

PROGRAMA DE APRIMORAMENTO PROFISSIONAL

**SECRETARIA DE ESTADO DA SAUDE
COORDENADORIA DE RECURSOS HUMANOS
FUNDAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO
ADMINISTRATIVO/FUNDAP**

MÔNICA CRISTINA TASSA

**EXTRAÇÃO DE DNA DO *Mycobacterium leprae* A PARTIR DE
ESFREGAÇOS DE LÂMINAS DE BACILOSCOPIA CORADAS
POR ZIEHL-NEELSEN PARA AMPLIFICAÇÃO DOS GENES
ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA A DROGAS EM
HANSENÍASE**

BAURU – SP

2013

PROGRAMA DE APRIMORAMENTO PROFISSIONAL

**SECRETARIA DE ESTADO DA SAUDE
COORDENADORIA DE RECURSOS HUMANOS
FUNDAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO
ADMINISTRATIVO/FUNDAP**

MÔNICA CRISTINA TASSA

**EXTRAÇÃO DE DNA DO *Mycobacterium leprae* A PARTIR DE
ESFREGAÇOS DE LÂMINAS DE BACILOSCOPIA CORADAS
POR ZIEHL-NEELSEN PARA AMPLIFICAÇÃO DOS GENES
ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA A DROGAS EM
HANSENÍASE**

Monografia apresentada ao Programa de Aprimoramento Profissional/CRH/SES-SP e FUNDAP, elaborado no **Instituto Lauro de Souza Lima**, sob orientação da Ms. Suzana Madeira Diório

Área: Análises Clínicas

BAURU – SP

2013

**EXTRAÇÃO DE DNA DO *Mycobacterium leprae* A PARTIR DE
LÂMINAS DE BACIOSCOPIA CORADAS POR ZIEHL-
NEELSEN PARA AMPLIFICAÇÃO DOS GENES
ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA A DROGAS EM
HANSENÍASE**

BANCA EXAMINADORA:

Orientadora: Ms. Suzana Madeira Diório - Divisão de Pesquisa e Ensino/ILSL

Primeiro Titular: Dra. Ida Maria Foschiani Dias Baptista - Equipe Técnica de
Microbiologia/ILSL

Segundo Titular: Ana Carolina Villas Boas Weckwerth - Equipe Técnica de
Microbiologia/ILSL

28/02/2013

Dedicatória

Dedico o presente trabalho a todos aqueles que direta ou indiretamente me ajudaram a concluir mais essa etapa da vida, em especial minha família e meu namorado Gustavo, que sempre estiveram presentes mostrando gestos de carinho e incentivo, não me deixando desistir. Dedico também a todos os profissionais da saúde, que assim como eu, trabalham em favor à vida buscando alternativas que melhorem as condições daqueles que precisam se restabelecer.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado a oportunidade da vida, por ser à base das minhas conquistas e por me dar forças para que pudesse chegar ao fim dessa jornada.

Aos meus pais, por terem me ensinado todos os princípios da dignidade e da honra, pelos esforços, incentivos e apoio dado para que pudesse suprir minhas escolhas.

Ao meu amor Gustavo, pelo carinho, paciência e companheirismo, estando sempre ao meu lado quando eu precisei.

À minha orientadora Suzana Madeira Diório, pela dedicação prestada na elaboração deste trabalho.

Aos profissionais que fazem parte deste projeto: Patrícia, Luciana, Ana Paula, Ana Elisa e Lázara pela colaboração para que o mesmo pudesse ser executado.

Aos meus amigos da Fundap e aos que conquistei em cada laboratório nesses dois anos, os quais me ajudaram com suas vivências e conhecimentos, compartilhando momentos especiais, contribuindo para meu crescimento pessoal e profissional.

Epígrafe

*“Na vida, não vale tanto o que
temos,*

Nem tanto importa o que somos.

*Vale o que realizamos com aquilo
que possuímos e,*

*Acima de tudo, importa “o que
fazemos de nós.”*

(Chico Xavier)

Tassa, MC. **Extração de DNA do *Mycobacterium leprae* a partir de esfregaços de lâminas de baciloscopia coradas por Ziehl-Neelsen para amplificação dos genes associados à resistência a drogas em hanseníase.** [monografia]. Bauru: Instituto Lauro de Souza Lima; 2013.

Resumo

A emergência de resistência a drogas pode influenciar no controle/eliminação da hanseníase, no entanto, os dados sobre resistência são escassos, nos países endêmicos. Relatos de resistência do *M. leprae* a drogas da poliquimioterapia se tornaram mais freqüentes após a padronização dos métodos de sequenciamento gênico. A biópsia de lesão é amplamente utilizada para esse fim, porém pode causar desconforto ao paciente. Como alternativa, o DNA do bacilo obtido a partir de esfregaços de raspado intradérmico (baciloscopia) corados por Ziehl-Neelsen (ZN), tem sido utilizado com sucesso em alguns protocolos de análise molecular. O objetivo deste estudo foi verificar a viabilidade da utilização de lâminas de raspado intradérmico para detecção de resistência a drogas por métodos moleculares, a partir da extração do DNA do bacilo utilizando-se diferentes protocolos. Para padronização foram utilizadas inicialmente lâminas coradas por ZN a frio, contendo suspensões de bacilos em diluições seriadas, obtidas de camundongos nude previamente inoculados. Foram selecionadas lâminas coradas contendo esfregaços intradérmicos de pacientes multibacilares, diagnosticados entre 2009/2012, com índice baciloscópicos (IB) de 0 a 5+. Do total de 36 pacientes, 29 possuíam duas lâminas, 6 uma lâmina e um três lâminas (n=67). A extração do DNA foi feita com Chelex100(CH) 5% (n=17), 10% (n=17) e com o kit DNAesy Qiagen®(DN) (n=33). O excesso de óleo de imersão foi removido com papel absorvente, adicionados 90µl de água ultrapura, os esfregaços removidos com lâmina de bisturi e pipetados em microtubo. Em 17 amostras foram adicionados 100µl de CH 5%, incubadas a 97°C/10min e então centrifugadas a 13000rpm/2min. Em outras 17 foram adicionados 100µl de CH 10%, incubadas a 97°C/30 min e então centrifugadas a 13000rpm/10min. Após incubação *overnight*/4°C, as amostra foram centrifugadas e o sobrenadante (DNA) transferido para outro microtubo. A extração pelo DN (n=33) foi realizada de acordo com o fabricante. Todas as amostras de DNA foram quantificadas e as concentrações variaram de 3,7 a 33,8ng/µl. O DNA foi amplificado por nested PCR para os genes *folP1*, *rpoβ* e *gyrA* e para o

gene RLEP pela técnica de Real Time PCR (qPCR) com a química SYBRGreen. Após PCR as amostras foram visualizadas em gel de agarose a 1.5%. Utilizando o CH a 5% ou 10%, 50% (17/34) das amostras amplificaram para pelo menos um dos genes avaliados e 38,2% (13/34) para os três genes. O *gyrA* obteve o maior índice de amplificação com 50% seguido pelo *rpoβ* 41,2% e o *folP1* 38,2%. Utilizando CH 5%, 41,2% (7/17) amplificaram para pelo menos um gene e com CH 10% o percentual foi de 58,8% (9/17). Com o DN, 21,2% (7/33) das amostras amplificaram para pelo menos um dos genes e somente 6% (2/33) para os três genes; o *rpoβ* obteve maior índice com 21,2%, seguido pelo *gyrA* 18,2% e *folP1* com 6,1%. Comparando-se os dois métodos de extração, o CH apresentou índice melhor de amplificação (50%) quando comparado ao DN (21,2%). Em relação ao qPCR, das amostras extraídas com o CH (n=34), 64,7% amplificaram para RLEP e destas 68,2% amplificaram para pelo menos um gene da resistência. Com o DN (n=33), o percentual foi de 75,7% e 28% respectivamente. Em relação ao IB, o índice médio das amostras amplificadas pelo CH e qPCR foi de 3,9; entre DN e qPCR foi de 4,1. Em relação as que não amplificaram (CH e DN) a média do IB foi de 1,4. O DN foi melhor para a extração do DNA do bacilo, porém o CH apresentou um índice maior de positividade para a amplificação dos genes da resistência. Amostras com IB ≥ 3 apresentam maior probabilidade de amplificação, independente do método de extração.

