não se observou, até o presente momento, queda na taxa de detecção após o início da poliquimioterapia. Portanto, são necessárias medidas adjuvantes ao tratamento para que, após alcançar a eliminação, se inicie o processo de erradicação como meta final. Para que isto ocorra, é importante o entendimento da relação entre o *M. leprae* e seu hospedeiro, assim como suas formas de transmissão. Valverde CR e col. descreveram o achado de infecção pelo *M. leprae* em macacos *Cynomolgus* provenientes das Filipinas. Estes macacos e, possivelmente, outros primatas, poderiam ser utilizados como modelos experimentais para o estudo da hanseníase em humanos.⁷¹

O desenvolvimento de uma vacina efetiva e a possível utilização de marcadores de respostas humoral e celular poderiam ser utilizados na estratégia de bloqueio da cadeia de transmissão e no acompanhamento dos pacientes considerados curados, a longo prazo, por pelo menos 10 anos pós tratamento, e em contatados, visando o diagnóstico precoce da doença e de recidivas.^{14,65}

Nessa pesquisa encontramos, nos resultados dos indivíduos tratados, a presença de Ac IgM anti PGL – 1 séricos em níveis séricos semelhantes a de estudos com pacientes em tratamento, no que se refere à polarização da doença, ou seja, taxa elevada nos multibacilares e baixa nos paucibacilares.^{19,22,62} Observou-se no grupo 1 (Tratado MB) 68% de positividade na primeira avaliação e 78% na segunda avaliação. Por outro lado, foi encontrado no grupo 1 (Tratado PB), respectivamente, na primeira e segunda avaliações, 4% e 28% de positividade. O grupo 2 mostrou positividade de 75% na primeira avaliação e 90% na segunda. Estes achados estão em concordância com o encontrado na literatura.^{49,50} Entre os controles normais, não contatados de doentes multibacilares, a positividade varia de acordo com a endemicidade da região, podendo chegar até 30% em regiões de alta

endemicidade.^{16,17,60,62} Israel Filho e Foss encontraram, em diferentes estudos, cerca de 3% de positividade no grupo controle^{57,58}, diferentemente dos desta pesquisa, que não obteve nenhum caso positivo. Apesar de, surpreendentemente, observarmos uma tendência de aumento na positividade da pesquisa de Ac IgM anti PGL – 1 na segunda avaliação de todos os grupos estudados, ou seja, após o teste da lepromina, esta não foi estatisticamente significativa. Seria necessário um número maior de amostras para verificar se existe uma relação entre o teste cutâneo de Mitsuda, que avalia a presença de hipersensibilidade tardia, mediada por célula T, e a resposta imune humoral. Este estudo seria interessante, pois, baseando-se nos conhecimentos atuais, Sousa e col. não encontraram um efeito putativo da influência das citocinas de padrão Th1 ou Th2 sobre a formação das subclasses de IgG nas infecções por micobactérias.⁶⁹ Em outro estudo, *in vitro*, foi mostrado que a produção de INF- γ , apesar de aumentar com o tempo de tratamento com a poliquimioterapia, não diferia entre as formas LL e TT.⁷⁰

Cho e col., ao analisarem os títulos de Ac IgM anti PGL – 1, dois e cinco anos após o início do tratamento com diversos esquemas, incluindo a poliquimioterapia com dapsona, clofazimina e rifampicina, observaram que houve, respectivamente, um declínio de 50% e 70%, independente do esquema terapêutico utilizado.⁴⁸ Os títulos tendem a cair nos primeiros anos após início do tratamento, à medida que ocorre a queda do índice baciloscópico (IB).^{49,50} Apesar de nosso estudo ser transversal, com dosagens das titulações em grupos pequenos e com indivíduos distintos, seria esperado que as DO no Grupo 2, onde a maior parte se encontrava em início da poliquimioterapia e com Índice Bacilar mais elevados, fossem significativamente maiores que no Grupo 1. Porém, os valores encontrados foram semelhantes. Da mesma maneira, não foi encontrada diferença significativa quando se compararam as médias de DO em relação ao tempo de término da PQT. A persistência de bacilos íntegros ou fragmentados nos tecidos por tempo prolongado, mesmo após o término da PQT, justificaria a positividade ainda alta no Grupo 1.⁴⁹ Gelber e col. descreveram diferentes grupos de indivíduos que, durante o tratamento, apresentaram comportamentos distintos quanto à velocidade de queda dos Ac anti PGL – 1. Enquanto de um lado havia pacientes com queda linear e rápida dos títulos, de outro lado havia aqueles que, após a queda inicial observada no primeiro ano de tratamento, estabilizavam seus títulos, mantendo-os por um tempo prolongado, com queda mais lenta.⁴⁹

No entanto, por não termos idéia dos títulos destes anticorpos na vigência da doença destes indivíduos, seria necessário um acompanhamento sorológico, para afirmar se está ocorrendo persistência dos títulos de anticorpos, com queda progressiva e lenta, permanecendo semelhante ao Grupo 2; ou se está ocorrendo persistência do bacilo, em alguns integrantes deste grupo, ou ainda se os mesmos estão sendo novamente expostos, mantendo o estímulo antigênico.

Os anticorpos produzidos não são protetores e a sua presença estaria vinculada ao metabolismo da micobactéria pelo macrófago.⁴ Na ocorrência de metabolização parcial do bacilo, seriam formados antígenos incompletos, que não seriam apresentados pelo MHC de classe II aos LT. Este macrófago modificado seria reconhecido como estranho e seria fagocitado por outros macrófagos. Esta nova informação antigênica determinaria a estimulação da subpopulação de LT auxiliares do tipo 2 (Th2) e, conseqüentemente, a exacerbação da resposta imune humoral.⁴ Além disso, a resposta humoral frente ao *Mycobacterium leprae* também é antígeno T-independente, ocorrendo predomínio da classe IgM em qualquer fase da doença.²⁰ Esta alteração no funcionamento de macrófagos estaria correlacionada à recidiva em pacientes classificados como PB. Estes pacientes teriam também parte de seus macrófagos com alteração no metabolismo da micobactéria, favorecendo a persistência bacilar e a possível recidiva futura.⁵⁹

A interação entre macrófagos e LT, com a liberação de moduladores da resposta imune (citocinas), também tem importância na determinação de mecanismos de defesa ou de disseminação do *M. leprae*, expressando-se clinicamente nas formas polares da doença. No pólo Virchowiano ocorre predomínio das citocinas produzidas pela subpopulação de LT auxiliares do tipo 2 (Th2): IL-4, IL-5, IL-6, IL-8 e IL-10.^{10,13} Destas, a IL-4 e a IL-10 são supressoras da atividade macrofágica e a IL-4 estimula LB, aumentando a produção de imunoglobulinas. Por outro lado, no pólo Tuberculóide ocorre predomínio das citocinas produzidas pela subpopulação de LT auxiliares tipo 1 (Th1): IL2, IFN γ , TNF, que são estimuladoras da resposta imune celular, com ativação de macrófago.^{10,13}

Além das alterações metabólicas do macrófago e da produção de citocinas, também é descrito o envolvimento de diferentes padrões fenotípicos do sistema de antígenos leucocitários humanos (HLA), determinando alterações na apresentação de antígenos, estando também envolvido nas alterações imunológicas da doença. O predomínio de HLA-

DR2 e HLA-DR3 confere resistência, estando presente no pólo Tuberculóide. Por outro lado, o predomínio de HLA-DQ1 está relacionado à suscetibilidade e à disseminação da doença.^{13,46}

Estes fatores do hospedeiro, ligados à hereditariedade, são de grande importância, na medida em que a poliquimioterapia não modifica a resposta do macrófago frente ao bacilo, mantendo a suscetibilidade mesmo após a alta pela cura clínica.

A manutenção de títulos elevados de Ac ou o aumento destes, durante o acompanhamento, funcionaria como alerta para possível atividade bacilar, sendo adjuvante na detecção de possíveis recidivas ou resistência ao tratamento.^{23,48,52} Levis e col. sugeriram que a determinação dos níveis de Ac IgM anti PGL-1 anualmente, associada à biópsia e ao IB, deveriam ser analisadas para definição, não só da duração da poliquimioterapia, mas também da escolha dos antimicrobianos.²³

O tropismo pelo sistema nervoso periférico com comprometimento das células de Schwann tem sido objeto de estudo por alguns autores. Estudos experimentais sugerem que macrófagos infectados pelo bacilo, ao transitarem pelos nervos periféricos, ficariam aderidos às células endoteliais da vasa nervorum, sendo posteriormente liberados no espaço endoneural e persistiriam parasitando as células endoteliais. A micobactéria, então, se ligaria à superfície da célula de Schwann, através da cadeia α -2 da laminina, que é uma das proteínas isoladas na superfície desta célula, e posteriormente ocorreria sua interiorização. A laminina, que é restrita ao sistema nervoso periférico, poderia explicar o não-comprometimento do sistema nervoso central pelo *M. leprae*.^{65,66}

Como o bacilo invade macrófagos, células endoteliais e células de Schwann, a persistência, nesta última, de bacilos íntegros poderia ser fonte de recidiva, pois é isenta de fagolisossomas, funcionando como depósito de micobactéria. Desta forma, haveria manutenção do estímulo antigênico, com persistência de títulos altos de Ac IgM anti PGL-1. No entanto, no acompanhamento pós-tratamento alguns autores observaram uma taxa de recidiva baixa.^{51,53} Por outro lado, Kajihara H. e col. analisando biópsias de nervo radial em pacientes LL e BL, em vigência da poliquimioterapia, encontraram macrófagos, células de Schwann e células endoteliais contendo material denso e irregular, considerados como sendo *M. leprae* degenerado e fragmentado. Não foram encontrados bacilos intactos, o que corrobora a efetividade da poliquimioterapia.⁵⁵ Estes resultados poderiam sustentar o

argumento da não-realização de teste sorológico como rotina de acompanhamento pós-tratamento, associado ao custo de sua realização. Porém, trata-se de uma doença de importância epidemiológica, na medida em que, se realizado diagnóstico tardio, pode ser incapacitante, aumentando o número de pessoas economicamente inativas. O aprimoramento de técnicas laboratoriais que visam ao diagnóstico precoce de doenças crônicas, como a Hanseníase, deveria ser estimulado pelos órgãos governamentais nos países onde a doença ainda é um problema de saúde pública.

Dois integrantes do Grupo 1 (Tratado MB) chamaram a atenção na análise dos resultados. Em um paciente classificado como forma Dimorfa que tinha Índice Baciloscópico de 3,75 no início da poliquimioterapia e 1,00 no término do tratamento, foi encontrada uma DO de 0,682. Foi realizada a coleta três anos após o término do tratamento. Em um outro paciente, com término de tratamento 2 anos antes da coleta e também classificado como forma Dimorfa, apresentava IB 4,25 no início da PQT, 1,25 no término da PQT e tinha uma DO de 0,243, estando próximo do limiar mínimo de positividade da dosagem de Ac IgM anti PGL-1. Chama atenção a grande diferença entre estes dois títulos, já que a queda da DO tende a acompanhar o I.B. Esta persistência de DO alta, apesar de não sabermos como eram os títulos iniciais, sugere a necessidade de um acompanhamento clínico e laboratorial deste paciente, na perspectiva de se fazer diagnóstico precoce de recidiva, se esta vier a ocorrer.

A pesquisa de Ac IgM anti PGL-1, através de teste rápido de fita, apresentou excelente índice de concordância com o teste de ELISA convencional ($kappa = 0,96$). Este achado está de acordo com o encontrado por Bühner ($k = 0,92$), em um estudo realizado com grupos de pacientes paucibacilares, multibacilares, contatados e controles sadios.²⁶ Apesar de ser um teste sensível e específico, nossos achados sugerem que o teste teria pouco valor no acompanhamento pós-tratamento, por ser qualitativo, sabendo-se que os pacientes MB podem persistir com títulos positivos por muito tempo, com queda progressiva. Porém, a aplicabilidade no mapeamento epidemiológico da infecção poderia ser de grande valor no controle da doença, pois se a prevalência de soropositividade numa população pode refletir taxas de exposição/infecção, o efeito das medidas de controle poderiam ser avaliados através de triagem utilizando teste sorológico.³ Bühner e col. realizaram testes sorológicos por técnica de ELISA e dipstick em 2.450 escolares,

distribuídos aleatoriamente em 3 municípios, com diferentes taxas de prevalência (alta, média e baixa) no Estado de Santa Catarina (respectivamente, Itajaí, Laguna e Tubarão). As taxas de positividade dos testes, quando comparadas entre os municípios, estavam em concordância com a classificação dos mesmos segundo a prevalência da doença. Porém, quando analisadas isoladamente, as taxas mostraram uma positividade muito elevada nos 3 municípios estudados. Estes achados sugerem que a realização de busca ativa de doentes, a partir dos contatados dos soropositivos, poderia colaborar como uma nova estratégia no controle da doença (Bührer, 2000, dados não publicados).

A hipergamaglobulinemia é um achado freqüente nas formas multibacilares da doença, principalmente durante as formas reacionais.^{12,13,16} Neste estudo observou-se um aumento na fração gama da eletroforese de proteínas, após estimulação com teste cutâneo no Grupo 2. Este achado não ocorreu no Grupo 1 (Tratado MB). Isto sugere uma maior resposta humoral inespecífica, induzida pelo teste cutâneo, no Grupo 2, visto que não houve diferença significativa nos títulos de Ac anti PGL-1 nas duas avaliações efetuadas. Seria necessário, no entanto, um estudo com maior número de amostras para corroborar este achado.

A presença de auto-anticorpos no soro de pacientes com Hanseníase Virchowiana é muito freqüente.³³ Como a cardiolipina é um dos componentes estruturais do *M. leprae*, é freqüente o achado de anticorpos anticardiolipina com resultados falso positivos.^{33,34} Este estudo encontrou no Grupo 1 baixa positividade de VDRL (6,2%). Interessante é observar que, nos pacientes ainda em tratamento, não foi encontrado nenhum resultado positivo, embora a literatura descreva positividade de até 30%.^{33,35} Talvez o baixo número de pacientes em nosso estudo justifique este achado.

Também é relatada a possibilidade de ocorrência de testes treponêmicos falso positivos.³³ A pesquisa de FTA-ABS IgG esteve presente em 18% dos indivíduos tratados. Scotti e col. encontraram na análise de 206 soros de pacientes MB 40% (82) de positividade para testes não treponêmicos e 40% destes (33 de 82) tiveram testes treponêmicos positivos.³² Porém, o autor não pesquisou teste treponêmico nos pacientes MB, VDRL negativos. A possibilidade de que estes achados sejam decorrentes da co-infecção da Hanseníase com a Sífilis não parece explicar a positividade alta de testes treponêmicos neste estudo. As seguintes observações seriam contrárias à presença de uma

co-infecção: pessoas com testes positivos foram questionadas sobre a presença de história recente ou passada de tratamento; a presença nos prontuários de teste não treponêmico negativo e o fato de que as amostras positivas (FTA-ABS da classe IgG), estão concentradas no Grupo 1 (Tratado MB), onde predomina a resposta humoral. Testes treponêmicos falso positivos são encontrados em doenças do tecido conectivo, doenças autoimunes, infecções virais, leptospirose, malária, gestação e doença de Lyme.^{67,68} Além disso, se realmente se trata de titulações falso positivas de FTA-ABS IgG, possivelmente o melhor marcador de doença na Sífilis seria FTA-ABS IgM. Desta forma, o clínico deveria ser cuidadoso ao analisar testes treponêmicos associados à história clínica e epidemiológica.

Saad e col, estudando pacientes e contatados de hansenianos, demonstraram a relação inversa entre a resposta humoral e a celular. Dos 17 contatos que apresentaram Mitsuda negativo, dois tinham títulos elevados de Ac anti PGL-1 e ambos desenvolveram formas clínicas Dimorfa e Indeterminada da doença, no período de 2 anos de seguimento.⁵⁴ A presença de teste de Mitsuda negativo indica um risco individual de desenvolvimento da doença, com probabilidade maior de polarizar para formas MB, que são transmissoras do bacilo. Os autores sugeriram que o teste de Mitsuda poderia auxiliar, junto à sorologia, na busca de novos casos em populações de alto risco para contágio com o bacilo.⁵⁴

Observou-se neste estudo que todos os indivíduos tratados classificados como virchowianos mantiveram-se Mitsuda negativos e todos os paucibacilares permaneceram Mitsuda positivos. Somente ocorreu a inversão da resposta de hipersensibilidade tardia em três pacientes classificados como portadores da forma Dimorfa. A persistência da suscetibilidade ao bacilo associada aos títulos positivos de anticorpo específico anti PGL-1 demonstra a necessidade de acompanhamento contínuo destes indivíduos. Como nas taxas de detecção prevalecem as formas MB, a vigilância a longo prazo se faz necessária, mesmo em regiões de baixa prevalência, como Santa Catarina.

A Neopterina é liberada pelos macrófagos quando ativados pelo IFN γ . Seu nível aumentado tem um especial valor em doenças caracterizadas por mudança aguda em severidade. A extensão e a atividade de doenças correlacionadas com parasitas intracelulares, como a tuberculose, leishmaniose e hanseníase poderiam ser correlacionadas com níveis elevados de Neopterina.³⁷

Este estudo mostrou que a Neopterinina não foi um bom marcador de atividade da doença, pois foi negativo tanto no Grupo 2, quanto no Grupo 1, sendo os níveis semelhantes ao encontrado no Grupo 3. Hamerlinck encontrou uma dosagem média de Neopterinina em pacientes não tratados de 9 nmol/l³⁹, estando em concordância com este estudo. Na mesma pesquisa, foram encontrados níveis elevados de Neopterinina em pacientes com formas reacionais, principalmente no tipo eritema nodoso lepromatoso (média de 16,9 nmol/l). Estes achados sugerem que a dosagem de neopterinina seria um bom marcador para acompanhamento de formas reacionais e no diagnóstico diferencial entre as formas reacionais e a possível ocorrência de recidiva da doença.³⁹

A presença de proteínas de fase aguda, como a CRP, ocorre na medida em que os hepatócitos são expostos a certas citocinas (IL-1, TNF e IL-6). Como são citocinas principalmente secretadas por macrófagos, a CRP seria um marcador de ativação destas células.⁴⁰ Neste estudo encontramos valores de médias baixos nos três grupos estudados. Autores descrevem 15 a 25,8% de positividade em pacientes virchowianos, aumentando para 90 a 100% durante a forma reacional tipo eritema nodoso.^{36,47,63,64} Nas formas reacionais, principalmente reação tipo eritema nodoso lepromatoso, observam-se níveis elevados de CRP, pela recuperação transitória da resposta imune celular.^{36,46,47}

Como em outros parâmetros das respostas humoral e celular estudados, observamos neste estudo aumento nos níveis de CRP, após estimulação com a lepromina, no Grupo 2. Porém, apesar de ser aumento laboratorial significativo, manteve-se sem significância clínica. Talvez o estímulo localizado com o teste cutâneo tenha induzido a esta resposta celular, com ativação de macrófagos na derme, e conseqüente aumento desta proteína de fase aguda. Estes achados nos levam a questionar: teriam os indivíduos em vigência da poliquimioterapia maior resposta tanto humoral, quanto celular, quando comparados aos indivíduos considerados curados? Existiria relação entre a piora destas respostas imunológicas e o tempo de término da poliquimioterapia? Apenas com um estudo maior e com seguimento prolongado destes indivíduos é que poderíamos responder a estas questões.

Com os resultados deste estudo, concluímos que os indivíduos do Grupo 1 MB mantiveram parâmetros de resposta humoral e celular de suscetibilidade à doença, independente do tempo pós-tratamento. Baseado nos resultados laboratoriais e na pesquisa

da literatura, sugerimos que seja ampliado o tempo de acompanhamento dos indivíduos considerados curados, utilizando parâmetros clínicos, auxiliados pela titulação anual de Ac IgM anti PGL-1 e de um teste para avaliação da resposta celular.