Palavras chaves: *Mycobacterium leprae*, hanseníase, baciloscopia, extração de DNA, resistência a drogas.

Tassa, MC. **Extraction of *Mycobacterium leprae* DNA from skin smear stained by the Ziehl-Neelsen method for amplification of genes associated with drug resistance in leprosy.** [monografia]. Bauru: Instituto Lauro de Souza Lima; 2013.

Abstract

The emergence of drug resistance can influence the control/elimination of leprosy, however, data on resistance are scarce in endemic countries. Reports of resistance *M. leprae* to drugs of the multidrugtherapy became more frequent after the gene sequencing methods were standardized. Skin lesion biopsies are widely used for this purpose, but it may cause discomfort to the patient. Alternatively, the DNA obtained from slit skin smears (SSS) stained by Ziehl-Neelsen (ZN) has been successfully used in some protocols for molecular analysis. The aim of this study was to investigate the feasibility of using slit skin smears for detection of drug resistance by molecular methods, using different protocols for DNA extraction of the bacillus. For standardization of the methods, diluted suspensions of bacilli obtained from nude mice previously inoculated stained by cold ZN staining were used. For patient's material we selected SSS from multibacillary patients, diagnosed between 2009/2012, with bacillary index (BI) from 0 to 5+. Of the total of 36 patients, 29 had two slides, 6 one slide and one 3 slides (n = 67). DNA extraction was performed with 5% Chelex100 (CH) (n = 17) and 10% (n = 17), also the DNaesy Qiagen ® kit (DN) (n = 33). The excess immersion oil was removed with blotting paper, then 90µl of ultrapure water added, smears removed with a scalpel blade and pipetted into a microtube. For CH, 100ul were added to the samples, the 5% CH was incubated at 97°C/10min and then centrifuged at 13000rpm/2min. The 10% CH was incubated at 97°C/30 min and then centrifuged at 13000rpm/10min. After overnight incubation/4°C, samples were centrifuged and the supernatant (DNA) transferred to another microtube. The extraction by the DN (n=33) was performed according to the manufacturer's instructions. All DNA samples were quantified and concentrations ranged from 3.7 to 33.8 ng/uL. DNA was amplified by nested PCR for genes *folP1*, *rpoβ* and *gyrA* gene and the RLEP technique for Real Time PCR (qPCR) with the SYBRGreen chemistry. After PCR the samples were visualized on 1.5% agarose gel. Using the CH 5% or 10%, 50% (17/34) of samples amplified to at least one of the genes evaluated and 38.2% (13/34) for the three genes. The *gyrA* had the highest rate of amplification with 50% followed by 41.2% for *rpoβ*

and 38.2% for *folP1*. Using 5% CH, 41.2% (7/17) amplified for at least one gene and for 10% CH percentage of amplification of one gene was 58.8% (9/17). With DN, 21.2% (7/33) of samples amplified to at least one of the genes and only 6% (2/33) for the three genes. *rpoβ* was most frequently amplified (21.2%), followed by 18.2% *gyrA* and 6.1% *folP1*. Comparing the two methods of extraction, the CH showed better amplification (50%) compared to DN (21.2%). Regarding the qPCR results, 64.7% of samples extracted with CH amplified the RLEP gene (n=34) and 68.2% of these amplified to at least one drug resistance associated gene. For DN (n=33), 75.7% amplified for RLEP and 28% of them amplified to at least one drug resistance associated gene. Regarding IB, the average BI of the CH samples that amplified by qPCR was 3.9 and of the DN it was 4.1. Regarding those that did not amplify (CH and DN) the mean BI was 1.4. DN was best for extraction of DNA of the leprosy bacillus, but the CH showed higher rate of positivity for amplification of drug resistance associated genes. Samples with $BI \geq 3$ are more likely to amplify, regardless of the method of extraction.

Key words: *Mycobacterium leprae*, leprosy, slit skin smears, extraction DNA, drug resistance.

Sumário

1. Introdução.....	13
1.1 Agente etiológico	13
1.2 Modo de transmissão.....	13
1.3 Aspectos clínicos.....	13
1.4 Diagnóstico.....	14
1.5 Epidemiologia e controle	15
1.6 Resistência medicamentosa em hanseníase.....	15
2. Objetivos	19
2.1 Objetivo Geral	19
2.2 Objetivo Específico	19
3. Casuística e Métodos.....	20
3.1 Casuística	20
3.2 Métodos.....	20
3.2.1 Coleta do material das lâminas de raspado intradérmico.....	20
3.2.2 Extração de DNA do M. leprae.....	20
3.2.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	21
3.2.4 Primers utilizados nas reações de PCR	22
3.2.5 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR).....	23

4. Resultados	24
4.1 Amplificação dos fragmentos <i>folp1</i> , <i>rpoβ</i> e <i>gyrA</i>	24
4.2 PCR em tempo real (q PCR)	31
5. Discussão	33
6. Conclusão	37
7. Referências	38
8. Anexos	44

1. Introdução

1.1. Agentes etiológicos

A hanseníase é uma doença granulomatosa crônica, causada pelo *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), que afeta a pele e o sistema nervoso periférico, de grande importância para a saúde pública devido a sua magnitude e seu alto poder incapacitante¹.

O bacilo é um parasita intracelular obrigatório, predominante em macrófagos onde podem ser observados formando aglomerados ou globias, imóvel, não cultivável *in vitro* e de baixa toxicidade para o seu hospedeiro. Reproduz-se pelo processo de divisão binária, é Gram-positivo e fortemente álcool-ácido resistente quando submetido à coloração de Ziehl-Neelsen^{2,3}. A álcool-ácido resistência é uma característica marcante das micobactérias devido a grande quantidade de lipídeos que elas possuem em sua parede celular, propiciando-lhes uma eficiente barreira de permeabilidade que impede a ação de diferentes drogas antimicrobianas⁴.

1.2. Modo de transmissão

O homem é considerado a única fonte de infecção da hanseníase. Acredita-se que a transmissão ocorra por meio de pacientes multibacilares, sem tratamento, que eliminam o bacilo para o meio exterior, infectando indivíduos susceptíveis. A principal via de eliminação do bacilo e a mais provável via de entrada deste no organismo são as vias aéreas superiores, por meio de contato íntimo e prolongado⁵.

O período de incubação da infecção varia de meses a anos e o aparecimento dos sintomas clínicos normalmente acontecem entre o segundo e o quinto ano após a infecção⁶. Estima-se que 90% da população desenvolva imunidade protetora adequada para a infecção, não apresentando sintomas detectados clinicamente,⁷ mostrando que a suscetibilidade à hanseníase varia de pessoa para pessoa, possuindo forte componente genético^{2,8}.

1.3. Aspectos clínicos

As pessoas em geral têm imunidade contra o *M. leprae*, por isso a grande maioria não adoece. Entre as que adoecem, o grau de imunidade ou da resposta imune do hospedeiro contra o bacilo, especialmente a relacionada a imunidade celular, desempenha um papel

importante na classificação clínica e evolução da doença⁹. De acordo com a classificação, as formas de manifestação clínica são quatro: indeterminada, tuberculóide, dimorfa e virchoviana. A forma indeterminada se manifesta na fase mais precoce da doença e geralmente evolui para cura espontânea. Pacientes na forma tuberculóide (paucibacilar) apresentam baixa resposta imune humoral e forte imunidade celular adquirida, com carga bacilar tipicamente baixa. No outro extremo do espectro clínico/imunológico estão os pacientes na forma virchoviana (multibacilar) que apresentam uma intensa resposta imune humoral e uma deficiente resposta imune celular, com alta carga bacilar; esses indivíduos, quando não tratados, contribuem significativamente para a manutenção da transmissão da endemia. A forma dimorfa é considerada clínica/imunologicamente instável podendo o paciente apresentar manifestações da forma tuberculóide ou virchoviana¹⁰.