Concomitantemente, os contatantes também deveriam ser acompanhados, inicialmente através do teste rápido de fita, por ser sensível e barato. Os positivos seriam submetidos ao teste de ELISA, também com titulações anuais. Os que forem negativos também seriam acompanhados anualmente, porém somente com o teste rápido. Desta forma, o Programa de Controle da Doença teria maior visibilidade do comportamento da doença no Estado e maior entendimento da transmissão do bacilo dentro das comunidades.

CONCLUSÕES

No grupo 1, Tratado MB (pólo Virchowiano), o padrão de resposta imune não diferiu daquele encontrado no Grupo 2, independente do tempo de término da PQT, o que indica manutenção da suscetibilidade à doença (recidiva ou re-infecção).

Nos indivíduos do Grupo 1, classificados como MB (forma Dimorfa), houve uma reversão a favor da resposta celular, expressa pela reação de Mitsuda positiva, o que indica uma maior resistência à doença (recidiva ou re-infecção).

No Grupo 1 PB (pólo Tuberculóide), foi observada a presença de uma boa resposta celular, o que indica uma maior resistência à doença (recidiva ou re-infecção)

É importante o acompanhamento clínico e laboratorial contínuo, principalmente dos indivíduos tratados que mantiverem um predomínio do padrão humoral de resposta imune.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Talhari S, Neves RG. Hanseníase. 3.ed. Manaus: Gráfica Tropical, 1997.
2. Organização Mundial da Saúde. Guia para eliminar a Hanseníase como problema de saúde pública. Genebra: 1995.
3. Beers SM. Leprosy. Epidemiological studies of infection and disease [thesis]. Amsterdam (The Netherlands): Amsterdam University, 1998.
4. Abulafia J, Vignale RA. Leprosy: Pathogenesis updated. *Int J Dermatol* 1999 May; 38(5):321-34.
5. Marques MAM, Chitale S, Brennan PJ, Pessolani MCV. Mapping and identification of the major cell wall-associated components of *Mycobacterium leprae*. *Infection and Immunity* 1998 June; 66(6): 2625-31.
6. Cho SN, Yanagihara DL, Hunter SW, Gelber RH, Brennan PJ. Serological specificity of Phenolic glycolipid 1 from *Mycobacterium leprae* and use in serodiagnosis of leprosy. *Infection and Immunity* 1983 Sept; 41(3): 1077-83.
7. Young DB, Buchanan TM. A serological test for leprosy with a glycolipid specific for *Mycobacterium leprae*. *Science* 1983 Sept; 221: 1057-9.
8. Chanteau S, Cartel J, Roux J, Plichart R, Bach M. Comparison of synthetic antigens for detecting antibodies to Phenolic Glycolipid 1 in patients with leprosy and their household contacts. *J Infec Dis* 1988 April; 157(4): 770-776.
9. Van Beers SM, Klatser PR, Madjid B, Day R, Wit MYL. Detection of *Mycobacterium leprae* nasal carriers in populations for which leprosy is endemic. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2947-51.

10. Oliveira MSA. Correlação entre a resposta imunocelular periférica e características imunohistoquímicas das lesões cutâneas nas formas polares da hanseníase [Tese de Doutorado]. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 1996.
11. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity: a five group system. *Int J Lepr* 1966; 34(3): 255-73.
12. Cossermelli MW, Cossermelli W. Humoral immunity in Hansen's disease. *Rev Paul Med* 1995 Jul; 113(4): 929-34.
13. Foss NT. Imunologia na Hanseníase. Capítulo a ser publicado.
14. Jacobson RR, Krahenbuhl JL. Leprosy. *Lancet* 1999 Feb; 353: 655-60.
15. Lefford MJ, Hunegnaw M, Siwik E. The value of IgM antibodies to PGL-1 in the diagnosis of leprosy. *Int J Lepr Other Mycobac Dis* 1991 Sept; 59(3): 432-40.
16. Kirsztajn GM, Nishida SK, Silva MS, Lombardi C, Ajzen H, Pereira AB. Specific and nonspecific aspects of humoral immune response in leprosy. *Braz J Med Biol Res* 1994; 27(1): 43-54.
17. Irangumaran S, Ramanathan S, Shankernarayan N, Ramu G, Muthukkauppan V. Immunological profiles of leprosy patients and healthy family contacts toward M. leprae antigens. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1996 March; 64 (1):6-14.
18. Agis F, Schlich P, Cartel JL, Guidi C, Bach M. Use of anti - M. leprae phenolic glycolipid-1 antibody detection for early diagnosis and prognosis of leprosy. *Int J Lepr Other Mycobac Dis* 1988 Dec; 56(4): 527-35.
19. Lal H, Jain KV, Mittal AR, Chaudhary DS, Saini V. Detection of antibodies to phenolic glycolipid 1 by ELISA in leprosy patients. *Indian J Lepr* 1993; 65(1): 95-9.
20. Roche PW, Britton WJ, Failbus SS, Neupane DK, Theuvenet JW. Serological monitoring of the response to chemotherapy in leprosy patients. *Int J Lepr* 1993; 61(1): 35-43.

21. Miller RA, Gorder D, Harnisch JP. Antibodies to phenolic glycolipid 1 during long term therapy: serial measurements in individual patients. *Int J Lepr Other Mycobac Dis* 1987 Dec; 55(4): 633-36.
22. Sulçebe G, Nakuci M. Anti-phenolic glycolipid 1 IgM antibodies in leprosy patients and in their household contacts. *Lepr Rev* 1990 Dec; 61(4): 341-6.
23. Levis WR, Meeker HC, Schuller LG, Sersen E, Schwere B. IgM and IgG antibodies to phenolic glycolipid 1 from *Mycobacterium leprae* in leprosy: insight into patient monitoring, erythema nodosum leprosum, and bacillary persistence. *J Invest Dermatol* 1986 May; 86(5): 529-34.
24. Stefani MM, Martelli CM, Morais NOL, Martelli P, Costa MB. Assesment of anti-PGL 1 as a prognostic marker of leprosy reaction. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1998; 66(3): 356-64.
25. Beers SM, Hatta M, Klatser PR. Sero-prevalence rates of antibodies to phenolic glycolipid-1 among schoolchildren as indicator of leprosy endemicity (submetido).
26. Buhner SS, Smits HL, Gussenhoven GC, Ingen CWV, Klatser PR. A simple dipstick assay for the detection of antibodies to phenolic glycolipid-I of *Mycobacterium leprae*. *Am J Trop Med* 1998; 58(2): 133-6.
27. Beuria MK, Parkash O, Joshi B, Mohanty KK, Katoch K, Sengupta U. Levels of IgG subclass in active and inactive cases in the disease spectrum of leprosy. *Int Arch Allergy Immunol* 1998 March; 115: 61-6.
28. Wright EP, Vlug A, Geertzen HGM, Long HT, Hong ND. Serum immunoglobulins, including IgG subclass, in vietnamese leprosy patients. *Int J Lepr* 1985; 53(2):225-32.
29. Kifayet A, Hussain R. IgG subclass recognition pattern in leprosy: recognition of *M. leprae* antigens by IgG1 and IgG3 antibodies is distinct across the disease spectrum. *Int J Lepr* 1996; 64(1): 69-78.

30. Chujor CSN, Bernheimer H, Levis WR, Schwerer B. Serum IgA1 and IgM antibodies against *Mycobacterium leprae* derived phenolic glycolipid-1: a comparative study in leprosy patients and their contacts. *Int J Lepr* 1991; 59(3): 441-9
31. Schwerer B, Chujor CSN, Bernheimer H, Rald J, Haaijman JJ, Meeker HC et al. IgA antibodies against phenolic glycolipid 1 from *Mycobacterium leprae* in serum of leprosy patients and contacts: subclass distribution and relation to disease activity. *Clin Exp Immunol* 1989; 52: 202-211.
32. Scotti AT, Minn R, Mackey DM, Trautman JR. Syphilis and biologic false positive reactors among leprosy patients. *Arch Derm* 1970 March; 101: 328-330.
33. Furukawa F, Kashihara M, Imamura S, Ohshio G, Hamashima Y. Evaluation of anticardiolipin antibody and its cross-reactivity in sera of patients with lepromatous leprosy. *Arch Dermatol Res* 1986; 278: 317-9.
34. Nsibambi JK. Leprosy and syphilis: a case report. *Lepr Rev* 1981 Oct; 52: 171-3.
35. Hojnik M, Gilburb B, Ziporen L, Blank M, Tomer Y, Scheinberg MA et al. Anticardiolipin antibodies in infections are heterogenous in their dependency on β_2 glycoprotein I: analysis of anticardiolipin antibodies in leprosy. *Lupus* 1994; 3:515-21.
36. Bhatia VN, Balakrishnan S, Harikrishnan S. Serological study for presence of C-Reactive Protein, Rheumatoid Factor, anti Streptolysin O in leprosy cases. *Lepr in Indian* 1983 Jan; 55(1): 86-90.
37. Harmerlinck FF. Neopterin: a review. *Exp. Dermatol* 1999; 8(3): 167-76.
38. Schmutzhard E, Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Wachter H. Is neopterin a marker of cell mediated immune response – Helpful in classifying Leprosy? *East African Medical Journal* 1986; 63(9): 577-580.
39. Hamerlinck FF, Klatser PR, Walsh DS, Bos JD, Walsh GP, Faber WR. Serum neopterin as a marker for reactional states in Leprosy. *Immunol Méd Microbiol* 1999; 24(4): 405-9.

40. The World Health report: elimination of leprosy in sight. Geneva; 1999. Report n. 70.
41. Noordeen SK. Action programme for the elimination of leprosy. Questions and answers on MDT. Geneva: World Health Organization; 1997: 01-36.
42. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico da Hanseníase. Brasil, 1999.
43. Secretaria de Estado da Saúde. Boletim Epidemiológico da Hanseníase. Santa Catarina; 1999.
44. Fischbach FL. Immunodiagnostic studies. In: Lippincott Williams & Wilkins. A Manual of Laboratory & Diagnostics Tests. Chapter 8, 1998.
45. Martelli CMT, Andrade ALSS, Grossi MAF, Leboeuf MAA, Lombardi C, Zicker F. Changes in leprosy clinical pattern after multidrug therapy implementation. *Int J Lepr Other Mycobac Dis* 1995 March; 63(1): 95-7.
46. Stites DP, Terr AI, Parslow TG. *Imunologia médica*. 2ª.edição. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 1997.
47. Sehgal VN, Bhattacharya SN, Shah Y, Sharma VK, Gupta CK. Reaction in Leprosy: acute phase reactant response during and after remission. *Int J Dermatol* 1992 Sept; 31(9): 632-4.
48. Cho S, Cellona RV, Fajardo TT, Abalos RM, Cruz EC, Walsh GP et al. Detection of phenolic glycolipid-1 antigen and antibody in sera from new and relapsed lepromatous patients treated with various drug regimens. *Int J Lepr* 1991; 59(1):25-31.
49. Gelber RH, Li F, Cho SN, Byrd S, Rajagopalan K, Brennan PJ. Serum antibodies to defined carbohydrate antigens during the course of treated leprosy. *Int J Lepr* 1989; 57(4): 744-751.
50. Roche PW, Britton WJ, Neupane KD, Failbus SS, Cho SN, Theuvenet WJ. The response to chemotherapy of serum mycobacterium leprae-specific antigen in multibacillary patients. *Am J Trop Med Hyg* 1991 Jun; 44(6): 702-708.

51. Jakeman P. Risk of relapse in multibacillary leprosy. *Lancet* 1995; 345: 4-5.
52. Lien RA, Faber WR, Rens MM, Leiker DL, Naafs B, Klatser PR. Follow-up multibacillary leprosy patients using a phenolic glycolipid-1 based ELISA. Do increasing ELISA-values after discontinuation of treatment indicate relapse? *Lepr Rev* 1992; 63(1): 21-7.
53. Chen XS, Jiang C. Studies on risk of leprosy relapses in China: relapses after treatment with multidrug therapy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1999 Dec; 67(4):379-87.
54. Saad MHF, Medeiros MA, Gallo MEM, Fonseca LS. Use of the anti PGL-1 antibody ELISA and the Mitsuda reaction in early diagnosis of leprosy. *Braz J Med Biol Res* 1991; 24(8): 801-5.
55. Kajihara H, Paturusi IA, Saleh RM, Rasyad C, Ikuta Y. Light and electron microscopic study of peripheral nerve damage in patients with lepromatous leprosy(LL) and borderline lepromatous leprosy (BL). *Hiroshima J Méd Sci* 2000 Mar; 49 (1): 83-92.
56. John TJ. Leprosy beyond the year 2000. *Lancet* 1998; 351: 756-60.
57. Filho GI. Soropositividade ao antígeno PGL-I em comunicantes domiciliares de hansenianos bacilíferos na região da grande Florianópolis. UFSC 1995: 01-20.
58. Foss NT. Anti-PGL1 levels in leprosy patients and their contacts. *Braz J Med Biol Res* 1993 Jan ; 26(1): 43-51.
59. Chaudhuri S, Hajra SK, Mukherjee A, Saha B, Mazumder B, Chattapadhy D et al. Why relapse occurs in PB leprosy patients after adequate MDT despite they are Mitsuda reactive: lessons form Convit's experiment on bacteria-clearing capacity of lepromin-induced granuloma. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1998 Jun; 66(2): 182-9.
60. Ulrich M, Smith PG, Sampson C, Zuniga M, Centeno M, Garcia V et al. IgM Antibodies to Native Phenolic Glycolipid-1 in contacts of Leprosy patients in Venezuela: epidemiological observations and a prospective study on the risk of Leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1991 Sept; 59(3): 405-15.

61. Dhandayuthapani S, Anandan D, Bhatia VN. Elisa & lepromin skin tests in household contacts of leprosy patients. *Indian J. Med Res* 1990; 91: 431-6.
62. Baumgart K, Britton W, Basten A, Bagshawe A. Use of phenolic glycolipid-I for serodiagnosis of leprosy in a high prevalence village in Papua New Guinea. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*; 81: 1030-2.
63. Vaishnavi C, Agnihotri N, Ganguly NK, Kaur S, Kumar B. Acute phase reactants in Leprosy *Microbiol Immunol* 1991; 35(11): 975-80.
64. Memon RA, Hussain R, Raynes JG, Lateff A, Chiang TJ. Alterations in serum lipids in lepromatous leprosy patients with and without ENL reactions and their relationship to acute phase proteins. *Int J Lepr* 1996; 64(2): 115-22.
65. Haimanot RT, Melaku Z. Leprosy. *Curr. Opin. Neurol.* 2000 Jun; 13(3): 317-22.
66. Scollard DM. Association of *Mycobacterium Leprae* with human endothelial cells in vitro. *Scollard: Lab Invest* 2000 May; 80(5): 663-9.
67. Genç M, Ledger WJ. Syphilis in pregnancy. *Sex Transm Infect* 2000 April; 76(2): 73-4.
68. Ministério da Saúde. Manual de DST/Aids. Brasil, 1999.
69. Sousa AO, Henry S, Marója FM, Lee FK, Brum L, Singh M et al. IgG subclass distribution of antibody responses to protein and polysaccharide mycobacterial antigens in leprosy and tuberculosis patients. *Clin Exp Immunol* 1998; 111(1):48-55.
70. Ochoa MT, Valderrama L, Ochoa A, Zea A, Escobar CE, Moreno LH et al. Lepromatous and Tuberculoid leprosy: clinical presentation and cytokine responses. *Int J Dermatol* 1996; 35(11): 786-90.
71. Valverde CR, Canfield D, Tarara R, Esteves MI, Gormus BJ. Spontaneous leprosy in a wild-caught *Cynomolgus* macaque. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1998 Jun; 66(2):140-8.

ANEXOS

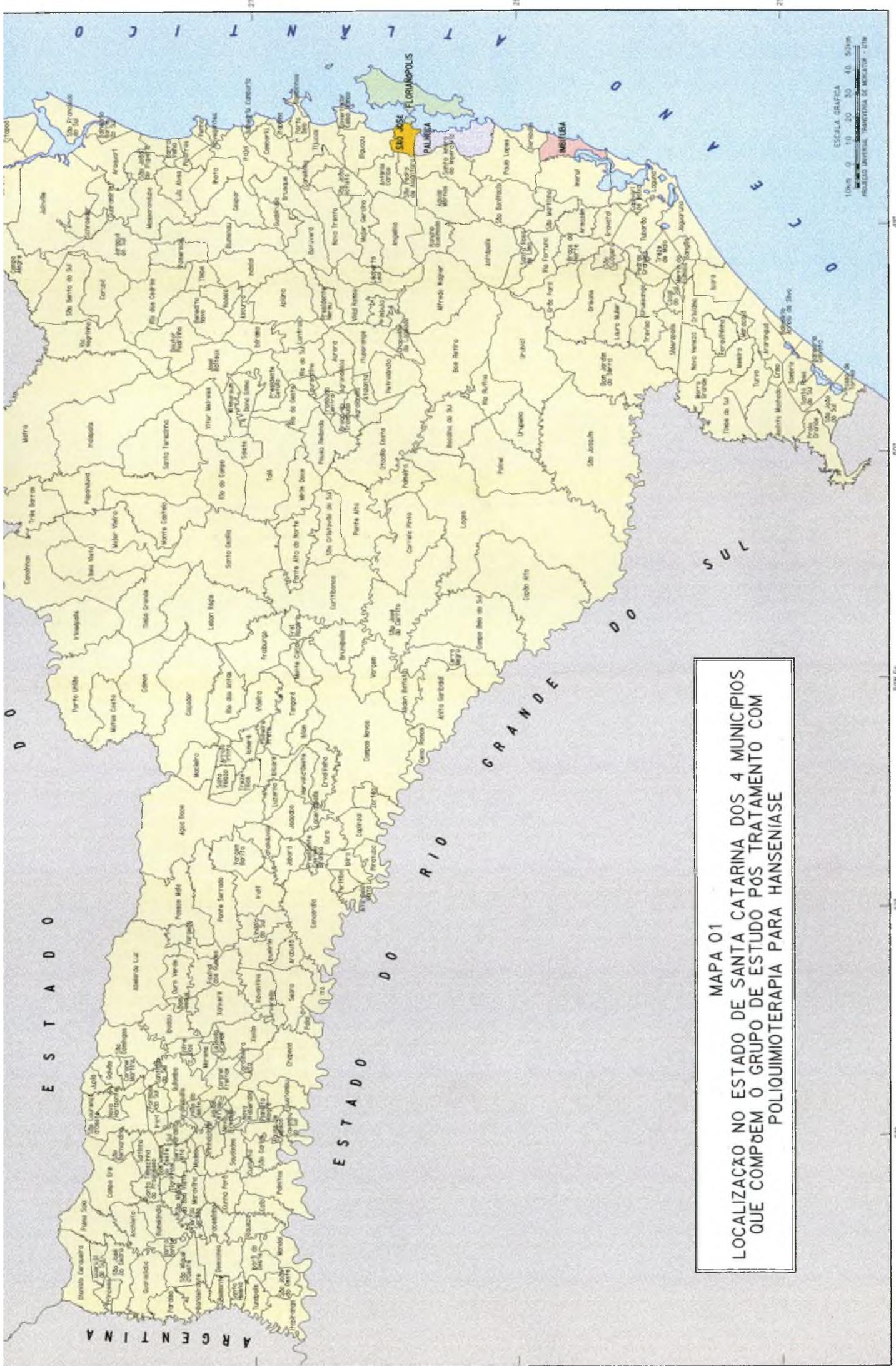
ANEXO 1 – TAXA DE PREVALÊNCIA E DETECÇÃO – BRASIL 1998