1.4. Diagnóstico

O diagnóstico em hanseníase consiste no exame clínico dermatoneurológico, associado ao exame baciloscópico do raspado intradérmico (baciloscopia) de sítios específicos e pelo exame histopatológico de biópsia de lesão de pele. Porém, a sensibilidade desses métodos convencionais é baixa, pois necessitam de alta carga bacilar para ser considerado positivo, o que não acontece com os indivíduos paucibacilares¹¹.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou, para fins terapêuticos, os pacientes em dois grupos: paucibacilares (PB), que são os que apresentam menos de cinco lesões de pele e baciloscopia negativa e os multibacilares (MB) que apresentam seis ou mais lesões de pele com baciloscopia positiva¹². A baciloscopia consiste na visualização microscópica e contagem dos bacilos corados por Ziehl-Neelsen, obtidos a partir da coleta do raspado intradérmico de pontos índices (lóbulo auricular, cotovelo e joelho), lesões e biópsias¹³.

O índice morfológico (IM) – avaliação indireta de viabilidade do *M. leprae* – se tornou a análise laboratorial padrão para o monitoramento, em curto prazo, da ação bactericida das novas drogas utilizadas no tratamento da hanseníase, considerando que o bacilo não se reproduz *in vitro*. No entanto, esta análise depende da interpretação subjetiva e experiência do observador e da qualidade da amostra, podendo levar invariavelmente a erros¹⁴.

1.5. Epidemiologia e controle

Em 1981, a poliquimioterapia (PQT) foi introduzida como tratamento padrão para a hanseníase, sendo esta responsável pela redução significativa dessa enfermidade no mundo nas últimas duas décadas¹⁵. Entretanto, novos casos continuam a surgir em países endêmicos e a hanseníase continua sendo a principal causa de incapacidade física permanente entre as doenças infectocontagiosas. Em 2011, o Brasil apresentou 1,54 casos para cada 10.000 habitantes, correspondendo a 29.690 casos em tratamento. Neste mesmo ano, o Brasil detectou 33.955 casos novos de hanseníase, correspondendo a um coeficiente de detecção geral de 17,6/100 mil habitantes. Em 2011, foram registrados 2.420 casos novos de hanseníase em menores de 15 anos e um coeficiente de detecção desse grupo etário de 5,2 por 100 mil habitantes, em decorrência de circuitos ativos de transmissão localizados nas áreas mais endêmicas. Apesar da importante redução do coeficiente de prevalência de hanseníase no Brasil, algumas regiões demandam intensificação das ações para eliminação da doença, justificadas por um padrão de alta endemicidade. É necessário intensificar as ações de vigilância da hanseníase, especialmente àquelas voltadas ao diagnóstico e tratamento da doença, com foco prioritário nas regiões que apresentam maior concentração de casos no país. Além disso, é importante o contínuo aperfeiçoamento dos sistemas de informação, atividade fundamental para garantir o adequado monitoramento da situação epidemiológica da hanseníase no Brasil e para contribuir com a meta de eliminação da doença como problema de saúde pública¹⁶.

1.6. Resistência medicamentosa em hanseníase

O modelo de intervenção para o controle da endemia é baseado no diagnóstico precoce, tratamento de todos os casos diagnosticados, prevenção de incapacidades e na vigilância dos contatos intradomiciliares. Neste contexto, o tratamento regular constitui-se em um dos principais fatores de sucesso para a cura da doença.

A PQT é o esquema medicamentoso oficial para hanseníase e consiste na combinação de três drogas – dapsona (DDS), rifampicina (RFP) e clofazimina (CLO). Recomendada pela OMS em 1981¹⁷, a sua implantação foi um dos mais importantes avanços técnicos na história do controle da doença, além de atuar na prevenção da seleção de cepas resistentes. Com um

esquema parcialmente supervisionado, doses fixas e bem tolerado pelos pacientes, a PQT têm contribuído de maneira notável para a cura da hanseníase, reduzindo drasticamente a taxa de prevalência da doença. No Brasil, apesar da comprovada eficácia do esquema terapêutico, cerca de 4% dos pacientes apresentam recidiva da doença e a resistência medicamentosa é um dos fatores que pode contribuir para a sua manifestação¹⁸.

Epidemiologicamente existem dois tipos de resistência, a primária e a secundária. A secundária ou adquirida é resultante de um tratamento inadequado e geralmente está acompanhada de melhora clínica inicial seguida de reativação da doença. Já a primária manifesta-se em indivíduos que ainda não receberam o tratamento e que, muito provavelmente, se infectaram com bacilos provenientes de paciente com resistência secundária¹⁹.

Casos de recidiva associados à resistência as drogas da PQT representam um problema emergente, porém desde a década de 60 vários relatos de sua ocorrência tem sido descritos. A DDS foi a primeira a ter comprovação experimental de resistência e isto só foi possível depois que a técnica de inoculação do *M. leprae* em coxim plantar de camundongos foi padronizada por Shepard, em 1960²⁰. Utilizando-se esta metodologia, em 1964, foi descrito o primeiro caso de resistência do bacilo a DDS²¹. Por ter sido utilizada durante muitos anos em regime de monoterapia, ela é a droga mais frequentemente associada a resistência. Relatos de resistência a RFP são menos frequentes, porém eles têm despertado preocupação, uma vez que ela é a droga mais importante do esquema multidrogas, devido ao seu alto poder bactericida^{22, 23, 24}.

A inoculação do *M. leprae* em coxim plantar de camundongos (técnica de Shepard) é considerada o “padrão ouro” para detecção de cepas resistentes, porém ela é dispendiosa e não está disponível na grande maioria dos laboratórios, dificultando o monitoramento da disseminação de cepas resistentes. Além disso, o tempo para obtenção dos resultados é longo (10 meses) e possui baixa sensibilidade.

Mais recentemente, graças aos avanços na área de biologia molecular, tornou-se possível compreender melhor os mecanismos de ação das drogas anti-micobacterianas bem como os de resistência a estes fármacos. A detecção se baseia na observação de mutações em genes que codificam regiões envolvidas no alvo de ação das drogas ou de sua ativação²⁵.

Com a padronização dos métodos de sequenciamento gênico para detecção de cepas mutantes, os relatos de casos de bacilos resistentes tem se tornado cada vez mais frequentes.

O sequenciamento direto de fragmentos de DNA é a metodologia mais indicada para comprovação dessas mutações associadas à resistência²⁶, e embora esta seja uma técnica de alto custo e necessite de profissionais com sólidos conhecimentos em biologia molecular, apresenta alto índice de sensibilidade e um resultado rápido.

O mecanismo de resistência do *M. leprae* a DDS está relacionado à enzima dihidropteroato sintetase, a qual faz a biossíntese de folato no bacilo, inibindo o ácido para-aminobenzóico. A mutação ocorre no gene que codifica a ligação enzima-ácido, *folP1* e *folP2*, ocasionada por deleção e substituição nos códons 53 (Ala – Thr) e 55 (Arg – Pro)^{27, 28}.

As bases genéticas de resistência do *M. leprae* a RFP têm sido estudadas desde a década de 1990. Uma mutação em um pequeno segmento do gene *rpoβ*, que codifica a subunidade-β do DNA dependente da RNA polimerase foi identificada entre isolados do bacilo que se mostraram resistentes após inoculação em pata de camundongo; a mutação mais freqüente envolve a substituição do aminoácido serina pela leucina que afeta o códon na posição 531²⁹.

A ofloxacina (OFLO) é uma droga administrada de forma alternativa quando o paciente apresenta algum tipo de intolerância ou quando há suspeita de resistência medicamentosa à uma das drogas do esquema padrão. O mecanismo de resistência está relacionado à inibição da replicação do DNA que inibe a DNA girase. A mutação ocorre nos genes *gyrA* e *gyrB* nas posições 91 (Ala – Val) e 205 (Asp – Asp). O mecanismo de resistência a CLO é desconhecido e parece apresentar várias ações^{27, 28}.