UF	PREVALÊNCIA (a)		DETECÇÃO (b)	
	Nº	COEF./10.000	Nº	COEF./10.000
BRASIL	78.068	4,88	42.055	2,60
NORTE	16.588	13,98	9398	7,92
RO	1.540	12,07	1.118	8,76
AC	549	10,68	344	6,69
AM	3220	12,77	1.339	5,31
RR	400	15,34	281	10,78
PA	8.854	15,35	4.934	8,55
AP	394	9,36	176	4,18
TO	1.631	14,72	1.206	10,89
NORDESTE	24.636	5,58	14.015	3,06
MA	8640	16,13	4.254	7,94
PI	2.047	7,54	1.373	5,06
CE	3.370	4,81	2.576	3,67
RN	432	1,65	206	0,78
PB	941	2,81	486	1,45
PE	6.621	8,80	2.762	3,67
AL	308	1,15	195	0,73
SE	733	4,42	349	2,07
BA	2.277	1,77	1.814	1,41
SUDESTE	19.970	2,90	9.492	1,38
MG	6.480	3,79	2.845	1,66
ES	1.865	6,44	1.189	4,11
RJ	6.015	4,40	3.278	2,40
SP	5.610	1,59	2.180	0,62
SUL	5.401	2,24	1.847	0,76
PR	4.484	4,84	1.482	1,60
SC	452	0,90	191	0,38
RS	465	0,47	174	0,18
CENTRO-OESTE	11.473	10,43	7.303	6,64
MT	3.801	16,30	2.754	11,81
MS	1.278	6,40	647	3,24
GO	6.017	12,68	3.592	7,57
DF	377	1,96	310	1,61

FONTE: CNDS/CENEPI/FNS/MS; SES

Obs.: (*) Dados sujeitos a revisão

NOTAS: (a) PARÂMETROS PARA AVALIAÇÃO DOS COEFICIENTES DE PREVALÊNCIA: HIPERENDÊMICO 15 CASOS/ 10.000 INH; MUITO ALTO 10 – 15 CASOS / 10.000 INH; ALTO – 5 – 10 CASOS / 10.000 INH; MÉDIO 1 – 5 CASOS / 10.000 INH; BAIXO – < 1 CASOS / 10.000 INH. (b) PARÂMETROS PARA AVALIAÇÃO DOS COEFICIENTES DE DETECÇÃO: HIPERENDÊMICO 4 CASOS/ 10.000 HAB; MUITO ALTO 2 – 4 CASOS / 10.000 HAB; ALTO – 1– 2 CASOS / 10.000 INH; MÉDIO – DE 0,2 – 1 CASOS / 10.000 INH; BAIXO – < 0,2 CASOS / 10.000 INH.



MAPA 01
 LOCALIZAÇÃO NO ESTADO DE SANTA CATARINA DOS 4 MUNICÍPIOS
 QUE COMPÕEM O GRUPO DE ESTUDO PÓS TRATAMENTO COM
 POLIQUIMIOTERAPIA PARA HANSEÍASE

PA 02 : LOCALIZAÇÃO DOS PONTOS DE COLETAS DO GRUPO 1 NO MUNICÍPIO DE FLORIANÓPOLIS-SC



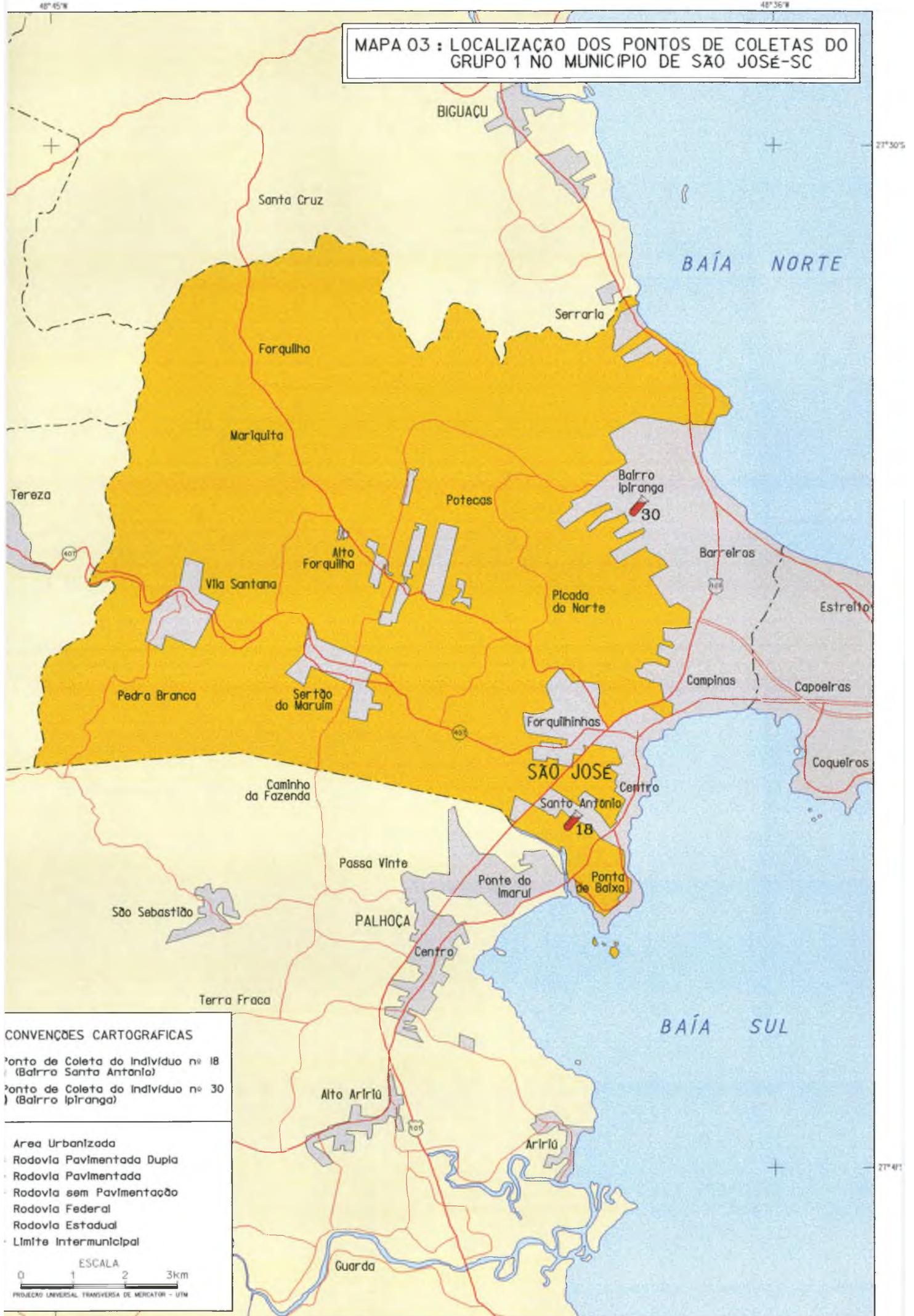
CONVENÇÕES CARTOGRAFICAS

- 1 Ponto de Coleta do Indivíduo nº 1 (Alto Ribeirão)
- 2 Ponto de Coleta do Indivíduo nº 2 (Alto Ribeirão)
- 3 Ponto de Coleta do Indivíduo nº 3 (Morro das Pedras)
- 4 Ponto de Coleta do Indivíduo nº 4 (Costeira do Pirajubaé)
- 5 Ponto de Coleta do Indivíduo nº 5 (Capoeiras)
- 6 Ponto de Coleta do Indivíduo nº 6 (Agronômica)
- 7 Ponto de Coleta do Indivíduo nº 7 (Agronômica)
- 10 Ponto de Coleta do Indivíduo nº 10 (Estrelito)
- 15 Ponto de Coleta do Indivíduo nº 15 (Centro)
- 16 Ponto de Coleta do Indivíduo nº 16 (Rio Tavares)
- 17 Ponto de Coleta do Indivíduo nº 17 (Saco dos Limões)
- 31 Ponto de Coleta do Indivíduo nº 31 (Baleário do Estrelito)
- 32 Ponto de Coleta do Indivíduo nº 32 (Costeira do Pirajubaé)

- Area Urbanizada
- Rodovia Pavimentada Dupla
- Rodovia Pavimentada
- Rodovia sem Pavimentação
- Rodovia Federal
- Rodovia Estadual
- Limite Intermunicipal

ESCALA
0 3000 6000m
PROJEÇÃO UNIVERSAL TRANSVERSA DE MERCATOR - UTM

MAPA 03 : LOCALIZAÇÃO DOS PONTOS DE COLETAS DO GRUPO 1 NO MUNICÍPIO DE SÃO JOSÉ-SC



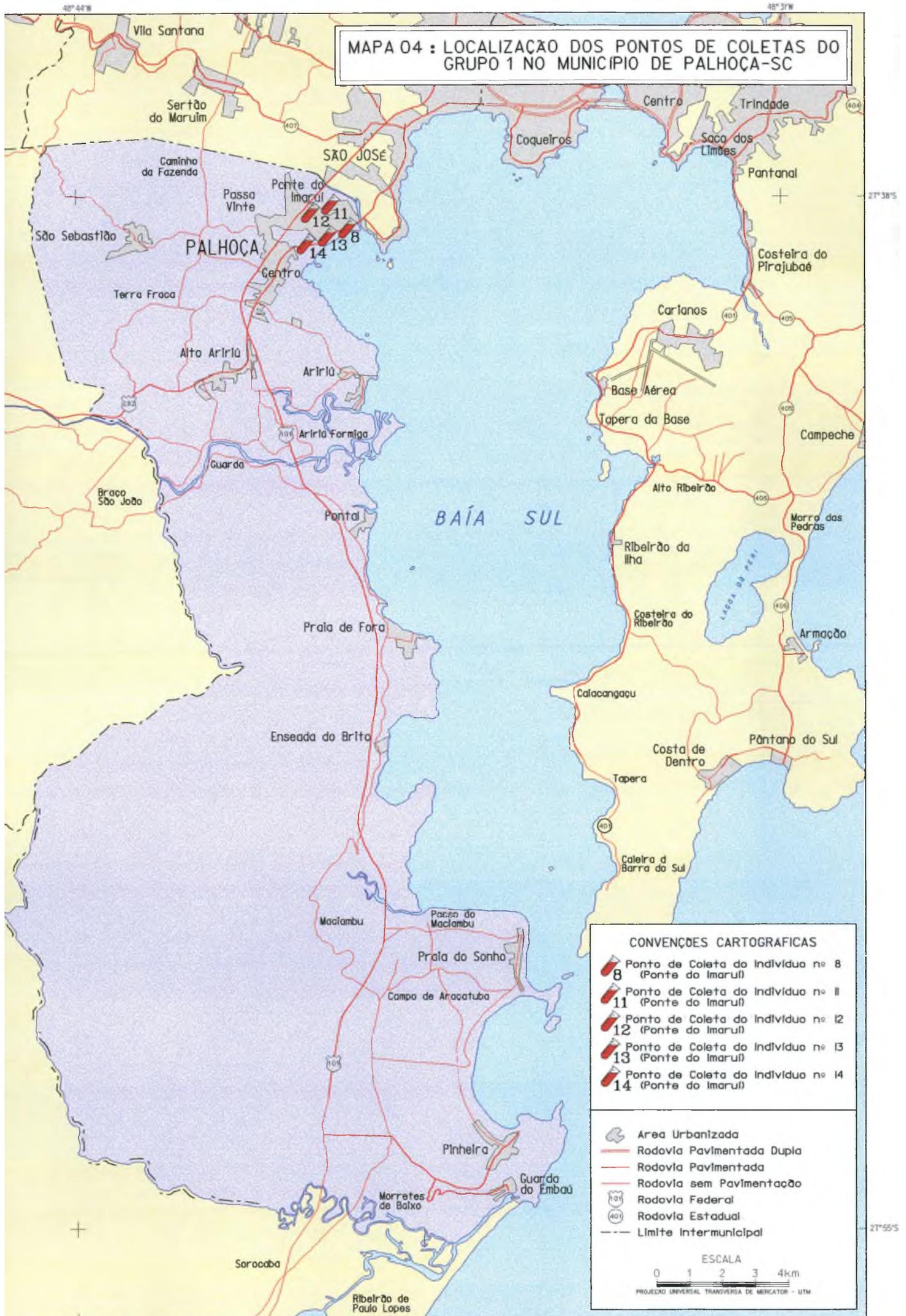
CONVENÇÕES CARTOGRAFICAS

- Ponto de Coleta do Indivíduo nº 18 (Bairro Santa Antonia)
- Ponto de Coleta do Indivíduo nº 30 (Bairro Ipiranga)

- Área Urbanizada
- Rodovia Pavimentada Dupla
- Rodovia Pavimentada
- Rodovia sem Pavimentação
- Rodovia Federal
- Rodovia Estadual
- Limite Intermunicipal



MAPA 04 : LOCALIZAÇÃO DOS PONTOS DE COLETAS DO GRUPO 1 NO MUNICÍPIO DE PALHOÇA-SC



CONVENÇÕES CARTOGRAFICAS

- Ponta de Coleta do Indivíduo nº 8 (Ponte do Imaré)
- Ponta de Coleta do Indivíduo nº 11 (Ponte do Imaré)
- Ponta de Coleta do Indivíduo nº 12 (Ponte do Imaré)
- Ponta de Coleta do Indivíduo nº 13 (Ponte do Imaré)
- Ponta de Coleta do Indivíduo nº 14 (Ponte do Imaré)

- Área Urbanizada
- Rodovia Pavimentada Dupla
- Rodovia Pavimentada
- Rodovia sem Pavimentação
- Rodovia Federal
- Rodovia Estadual
- Limite Intermunicipal

ESCALA
0 1 2 3 4km
PROJEÇÃO UNIVERSAL TRANSVERSA DE MERCATOR - UTM

ANEXO 7 – QUESTIONÁRIO

1–Nome:

2–Endereço:

4–Sexo: 1–Masculino 2– Feminino

5–Idade:

6–Classificação Clínica:

7–Classificação Histopatológica:

7–Índice Baciloscópico:

8– Leitura do teste de Mitsuda na época do diagnóstico:

9– Uso de medicações imunossupressoras:

10– Presença de formas reacionais: 1– Reação Reversa:

2– Eritema nodoso:

12–História prévia de tratamento para sífilis:

13–Presença de testes treponêmicos e/ou não treponêmicos prévios (análise de prontuário):

ANEXO 8 – PROCEDIMENTOS PARA REALIZAÇÃO DO ELISA ND-O-BSA – KIT

Preparo das soluções de uso:

- Solução tampão de Bicarbonato Carbonato (tampão de cobertura) com pH 9,6 (0,2).

Na ₂ CO ₃	0,3980g
NaHCO ₃	0,7330g
H ₂ O destilada /deionizada).....	qsp 250ml

OBS: Manter na temperatura de 4° C e usar no prazo máximo de 2 semanas.

- Tampão Salina Fosfato (PBS) com pH 7,4 (0,2) . Protocolo original da OMS

Na ₂ HPO ₄	25,6000g
NaHPO ₄ + H ₂ O	6,0300 g
NaCl	0,5800 g
H ₂ O (destilada/deionizada)	qsp 2000 ml

- PBSTWEEN a 0,1% (polioxietileno sorbitano monolaurato), (Art.82214 MERK).

Tween-20	2ml
PBS.....	2000ml

- Solução de PBST com soro normal de cabrito (NGS). NGS (Marca: Gibco).

Solução a 10% em PBSTWEEN :

PBStween a 0,1%	90ml
NGS	10ml

OBS: A solução deverá ser preparada e congelada

- Solução de PBST a 1% de soro albumina bovino (BSA). BSA (Marca: SIGMA)

PBStween a 0,1%	100ml
BSA	1,0g

- Ácido Sulfúrico 2,5 N – fazer os cálculos de acordo com o reagente utilizado

H ₂ SO ₄ (P.A)	70 ml
H ₂ O (destilada/deionizada)	930ml

- Conjugado (Marca: Cappel): Conjugado de Peroxidase com anti IgM humana

Procedimento de Dosagem

Procedimento de cobertura da placa

1- Para o teste, adicionar 50µl de ND-O-BSA (PGL-1) por poço diluído em tampão de cobertura 1:500, nas linhas A,B,E e F, mas não nos poços de A1 a H1 (poços para o branco).

OBS.: Diluição para uma placa – 5µl de ND-O-BSA para 2,5ml de tampão de cobertura.

2- Adicionar 50µl de BSA por poço, diluído em tampão de cobertura 1:500 nas linhas C,D,G e H, mas não nos poços A1 a H1 .

OBS: Diluição para uma placa – 5µl de BSA para 2,5ml de tampão de cobertura.

3- Incubar a(s) placa(s) a 37° C em banho-maria por toda noite (*overnight*).

Procedimento de doseamento

4- Lavar a(s) placa(s) por 4 vezes com PBST e, após, “bater” bem a(s) mesma(s) para retirar bem o líquido.

5- Adicionar 100µl por poço de solução bloqueadora (PBS a 1% de BSA) em toda a placa com exceção da linha 1 que é utilizada como branco. Volume total da placa: 9,6 ml.

6- Incubar a 37° C por 1 hora.

7- Retirar a solução bloqueadora batendo, virando a placa e colocando a mesma emborcada em papel absorvente até seu uso.

8- Adicionar 50µl de soro em análise diluído (1:300) em PBST a 10 % de NGS. EX: 5µl em 1,5ml.

OBS: Ter sempre em cada placa soro padrão (standard), soros controle positivo e negativo.

A diluição, tanto do soro padrão como dos soros positivo e negativo, é idêntica ao soro em análise (1:300).

9- Distribuir as amostras nos poços conforme diagrama de teste.

10- Incubar a 37° C por 1 hora.

11- Lavar a(s) placa(s) por 4 vezes com PBST e após a lavagem, “bater” bem a(s) mesma(s) para retirar o líquido.

12– Adicionar 50µl de conjugado anti IgM humana ligado a peroxidase diluído (1:2000) em PBST a 10% de NSG. Adicionar em toda a placa exceto na linha 1 (branco).

Diluição do conjugado para uma placa: 2,5µl de anti IgM humana + 5ml de PBST 10% NSG.

13– Incubar a 37° C por 1 hora.

14– Lavar a(s) placa(s) por 4 vezes com PBST e, após a lavagem, “bater” bem a(s) mesma(s) para retirar o líquido.

15– Adicionar 50µl do substrato TMB Sigma (3,3', 5'5 – Tetramethylbenzidine) – T 8665.

16– Incubar em temperatura ambiente e no escuro por aproximadamente 30'.

17– Parar a reação quando ao adicionar 50µl da solução de ácido sulfúrico 2,5N de H₂SO₄ no soro padrão, apresentar absorvância de 0,600, em 450nm.

Cálculos

- a) Somar os valores de cada amostra das linhas A e B, dividir por 2 e anotar o resultado.
- b) Somar os valores de cada amostra das linhas C e D, dividir por 2 e anotar o resultado.
- c) Somar os valores de cada amostra das linhas E e F, dividir por 2 e anotar o resultado.
- d) Somar os valores de cada amostra das linhas G e H, dividir por 2 e anotar o resultado.
- e) O resultado final é obtido diminuindo a média do valor encontrado para BSA da média do valor encontrado para o antígeno. Isto significa que as ligações não específicas são descontadas.

**ANEXO 9 – TESTE RÁPIDO DE FITA (ML DIPSTICK) PARA DETECÇÃO DE AC
SÉRICO IGM ANTI PGL-1 EM SERES HUMANOS
(APENAS PARA USO EM PESQUISA)**

Instruções de uso

1– REAGENTES.