A escolha da amostra biológica ideal a ser testada é bastante discutida por envolver aspectos éticos. Na extração do DNA do *M. leprae* para análise de sequenciamento, a biópsia da lesão de pele tem sido a amostra mais utilizada. Porém, é considerado um procedimento invasivo o qual causa desconforto ao paciente. Alternativamente alguns protocolos de análise molecular utilizando o DNA extraído a partir de amostras de lâminas de baciloscopia coradas por Ziehl-Neelsen, tem apresentado resultados satisfatórios^{30, 31, 32, 33, 34, 35, 36}.

Van der Zanden *et al.*³², realizaram um estudo retrospectivo utilizando lâminas de escarro coradas por Ziehl-Neelsen as quais pertenciam ao arquivo do laboratório, para extração de DNA do bacilo, cujo objetivo foi avaliar se a metodologia era sensível para detecção da resistência do *Mycobacterium tuberculosis* a RFP.

Alguns estudos têm mostrado que o DNA do *M. leprae* extraído dos esfregaços dérmicos, também podem ser uteis para o diagnóstico, estudos de variabilidade genética e identificação de microrganismos^{31, 34, 36}. Kamble RR *et al.*³⁰, obtiveram 32,6% de positividade

entre 56 lâminas que foram consideradas negativas após exame microscópico. Kamal R *et al.*³⁵, obtiveram 72% positividade após PCR *in situ* contra 20% de positividade no exame baciloscópico. A rede de monitoramento da resistência medicamentosa em hanseníase (OMS) recomenda a utilização de amostras de raspado intradérmico, demonstrando que esse tipo de amostra também pode ser adequado para detecção da resistência³⁷.

A escolha ideal da amostra, utilizando procedimentos menos invasivos, e do método de extração de DNA é de grande importância na tentativa de buscar resultados mais rápidos e exatos em relação ao monitoramento das cepas resistentes as drogas. A possibilidade de se utilizar lâminas de arquivo (diagnóstico) para avaliar a resistência, proporcionaria ao paciente a possibilidade de receber o tratamento adequado caso fosse identificada a mutação. Com isso, diminuiria também o risco de recidiva da doença. O método de extração do DNA a ser utilizado deve levar em conta a quantidade e a qualidade do DNA presente na amostra. Neste contexto, realizamos o presente estudo, com o objetivo de padronizar uma metodologia de extração para posterior amplificação dos genes envolvidos na resistência (*folp1*, *rpoβ*, *gyrA*), utilizando-se dois métodos diferentes: 1. Chelex 100/ChelatingResin/Sigma® é uma resina quelante que tem sido utilizada na ciência forense, envolvendo extração de DNA em amostras escassas incluindo manchas de sangue, tecido, cabelo e osso^{38, 39, 40, 41, 42}. O processo de extração é bastante simples e consiste em uma etapa de aquecimento e outra de centrifugação. A alcalinidade da suspensão e do processo de fervura rompe as membranas celulares, destrói as proteínas e desnatura o DNA. A centrifugação permite a separação entre a resina e os detritos celulares e o DNA permanecem em suspensão no sobrenadante, podendo então ser amplificado⁴³; 2. Kit DNeasy Blood and Tissue Kits - Qiagen® amplamente utilizado em protocolos de extração de DNA total a partir de uma variedade de fontes, incluindo amostras de tecidos frescos ou congelados de animais e células, sangue e bactérias. É um método rápido de purificação, que não necessita de fenol-clorofórmio ou precipitação com álcool, e que envolve manipulação mínima. O DNA purificado é livre de inibidores de PCR, permitindo a detecção sensível em multiplex padrão e PCR em tempo real⁴⁵.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

2.1.1. Analisar a viabilidade da utilização de lâminas de raspado intradérmico coradas por Ziehl-Neelsen e arquivadas, para a detecção de resistência de *M. leprae* a dapsona, rifampicina e ofloxacina por métodos moleculares.

2.2. Objetivo específico

2.2.1. Realizar a extração de DNA genômico do *M. leprae* a partir de lâminas de raspado intradérmico coradas por Ziehl-Neelsen, utilizando-se os protocolos do Chelex 100® e Kit DNeasy Qiagen®.

2.2.2. Utilizar as amostras de DNA extraídas para amplificar os genes *folp1*, *rpoB* e *gyrA*, envolvidos na resistência a drogas.

2.2.3. Comparar os resultados da extração e amplificação entre os métodos.

3. Casuística e Métodos

3.1. Casuística

Foram utilizadas 67 lâminas de raspado intradérmico (baciloscopia) de 36 pacientes, não tratados, atendidos no ambulatório do Instituto Lauro de Souza Lima/Bauru/SES/SP e que tiveram diagnóstico clínico para hanseníase MB, no período de setembro/2009 a abril/2012. Do total de 36 pacientes, 29 (80,5%) possuíam duas lâminas, seis (16,7%) apenas uma e um (2,8%) paciente três, totalizado 67 lâminas. A coleta de dados dos pacientes como faixa etária, sexo e classificação operacional da hanseníase, foi realizada a partir de informações contidas nos prontuários organizados pelo Serviço de Arquivo Médico e Estatístico (SAME) do ILSL. O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto, sendo aprovado em 17 de novembro de 2011, protocolo nº228/11 (C.E.P nº063/2011).

3.2. Métodos

3.2.1. Coleta do material das lâminas de raspado intradérmico

As lâminas utilizadas (n=67) foram coradas pela técnica de Ziehl-Neelsen à frio e a leitura realizada no serviço de baciloscopia da Equipe Técnica de Microbiologia do Instituto. O índice baciloscópico (IB) variou de 0 a 5+, conforme escala de Ridley⁴⁶. Após a liberação do resultado, essas lâminas foram arquivadas e mantidas em temperatura de 4° a 8°C. O excesso de óleo de imersão contido na superfície das lâminas arquivadas foi removido com auxílio de papel absorvente. Cada lâmina continha três esfregaços. Em cada um deles foram adicionados 30µl de água ultrapura (água de injeção). Em seguida, os esfregaços foram raspados utilizando-se bisturi nº 15 e o volume da suspensão resultante foi transferido para um microtubo com auxílio de uma micropipeta. Para que não houvesse perda de material, a ponta do bisturi foi lavada com 10µl de água de injeção totalizando assim um volume final de 100µl.

3.2.2. Extração de DNA do *M. leprae*

Para extração do DNA gênomico do *M. leprae* foram utilizados os protocolos do Chelex 100/ChelatingResin/Sigma® (CH) e o kit DNeasy Blood and Tissue/Qiagen® (DN).

As amostras foram submetidas à extração de maneira pareada, naqueles casos em que foram realizadas mais de uma coleta de lâmina/paciente.

Extração de DNA pelo CH: em 17 amostras foram adicionados 100µl de CH 5%, incubadas a 97°C/10min e então centrifugadas a 13000rpm/2min. Em outras 17 foram adicionados 100µl de CH 10%, incubadas a 97°C/30min. e então centrifugadas a 13.000rpm/10min. Estas amostras foram incubadas *overnight*/4°C, e em seguida centrifugadas novamente. O sobrenadante (DNA) foi transferido para um novo microtubo e mantido a -20°C até a sua utilização.

Extração de DNA pelo DN: a suspensão obtida a partir do raspado intradérmico de 33 amostras, foi transferida para um microtubo e centrifugada a 10.000rpm/20min. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi submetido à extração do DNA de acordo com as normas do fabricante.

As amostras de DNA foram concentradas por método a vácuo (miVAC DNA Concentrador – Genevac) por 2 horas em temperatura ambiente, obtendo um volume final de aproximadamente 50 µl. A concentração em ng/µL e pureza do DNA foram estimadas em um espectrofotômetro (Nanodrop1000).

3.2.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As amostras de DNA foram amplificadas utilizando-se a técnica de NESTED-PCR. Para padronização foram utilizadas inicialmente lâminas coradas por Ziehl-Neelsen a frio, contendo suspensões de bacilos em diluições seriadas, obtidas de camundongos *nude* previamente inoculados. A amplificação das regiões gênicas de interesse determinantes de resistência a drogas (DRDR) foi realizada de acordo com o descrito: a primeira reação de PCR foi preparada usando tampão 5x, 25 mM de MgCl₂, fornecidos no mesmo kit da enzima Hot Start Plus Taq DNA Polimerase (Qiagen), 0,4 mM de cada nucleotídeo (Invitrogen), 20 pmol de cada primer, 0,5U da enzima Hot Start Plus Taq DNA Polimerase (Qiagen) e 5,5 µL do DNA alvo em um volume final de reação de 10 µL. Essa reação foi submetida a ciclos de 95°C/5 min., 98°C/10seg, 60°C/30seg, 68°C/30seg por 30 ciclos, seguidos de extensão final a 68°C/3min em termociclador BioRad T100 Thermal Cycler. Como controle positivo e otimização da reação de PCR foi utilizada uma amostra de DNA da cepa Thai - 53. No controle negativo não foi adicionado o DNA. Para a segunda reação de PCR foi utilizado 1µL

do produto da primeira PCR como DNA alvo em um volume final de 15 μ L. A segunda reação de PCR foi realizada nas mesmas condições da primeira reação. O produto final dessa segunda reação foi visualizado em gel de agarose a 1,5%, a 100V em TBE 1% (tris-borato e EDTA pH 8,0) por 75 minutos.

3.2.4. Primers utilizados nas reações de PCR

1ª PCR:

folP1:

F1 (NF2): 5'-GCAGGTTATTGGGGTTTTGA-3'

F2 (FH2): 5'-CCACCAGACACATCGTTGAC-3' (312bp)

rpo β :

R1 (Rif-1): 5'-CAGACGCTGATCAATATCCGT-3'

R2 (RpoBR05): 5'-CAGCGGTCAAGTATTCGATC-3' (358bp)

gyrA:

G1 (GH1): 5'-ACGCGATGAGTGTGATTGTGG-3'

G2 (GH2): 5'-TCCCAAATAGCAACCTCACC-3' (336bp)

2ª PCR

folP1:

F3 (FK1): 5'-CTTGATCCTGACGATGCTGT-3'

F4 (FK2): 5'-ACATCGTTGACGATCCGTG-3' (245bp)

rpo β :

R3 (RH1): 5'-CAATATCCGTCCGGTGGTC-3'

R4 (RH2): 5'-GTATTCGATCTCGTCGCTGA-3' (337bp)

gyrA:

G3 (GK1): 5'-GATGGTCTCAAACCGGTACA-3'

G4 (GK2): 5'-CCCAAATAGCAACCTCACCA-3' (291bp)

3.2.5. Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)

O DNA (10 ng) foi utilizado para a detecção da presença do *M. leprae* por meio do Real Time PCR e da química SYBR Green. A reação foi realizada utilizando-se o aparelho StepOnePlus (Applied Biosystems/USA), a química SYBR Green e par de primers M13 específico para *M. leprae* (5' ATTTCTGCCGCTGGTATCGGT 3'; 5' TGCGCTAGAAGGTTGCCGTAT 3') - Cabe ressaltar que os primers foram desenhados (Primer Express) utilizando a seguinte seqüência (sobreposição das regiões - RLEP1, RLEP2, RLEP3 e RLEP4): “cacctga tgttatccct tgcaccattt ctgccgctgg taccggtgc ggcggcttgt tgaccggccc tcagccagca agcagggcatg ccgccgggtg cagcagtatc gtgtagtga acagtgcac gatgatccgg ccgtcggcgg cacatacggc aaccttctag cgcagatc”. A reação consistiu em: 2 minutos a 50°C, 2 minutos a 95°C, e quarenta ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 62,5°C (temperatura de *annealing*) e 1 minuto a 72°C, além de um ciclo final de vinte minutos, com temperatura crescente de 60 a 95°C (curva de dissociação dos produtos da reação – curva de *melting*: utilizada para a análise da especificidade de amplificação).

4. Resultados

Dos 36 pacientes, 28 (77,8%) eram do sexo masculino e oito (22,2%) do sexo feminino. A média de idade foi de 55,1 anos sendo que um dos pacientes era menor que 15 anos.

4.1. Amplificação dos genes *folP1*, *rpoβ* e *gyrA*

Utilizando-se o CH a 5% ou 10%, 50% (17/34) das amostras amplificaram para pelo menos um dos genes avaliados e 38,2% (13/34) para os três genes. O gene *gyrA* obteve o maior índice de amplificação com 50%, seguido do *rpoβ* 41,2% e o *folP1* com 38,2% (Figuras 1,2 e 3). Utilizando-se CH 5%, 41,2% (7/17) amplificaram para pelo menos um gene e com CH 10% o percentual foi de 58,8% (9/17) (Tabela 1). Com o DN, 21,2% (7/33) das amostras amplificaram para pelo menos um dos genes e somente 6% (2/33) para os três genes; o gene *rpoβ* obteve o maior índice com 21,2%, seguido pelo *gyrA* 18,2% e *folP1* com 6,1% (Figuras 4,5 e 6). Comparando-se os dois métodos de extração, o CH (5% ou 10%) apresentou um índice melhor de amplificação (50%) quando comparado ao DN (21,2%). Na tabela 2 estão descritos, de forma pareada, os resultados de amplificação dos genes *folP1*, *rpoβ* e *gyrA*, entre os dois métodos.

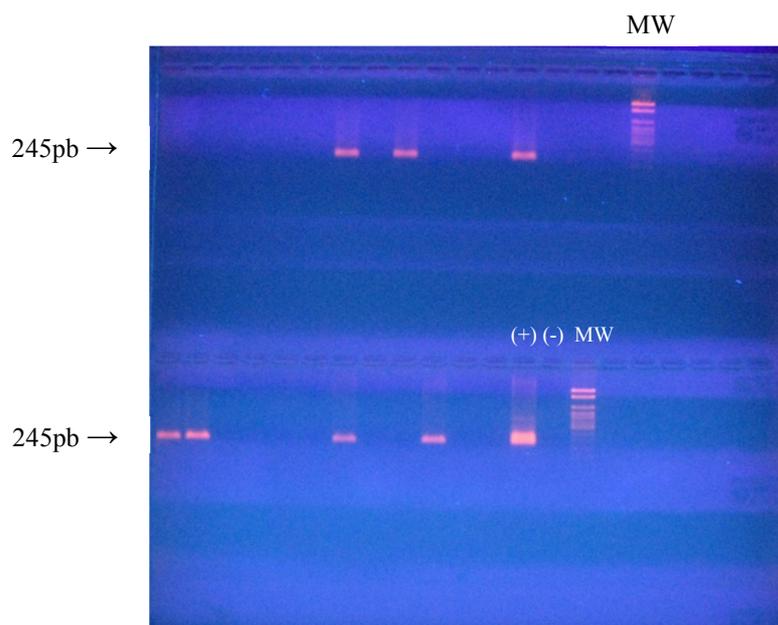


Figura 1 – Amplificação em gel de agarose 1,5%, do gene *folP1* do DNA do *M. leprae* extraído pelo método do Chelex (5% e 10%).