- I. Fluido de reconstituição (Frasco A).
- II. Reagente detector liofilizado (Frasco B).
- III. Fluido para o Dipstick (Frasco C).
- IV. Dipstick contendo, em uma fita branca, uma banda de Ag PGL-1 (banda inferior) e uma banda de controle interno (banda superior).

Aviso: o fluido de reconstituição e o fluido para o Dipstick contêm Azoteto de Sódio. Cuidado para não ingerir e evite contato com a pele.

2– ACONDICIONAMENTO

Cada tubo contém 20 dipstick e suficientes reagentes para analisar 20 soros.

3– ARMAZENAMENTO

Dipsticks e reagentes devem ser guardados a + 4°C até 37°C, em lugar seco e protegidos de exposição direta da luz solar. Armazenamento entre + 4°C até 25°C é recomendado para o reagente detector após ser reconstituído. Quando armazenado a esta temperatura o reagente reconstituído mantém sua capacidade reativa por um mês.

4– PROCEDIMENTO PADRÃO DO TESTE

1– Abra os Frascos A e B. Adicione 5ml do fluido de reconstituição (Frasco A) no reagente detector liofilizado (Frasco B). Feche o Frasco B e misture com movimentos rotativos até dissolver completamente (aproximadamente 5 a 10 min).

NOTA: talvez forme um leve precipitado no fundo do Frasco B com o armazenamento. Antes de usar, misture o conteúdo do frasco muito bem com movimentos rotativos até que todo material tenha sido dissolvido.

2– Transferir 200µl do reagente detector reconstituído em tubo de teste marcado.

3– Adicione 4µl de soro no tubo de reação contendo o reagente detector e misture.

4– Segure um dipstick pela parte mais fina e remova-o do tubo.

NOTAS: a. Não toque ou dobre a fita do teste, ou seja, a parte mais espessa com a nitrocelulose.

b. Contaminação da fita de nitrocelulose com vestígio de sangue pode produzir resultado falso positivo. Contaminação pode ocorrer no manuseio de líquidos contendo soro diluído e/ou ao abrir os tubos de Ependorf com o soro.

5– Abra o Frasco C. Previamente umedeça a fita do teste emergindo o final branco do dipstick por alguns segundos no fluido do dipstick (Frasco C). Remova o excesso do líquido esfregando o dipstick contra o gargalo do Frasco C e transfira o dipstick pré-umedecido para o tubo de teste contendo a mistura do reagente detector reconstituído e o soro.

NOTA: colocando o dipstick seco na mistura do reagente detector reconstituído com soro, sem molhar previamente a fita branca do teste, resultaria em elevada coloração de fundo.

6– Incubar a fita pré-umedecida do dipstick na mistura do reagente detector e soro em temperatura ambiente por 3 horas. Certifique-se de que a fita esteja completamente submersa.

NOTA: o procedimento acima foi desenhado e otimizado para ser realizado entre 18°C e 25°C.

7– Feche o tubo contendo os dipsticks; feche os Frascos B e C e armazene a + 4°C a 25°C para uso futuro (reinicie no item 2).

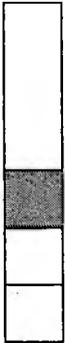
8– Remova o dipstick da mistura do reagente detector com o soro e lave-o brevemente em água de torneira corrente.

9– Coloque a fita do teste sobre uma toalha de papel e deixe secar ao ar.

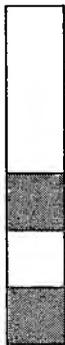
10– Interprete o resultado quando a fita de teste estiver completamente seca, para assegurar uma leitura ideal.

5- INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS DO TESTE

Coloração na banda do antígeno (banda inferior) é consistente com a presença de Ac IgM para PGL-I do *M. leprae*. A banda de controle interno (banda superior) deverá sempre ser colorida, senão será invalidado o teste.



Teste negativo



Teste positivo

ANEXO 10 – MÉTODO QUANTITATIVO DO TESTE DO VDRL (VENERAL DISEASE RESEARCH LABORATORY)

Material:

1. agitador mecânico, ajustável até 180 r.p.m., circunscrevendo um círculo de aproximadamente 3/4 de polegada, num plano horizontal;
2. placa de Kline, com 12 escavações, cada uma com aproximadamente 14 mm de diâmetro;
3. agulhas hipodérmicas de 18-, 19- e 23-gauge;
4. frasco de fundo chato, com tampa, de 30 ml;
5. Ag de VDRL (BioVDRL[®], Biolab-Mérieux): Solução alcoólica contendo 0,03% de cardiopina, 0,95 de colesterol e 0,21% de lecitina purificada, para a atividade padrão). Todo Ag deve estar previamente padronizado sorologicamente, por comparação com um Ag de reatividade conhecida. O Ag é então estocado no escuro, à T de 6 – 10 °C, em frasco hermeticamente fechado);

Método:

- a) preparo da suspensão de Ag: Pipetar 0,4 ml de salina tamponada e colocar no fundo do frasco de 30 ml;
- b) adicionar 0,5 ml do Ag diretamente na salina, gota a gota, e sob agitação circular, por cerca de 6 segundos. Continuar a rotação por mais 10 segundos e adicionar 4,1 ml de salina tamponada. Fechar o frasco e agitá-lo, do fundo para o topo, 3 vezes por segundo. Este Ag está pronto para uso, por no máximo 24 horas;
- c) preparo do soro: após separação, o soro é inativado a 56 ° C por 30 minutos. Se não for usado dentro de 4 horas após a inativação, reaqueça na mesma temperatura por 10 minutos. O soro deve ser testado à temperatura ambiente;
- d) diluição do soro para teste: o soro é utilizado puro e nas diluições seriadas de 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32, 1:64, e assim sucessivamente;
- e) procedimento: pipetar 0,05 ml de soro, para cada uma das diluições, e colocar em uma das escavações da Placa de Kline. A seguir, colocar uma gota da suspensão do Ag, utilizando uma agulha de 18-gauge, em cada uma das escavações. Em 3 das escavações colocar, respectivamente, 0,05 ml de um soro controle negativo, 0,05 de um soro fracamente positivo e 0,05 de um soro fortemente positivo;

- f) colocar a Placa no agitador mecânico, por aproximadamente 4 minutos, nas condições ideais de rotação;
- g) ler imediatamente, sob microscopia óptica, em aumento de 100 x;
- h) interpretação: 1) sem floculação: Não Reativo; 2) floculação de grumos pequenos: Fracamente Reativo; 3) floculação de grumos médios ou grandes: Reativo. A maior diluição em que o soro ainda é reativo é denominada Título;
- i) cuidados: sempre testar as várias diluições do soro, para evitar o fenômeno de Pró-zona.

ANEXO 11 – TESTE IMUNOLÓGICO PARA PESQUISA DE ANTÍGENOS TREPONÊMICOS POR IMUNOFLOURESCÊNCIA INDIRETA (FTA–ABS, IMUNOPALLIDUM® – BIOLAB–MÉRIEUX)

Material:

1. microscópio de fluorescência, com epi-iluminação, marca Nikon;
2. solução de azul de Evans a 10 mg/100ml (solução estoque, em PBS, pH 7,2);
3. glicerina tamponada;
4. micropipetas de 10, 20 e 25 µl;
5. lâminulas de 24 x 60 mm.
6. kit Imunopallidum.

Método:

- a) coletar o sangue por Vacuntainer sem anticoagulante. Separar o soro e inativá-lo a 56° C, por 30 minutos;
- b) reidratar, com 1 ml de água destilada, a suspensão liofilizada de *T. pallidum*, cepa de Nichols, cultivada "in vivo" em testículos de coelhos (Imunopallidum®);
- c) distribuir a suspensão em lâmina, 5 a 10 µl/ círculo, mantendo-a sob agitação lenta, para distribuição uniforme dos treponemas, na área delimitada da lâmina. Secar a 37° C, em estufa bacteriológica, por 40 minutos. Armazenar as lâminas a – 75 ° C, devidamente identificadas;
- d) reidratar, com 5 ml de água destilada, o Sorbent (Imunopallidum®), distribuir em alíquotas de 100 µl e congelar a – 20 ° C;
- e) diluir, no momento de uso, o Fluoline (Imunopallidum®), desprezando o excesso. Verificar o título do lote em questão;
- f) diluir o azul de Evans a 1/10, em PBS pH 7,2;
- g) misturar 9 partes de glicerina com 1 parte de tampão carbonato–bicarbonato de sódio a 0,5 M, pH 8,5;
- h) absorver as amostras a serem dosadas a 1/5 no Sorbent Imunopallidum®;
- i) transferir 20 µl de cada amostra para cada uma das áreas delimitadas da lâmina. Incluir 2 soros controles (Reagente e Não Reagente, padronizados), além de controle do conjugado (20 µl de PBS) e do Sorbent (20 µl de Sorbent);
- j) incubar em câmara úmida a 37 ° C por 30 minutos;

- k) lavar por imersão duas vezes, em PBS, por 5 minutos de cada vez. Retirar o excesso de sais por lavagem rápida em água destilada;
- l) secar a lâmina entre duas folhas de papel de filtro, com suavidade;
- m) transferir para cada uma das áreas delimitadas 20 µl de Fluoline, diluído de acordo com o título encontrado. Repetir as passagens anteriores de lavagens;
- n) adicionar a glicerina tamponada, colocar a lamínula e retirar o excesso de glicerina por compressão leve, utilizando papel de filtro, evitando a formação de bolhas;
- o) efetuar a leitura sob microscopia de fluorescência no máximo dentro de 24 horas.

Leitura:

- 1) verificar a fluorescência dos controles (conjugado, Sorbent; soros negativo e positivo);
- 2) reagente: treponemas apresentando fluorescência verde brilhante, mais ou menos intensa. Não Reagente: ausência de fluorescência ou fraca coloração esverdeada dos treponemas (verde fosco).