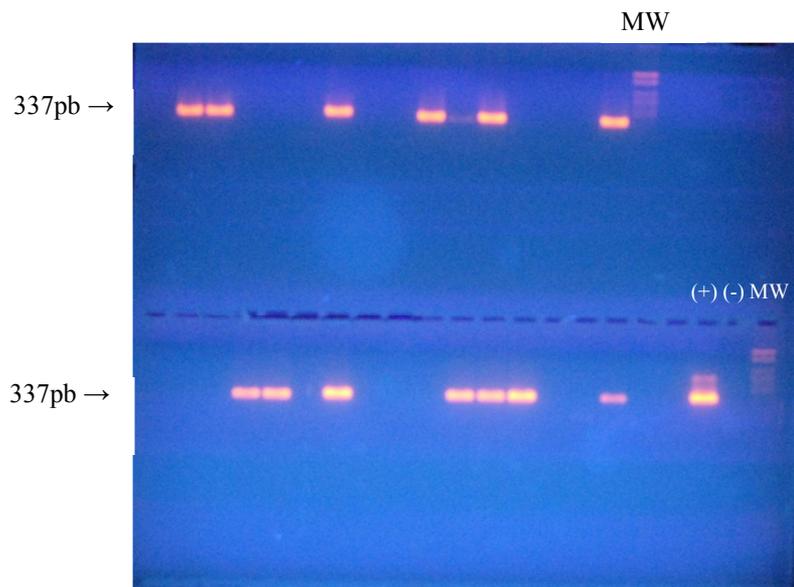


Figura 2 – Amplificação em gel de agarose 1,5%, do gene *rpoβ* do DNA do *M. leprae* extraído pelo método do Chelex (5% e 10%).

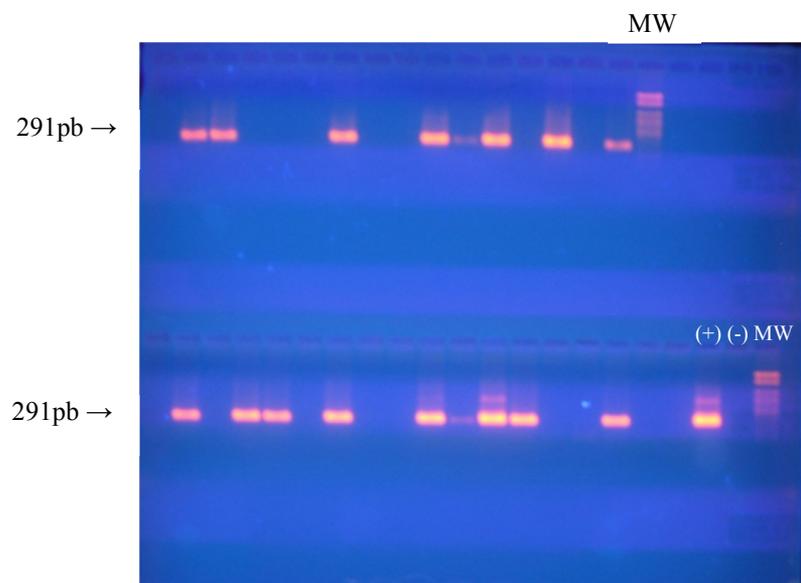


Figura 3 – Amplificação em gel de agarose 1,5%, do gene *gyrA* do DNA do *M. leprae* extraído pelo método do Chelex (5% e 10%).

Tabela 1. Resultados de amplificação dos genes *folP1*, *rpoβ* e *gyrA* utilizando o protocolo de extração com Chelex100, nas concentrações 5% e 10%, entre as 34 amostras avaliadas.

CHELEX 5%				CHELEX 10%			
Amostra	<i>folp1</i>	<i>rpoβ</i>	<i>gyrA</i>	Amostra	<i>folp1</i>	<i>rpoβ</i>	<i>gyrA</i>
1				6			
2	+	+	+	7	+	+	+
3	+	+	+	8			
4				9			
5				10	+	+	+
11*		+	+	12*	+	+	+
13				14			+
15				16	+	+	+
17				18			+
19				20	+	+	+
21	+	+	+	22			
23	+	+	+	24			
25				26			+
27	+	+	+	28	+	+	+
29	+	+	+	30			
31				32	+	+	+
33				34			
Total (%)	35,30	41,20	41,20	Total (%)	41,20	41,20	58,80

* Lâminas do mesmo paciente

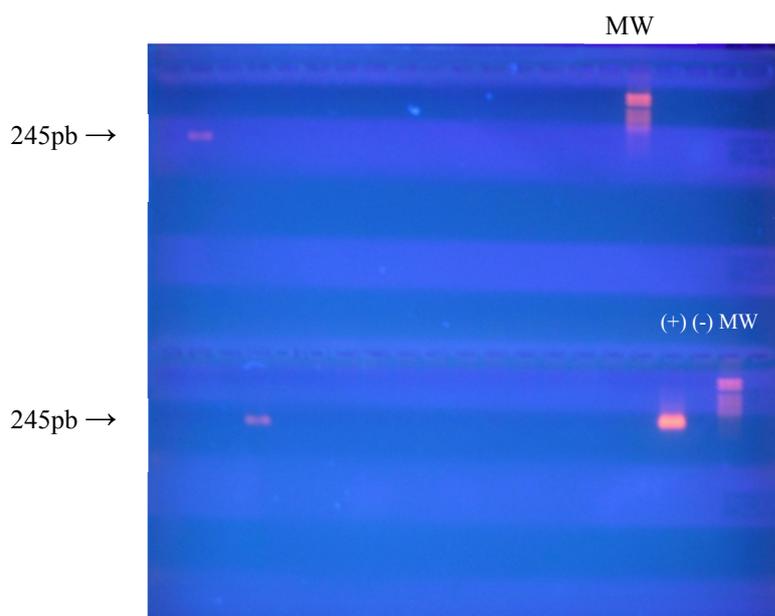


Figura 4 – Amplificação em gel de agarose 1,5%, do gene *folP1* do DNA do *M. leprae* extraído pelo método do DNeasy.

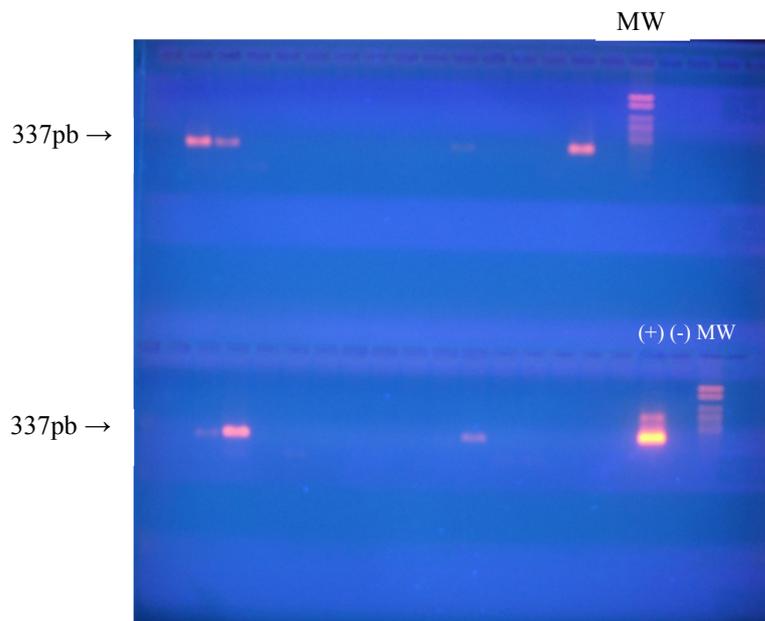


Figura 5 – Amplificação em gel de agarose 1,5%, do gene *rpoβ* do DNA do *M. leprae* extraído pelo método do DNeasy.

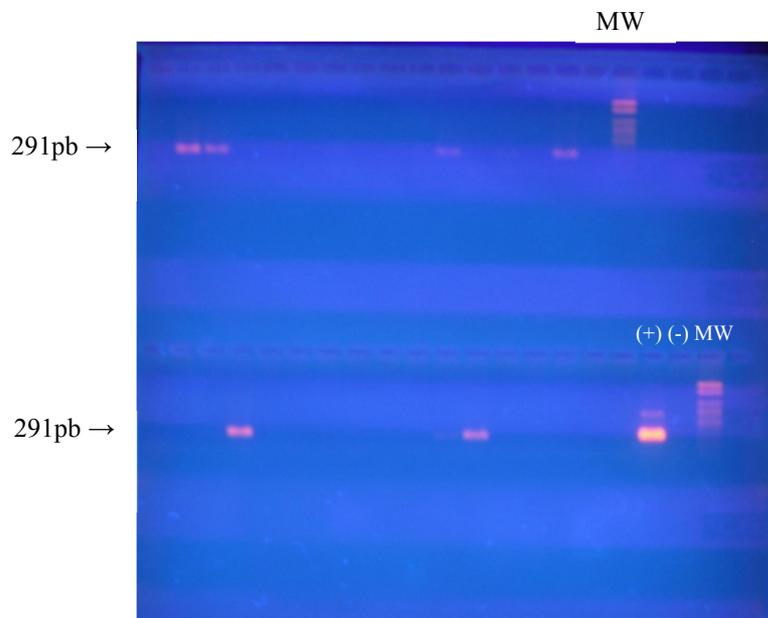


Figura 6 – Amplificação em gel de agarose 1,5%, do gene *gyrA* do DNA do *M. leprae* extraído pelo método do DNeasy.

Tabela 2. Resultado de amplificação dos genes *folP1*, *rpoβ* e *gyrA* com Chelex 100 e DNeasy Qiagen, entre as 67 amostras avaliadas.

CHELEX				DNEASY			
Amostra	<i>folp1</i>	<i>rpoβ</i>	<i>gyrA</i>	Amostra	<i>folp1</i>	<i>rpoβ</i>	<i>gyrA</i>
1 (5%)				35			
2 (5%)	+	+	+	36	+	+	+
3 (5%)	+	+	+	37		+	+
4 (5%)				38			
5 (5%)				39			
6 (10%)				40			
7 (10%)	+	+	+	41			
8 (10%)				42			
9 (10%)				43			
10 (10%)	+	+	+	44			
11*(5%)		+	+	45*		+	+
12*(10%)	+	+	+				
13 (5%)				46			
14 (10%)			+	47			
15 (5%)				48			
16 (10%)	+	+	+	49		+	+
17 (5%)				50			
18 (10%)			+	51			
19 (5%)				52			
20 (10%)	+	+	+	53		+	
21 (5%)	+	+	+	54	+	+	+
22 (10%)				55			
23 (5%)	+	+	+	56			
24 (10%)				57			
25 (5%)				58			
26 (10%)			+	59			
27 (5%)	+	+	+	60			
28 (10%)	+	+	+	61			
29 (5%)	+	+	+	62		+	+
30 (10%)				63			
31 (5%)				64			
32**(10%)	+	+	+	65**			
33**(5%)				66**			
34**(10%)				67**			
Total (%)	38,20	41,20	50,00	Total (%)	6,10	21,20	18,20

* paciente com três lâminas; ** pacientes com uma lâmina.

Independente do método de extração, 35,8% (24/67) das amostras, amplificaram para pelo menos um dos genes estudados. A concentração do DNA dessas amostras extraído pelo CH (5% ou 10%) variou de 3,7 a 11,3ng/μl e para o DN variou de 4,5 a 14,3ng/μl; o IB das amostras amplificadas, utilizando ambos os métodos de extração, variou de 1 a 5+ (Tabela 3).

Em 64,2% (43/67) das amostras não amplificadas, a média das concentrações e do índice bacilosκόpico foi igual a 10,5 e 2,3 respectivamente (Tabela 4).

Tabela 3. Concentração do DNA e o índice bacilosκόpico das amostras que amplificaram para pelo menos um gene.

Amostras Amplificadas (n= 24)	Concentração do DNA (ng/μl)	Índice bacilosκόpico (IB)
2	8,7	5,0
3	8,0	3,3
7	5,1	4,0
10	7,6	3,3
11	8,9	4,0
12	11,3	4,0
14	3,7	4,0
16	7,8	3,3
18	7,5	1,0
20	8,0	3,6
21	7,5	4,0
23	5,1	4,3
26	5,6	2,3
27	4,3	3,6
28	7,3	4,5
29	5,0	5,0
32	6,3	3,3
36	7,9	5,0
37	4,5	4,0
45	12,8	3,3
49	5,8	4,0
53	6,5	4,0
54	5,8	4,0
62	14,6	4,3

Tabela 4. Concentração do DNA e índice baciloscópico das amostras que não amplificaram para nenhum gene.

Amostras não amplificadas (n=43)	Concentração do DNA (ng/μl)	Índice baciloscópico (IB)
1	16,5	5,0
4	20,7	3,6
5	11,3	3,3
6	5,5	0,3
8	8,5	3,0
9	5,1	1,6
13	5,2	0
15	5,1	1,0
17	6,3	1,0
19	5,3	0,3
22	7,8	3,0
24	6,3	1,0
25	4,3	3,0
30	28,8	0,3
31	5,3	4,3
33	6,8	1,0
34	7,7	3,3
35	13,4	3,6
38	33,8	3,6
39	4,5	3,3
40	5,8	3,0
41	4,5	4,0
42	8,4	3,3
43	8,5	0,6
44	8,6	2,0
46	5,2	1,0
47	6,1	3,0
48	17,5	0,3
50	11,4	2,0
51	25,4	1,0
52	14,2	0
55	10,8	3,3
56	9,0	5,5
57	9,8	0,6
58	9,9	2,3
59	12,0	0,3
60	5,8	3,6
61	7,9	4,0
63	16,0	0,3
64	21,0	2,6
65	10,2	3,6
66	5,4	3,6
67	10,6	2,3

4.2. PCR em tempo real (qPCR).

Em relação à extração do DNA, a técnica do qPCR mostrou que das amostras extraídas com o CH (n=34), 64,7% apresentaram amplificação para RLEP e destas 68,2% amplificaram para pelo menos um gene da resistência. Com o DN (n=33), o percentual foi de 75,7% e 28% respectivamente. Em relação ao IB, o índice médio das amostras amplificadas em conjunto pelo Chelex 100® e o qPCR foi de 3,9, e entre o Kit DNeasy e o qPCR foi de 4,1. Em relação às amostras que não amplificaram nem para o Chelex-100® nem para o Kit DNeasy a média do IB foi de 1,4. Na tabela 5 estão descritos os resultados entre as amostras extraídas com Chelex-100® (5% e 10%) e com o Kit DNeasy, e a amplificação do DNA do *M. leprae* pela técnica de qPCR, o IB e a amplificação para os genes da resistência.

Tabela 5. Resultado entre as amostras extraídas com Chelex-100® (5% e 10%) e com DNeasy® em relação a amplificação pelo qPCR, o índice baciloscópico e a amplificação dos genes da resistência.