ANEXO 12 – ELETROFORESE DE PROTEÍNAS

1- MATERIAL E REAGENTES

1-1. solução de metanol a 40%;

1-2. fonte de energia.

Transforma a corrente alternada da rede elétrica em rede contínua e regula amperagem e voltagem que devem ser aplicadas na cuba eletroforética. Muitas cubas já possuem a fonte de energia acoplada.

1-3. tampão barbital 0,05M – pH 8,6.

Fator determinante na mobilidade eletroforética é a força iônica da solução tampão, ou seja, a absorção específica dos íons de carga contrária ou ainda como eles estão arrançados ao redor dos sítios carregados da molécula protéica. A força iônica tem, portanto, relação direta com a concentração de íons do sistema tampão. A força iônica normalmente utilizada está entre 0,025 e 0,100.

1-4. cuba eletroforética.

Existem inúmeros tipos, normalmente feitas de plástico ou acrílico. Possuem uma separação ao meio tendo de cada lado um eletrodo.

1-5. ponte eletroforética.

É o suporte de plástico ou acrílico para a fita.

1-6. suporte: acetato de celulose úmidas;

1-7. aplicadores: próprios (micro aplicadores);

1-8. soro;

1-9. corante;

Ponceau S ————— 0,5g

Ácido tricloroacético 5% ————— 100ml

1-10. descorante;

Ácido acético 5%

1-11. desidratante;

Metanol p. a.

1-12. solução transparentizadora ou diafanizadora;

Metanol p.a. _____ 21,75ml

Ácido acético p.a. _____ 3,00ml

Glicerol _____ 0,25ml

1-13. densitômetro: marca Celm DS125;

2- PROCEDIMENTO PRÁTICO

2.1. Preparação da cuba:

- colocar a solução tampão na cuba, numa quantidade que toque as pontas das fitas, tomando o cuidado de equalizar os dois compartimentos;
- iniciar a eletroforese apenas quando o tampão atingir a temperatura ambiente.

2-2. Preparação das fitas:

- as fitas vêm submersas em uma solução de metanol a 40%, e depois de aberto o cartucho estas deverão ser transferidas para um recipiente, contendo esta mesma solução e armazenadas em geladeira;
- retirar da solução o número de fitas necessárias para o número de amostras (considerando-se que até 3 amostras poderão ser aplicadas por fita) e remover o excesso de metanol entre duas folhas de papel de filtro;
- mergulhar as fitas na solução tampão no mínimo 10 minutos e no máximo 24 horas, e remover o excesso de tampão entre duas folhas de papel de filtro;
- marcar os números das amostras na fita com caneta esferográfica.

2-3. Realização da corrida:

- colocar as fitas esticadas e retas no suporte, de tal modo que cada extremidade toque o tampão, observando que o lado picotado fique à direita do operador;
- aplicar com cuidado a amostra, utilizando o aplicador de amostra. Fazer a aplicação a aproximadamente 1,0 cm do suporte;

- aguardar o tempo necessário para absorção da amostra;
- colocar a ponte eletroforética na cuba, observando que o lado picotado fique imerso no pólo negativo (cátodo);
- tampar a cuba e ligar a fonte;
- estabelecer o tempo da corrida eletroforética (40 minutos);
- desligar a fonte e retirar cuidadosamente as fitas.

2-4. Visualização do fracionamento de proteínas:

- deixar as fitas mergulhadas na solução corante por 10 minutos;
- decorridos os 10 minutos, passe as fitas por banhos de descorante (5 minutos cada) até que o excesso de corante seja retirado.

2-5. Transparentização da fita:

- embeber as fitas descoradas em metanol p. a., por 1 a 2 minutos;
- transferir as fitas para a solução transparentizadora (que deverá ser preparada na hora) por 1 a 2 minutos;
- esticar as fitas sobre uma placa de vidro 20x20cm (temperatura de aproximadamente 37 ° C), evitando a formação de bolhas. Levar esta placa a uma estufa, regulada previamente para uma temperatura de 45-50 ° C, por aproximadamente 5 minutos (até a transparentização ideal);
- inverter esta placa, ainda quente com as fitas, em cima de uma folha de papel de filtro até esfriar à temperatura ambiente.

2-6. Eletroforese quantitativa: densitometria:

A densitometria consiste de leitura automática da densidade de cor da fração corada quando esta é colocada frente a um feixe de luz. Parte deste feixe é transmitida e parte é absorvida. A luz transmitida é captada por uma fotocélula. O equipamento, em seguida, faz uma integração matemática da área equivalente àquela fração, emitindo um gráfico e os resultados percentuais correspondentes. O aparelho permite a obtenção do resultado em g/dl, para tanto é necessário quantificar proteínas totais de todas as amostras pelo método do biureto (Labtest Diagnóstica S.A).

ANEXO 13 – NEOPTERINA

Material incluído no kit:

- Solução tampão fosfato (PBSA), pronto para uso (18 ml/100ml).
- Doze Placas cobertas com anti soro de coelho
- Conjugado de Peroxidase com Neopterina diluído com BSA, 1:201 (1 ml).
- Antisoro anti neopterina de coelho, em BSA com estabilizadores (8 ml).
- Soros padrões A-F, com Neopterina em BSA e estabilizadores (0,5ml/cada)

Concentrações:

Padrão	A	B	C	D	E	F
nmol/l	0	1,35	4,0	12,0	37,00	111

- Soros controles 1 e 2 com 0,5ml cada, pronto para uso.
- Solução de PBS com Tween (PBST) e estabilizadores, diluído com água destilada, 1:20 (50ml/100ml)
- Solução com tetrametilbenzidina (TMB) diluído no tampão substrato (1:31).
- Tampão substrato com hydroxigenperoxidases em tampão de citrato. Manter protegido da luz (30ml / 2x90 ml)
- Solução com ácido sulfúrico, pronto para uso (15ml/75ml).

Procedimento de doseamento:

- 1- Pipetar 10 μ l de cada soro padrão, controles e das amostras nos poços correspondentes na placa.
- 2- Adicionar 100 μ l do conjugado enzimático e após 50 μ l de antisoro anti neopterina em cada poço.
- 3- Cobrir a placa com adesivo e deixar 90 min em temperatura ambiente e no escuro, agitando delicadamente.
- 4- Remover a solução de todos os poços invertendo a placa e batendo bem, 2 ou 3 vezes. Lavar as placas três vezes com PBSAT. Remover a solução por aspiração e após virar a placa, batendo sobre um papel absorvente, para retirar o excesso.
- 5- Adicionar 200 μ l do substrato (TMB) em cada poço.
- 6- Incubar em temperatura ambiente por 10 minutos.

- 7- Parar a reação adicionando 100 μ l da solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄). A coloração dos poços mudará de azul para amarelo.
- 8- Agitar gentilmente a placa.
- 9- Leitura da densidade óptica (D.O) com filtro de 450nm.
Cálculo dos resultados é realizado utilizando gráfico semilogarítimo, estando as D.O na abscissa e as concentrações de neopterina (nmol/l) na ordenada.

ANEXO 14 – PROTEÍNA C REATIVA

Material:

- Nefelômetro da Behring
- Kit " N Latex CRP mono"
- Soros a serem testados

Princípio do Método:

Partículas de polistireno cobertas com anticorpos monoclonais anti-CRP aglutinam quando colocadas na presença de uma amostra sérica contendo a CRP. A intensidade da luz dispersa no nefelômetro depende da quantidade de CRP na amostra, e portanto a CRP pode ser determinada a partir da leitura de padrões com concentrações de CRP pré estabelecidas pelo fabricante, e padronizadas de acordo com as normas internacionais de controle de qualidade.

Procedimento:

Todas as etapas necessárias para preparação da mistura, diluições, e da execução das amostras e dos padrões do teste são executadas automaticamente pelo aparelho. As amostras são diluídas automaticamente a 1:400. Amostras com leituras muito altas, ou muito baixas, que estejam respectivamente, acima ou abaixo da curva de calibração, podem ser reprogramadas em novas diluições, cujos resultados fiquem dentro desta mesma curva. A acurácia e precisão do método são testadas através de controles específicos. O intervalo de confiança é dado pelo valor assinalado $\pm 15\%$.

Intervalo de Referência:

O limite superior adotado para CRP no soro de um indivíduo saudável, adulto, é de 5 mg/l.

ANEXO 15 - TERMO DE CONSENTIMENTO ESCLARECIDO

Eu, após ser esclarecido verbalmente sobre a presente pesquisa, aceitei espontaneamente participar da mesma, concordando em fornecer amostra de meu sangue a fim de que sejam realizados testes laboratoriais para avaliação da resposta imunológica relativa à Hanseníase. Da mesma forma concordo em submeter-me ao teste intradérmico de Mitsuda, comprometendo-me a comparecer vinte e oito dias após no Ambulatório de Dermatologia Sanitária da Secretaria de Saúde de SC, sito à rua Esteves Junior, na cidade de Florianópolis, para leitura do mesmo. Embora ambos procedimentos sejam aplicados rotineiramente durante o tratamento da doença, fui informado detalhadamente de todos os passos desta avaliação. Estou ciente que, embora estes procedimentos possam causar efeitos colaterais mínimos, terei toda a atenção médica devida, independente da existência da reação ou não, desde que manifeste minha intenção em voltar a ser atendido, além do direito a indenização, se este for o caso. Sei também que essa pesquisa é feita sem fins lucrativos para mim ou para os pesquisadores, e que ela é confidencial, não sendo o meu nome objeto de uso em qualquer uma de suas fases. Caso seja de meu interesse, poderei desistir de participar desta pesquisa em qualquer etapa, precisando apenas informar aos pesquisadores a minha intenção neste sentido. Concordo com a publicação dos dados obtidos na pesquisa e que, caso algum resultado seja de interesse clínico, eu tenha ao meu dispor todo o atendimento médico para melhoria de minha saúde.

Estou consciente da importância desta pesquisa e de que receberei os resultados com explicação detalhada de seus significados.

Florianópolis, _____ / _____ / _____

Assinatura (Nome completo, RG, CPF)