Amostra	C _T – qPCR	IB	Amplificação	Amostra	C _T – qPCR	IB	Amplificação
01CH	32,43	5	na*	35DN	28,63	3,6	na
02CH	23,04	5	<i>folP1,rpoβ,gyrA</i>	36DN	23,60	5	<i>folP1,rpoβ,gyrA</i>
03CH	25,33	3,3	<i>folP1,rpoβ,gyrA</i>	37DN	24,34	4	<i>rpoβ, gyrA</i>
04CH	Undetermined	3,6	na	38DN	Undetermined	3,6	na
05CH	29,33	3,3	na	39DN	27,29	3,3	na
06CH	Undetermined	0,3	na	40DN	33,20	3	na
07CH	26,55	4	<i>folP1,rpoβ,gyrA</i>	41DN	25,44	4	na
08CH	Undetermined	3	na	42DN	32,17	3,3	na
09CH	Undetermined	1,6	na	43DN	Undetermined	0,6	na
10CH	27,46	3,3	<i>folP1,rpoβ,gyrA</i>	44DN	31,81	2	na
13CH	Undetermined	0	na	46DN	Undetermined	1	na
14CH	30,85	4	<i>gyrA</i>	47DN	27,30	3	na
15CH	35,56	1	na	48DN	34,72	0,3	na
16CH	27,85	3,3	<i>folP1,rpoβ,gyrA</i>	49DN	25,03	4	<i>rpoβ, gyrA</i>
17CH	Undetermined	1	na	50DN	37,28	2	na
18CH	Undetermined	1	<i>gyrA</i>	51DN	37,68	1	na
19CH	Undetermined	0,3	na	52DN	Undetermined	0	na
20CH	28,43	3,6	<i>folP1,rpoβ,gyrA</i>	53DN	27,46	4	<i>rpoβ</i>
21CH	28,92	4	<i>folP1,rpoβ,gyrA</i>	54DN	24,63	4	<i>folP1,rpoβ,gyrA</i>
22CH	35,71	3	na	55DN	34,82	3,3	na
23CH	23,87	4,3	<i>folP1,rpoβ,gyrA</i>	56DN	30,27	5	na
24CH	35,91	1	na	57DN	34,18	0,6	na
25CH	Undetermined	3	na	58DN	Undetermined	2,3	na
26CH	Undetermined	2,3	<i>gyrA</i>	59DN	Undetermined	0,3	na
27CH	29,48	3,6	<i>folP1,rpoβ,gyrA</i>	60DN	27,00	3,6	na
28CH	28,24	4,5	<i>folP1,rpoβ,gyrA</i>	61DN	27,58	4	na
29CH	25,94	5	<i>folP1,rpoβ,gyrA</i>	62DN	25,41	4,3	<i>rpoβ, gyrA</i>
30CH	Undetermined	0,3	na	63DN	Undetermined	0,3	na
31CH	33,91	4,3	na	64DN	36,88	2,6	na
32CH**	30,13	3,3	<i>folP1,rpoβ,gyrA</i>	65DN**	27,10	3,6	na
33CH**	Undetermined	1	na	66DN**	34,79	3,6	na
34CH**	32,41	3,3	na	67DN**	Undetermined	2,3	na
11CH***	25,59	4	<i>rpoβ, gyrA</i>				
12CH***	27,94	4	<i>folP1,rpoβ,gyrA</i>				
45DN***	26,43	3,3	<i>rpoβ, gyrA</i>				

* não amplificado; **pacientes com uma lâmina; *** paciente com três lâminas

5. Discussão

O principal objetivo deste estudo foi analisar a viabilidade da utilização de lâminas de baciloscopia coradas por Ziehl-Neelsen, para a detecção da resistência do *M. leprae* a DDS, RFP e OFLO por métodos moleculares, comparando-se diferentes métodos de extração de DNA do bacilo. A remoção dos esfregaços com posterior extração do DNA genômico, foi a primeira etapa do trabalho para avaliação da sensibilidade deste na amplificação dos genes *folp1*, *rpoβ* e *gyrA*.

A baciloscopia de raspado intradérmico é um exame para auxílio diagnóstico na hanseníase, pouco invasivo, de baixo custo e rotineiramente realizado pelo serviço de ambulatório e microbiologia do Instituto Lauro de Souza Lima. A possibilidade de se reutilizar (aproveitar) o material destas lâminas, após a leitura, para extração de DNA genômico, abre perspectivas para que estudos de resistência a drogas a PQT e também de variabilidade genética³⁶, possam ser realizados. A grande quantidade de lâminas em arquivo no laboratório poderia ser utilizada em estudos retrospectivos, possibilitando a identificação precoce de possíveis cepas mutantes e a intervenção no tratamento antes que o paciente possa recidivar.

Van der Zanden *et al*³², utilizando lâmina (arquivo) de escarro corado por Ziehl-Neelsen, para extração de DNA de *M. tuberculosis*, demonstrou que esse tipo de material também poderia ser utilizado na detecção de resistência molecular a RFP e genotipagem por *spoligotyping*. Os autores obtiveram um índice de 84% de sensibilidade na detecção da cepa mutante, após sequenciamento do gene *rpoβ*, quando comparado com o método de hibridização. Estes resultados demonstraram que o DNA do bacilo ainda apresentava-se íntegro, mesmo depois de algum tempo de coloração e leitura com óleo de imersão.

As 67 lâminas (amostras) dos 36 pacientes classificados como MB, não tratados, foram usadas para a extração de DNA por dois métodos diferentes: CH a 5% (n=17) e 10% (n=17) e com DN (n=33). Após a extração as amostras de DNA foram amplificadas por nested PCR para os genes da resistência *folp1*, *rpoβ* e *gyrA*, e para RLEP pela técnica de qPCR com a química SYBRGreen.

Procedimentos de extração utilizando CH são comuns na ciência forense por poupar tempo, reduzir custos, simplificar extrações e minimizar o potencial de contaminação, já que existe menos manipulação do tubo. O kit comercial DN, embora apresente um custo elevado,

oferece um DNA purificado e livre de inibidores que podem interferir ou inviabilizar a PCR. A maioria das amostras podem ser diretamente lisadas com proteinase K, eliminando a necessidade de ruptura mecânica e, com isso diminuindo o tempo do processo de extração. Em estudos de resistência a drogas realizados no instituto, o kit tem sido bastante utilizado para extração do DNA do *M. leprae* em amostra de suspensão de biópsia, mostrando resultados satisfatórios para a amplificação dos genes envolvidos na resistência⁴⁶.

Embora o kit DN permita a obtenção de um DNA de melhor qualidade, os resultados de amplificação para os genes da resistência, foram melhores nas amostras extraídas com o método do CH (50%) do que nas extraídas com o kit comercial (21,2%). Considerando que a proposta do kit seja a qualidade e pureza do DNA, era esperado se obter melhores resultados com este método. Provavelmente ajustes na concentração do DNA ou na mix da PCR sejam necessárias para aumentar o índice de amplificação.

Ainda não existem estudos utilizando o DN para extração do DNA e detecção de genes da resistência em *M. leprae*, a partir de lâminas coradas de raspado intradérmicos. Os estudos existentes utilizando este método de extração são em sua maioria para viabilidade e/ou variabilidade com amostras de biópsias de tecidos³¹.

Quando avaliamos, pela técnica do qPCR, apenas o resultado de extração do DNA genômico, o índice de positividade em relação a RLEP foi de 75,7% para o DN e 64,7% para o CH (Tabela 5). Esses valores mostram que o DN foi melhor para a extração do DNA genômico quando comparado com o CH, porém para a amplificação dos genes da resistência ocorreu o inverso, ou seja, o CH apresentou maiores índices de amplificação. Os métodos de extração com CH são realizados em meio alcalino e temperaturas elevadas podendo degradar ainda mais o DNA, o que pode resultar na incapacidade de se obter bons resultados. O método usado para extração com CH não inclui um passo de purificação, portanto, se a amostra contiver inibidores e contaminantes estes podem inibir a PCR. Alguns laboratórios têm incorporado o uso de uma unidade de filtro como Microcon[®] ou Centricon[®] antes da amplificação, de modo que alguns inibidores possam ser removidos e a amostra ser concentrada⁴⁷.

Os trabalhos existentes utilizando extração do DNA a partir de lâminas de raspado intradérmico, utilizam xilol para remoção do óleo de imersão presente na lâmina^{30,31, 32, 33}. Em nosso estudo optou-se pela utilização do papel absorvente, considerando a possibilidade do xilol ser um inibidor para a extração/amplificação das amostras.

O índice baciloscópio das amostras estudadas variou de 0 a 5+; as amostras com IB 0 pertenciam a pacientes MB que tinham duas lâminas colhidas, sendo uma delas positiva. Em relação ao IB, o índice médio das amostras amplificadas tanto pelo CH como pelo qPCR foi de 3,9; entre DN e qPCR foi de 4,1 (Tabela 5), sugerindo que quanto maior o IB maior a possibilidade de amplificação, principalmente dos genes envolvidos na resistência. Em relação as que não amplificaram (CH e DN) a média do IB foi de 1,4. Em nosso estudo nenhuma das duas lâminas com IB de 0 amplificou para RLEP e/ou para os genes da resistência, sugerindo que, de fato, essas amostras pudessem ser negativas. Resultados positivos de amplificação em amostras com baciloscopia negativa têm sido relatados por alguns autores como Kang TJ *et al*⁴⁸ que obtiveram 67,7% (21/31) de positividade para RELP em amostras com IB 0. A RLEP é uma sequência que está localizada em uma região altamente conservada no cromossomo do bacilo, que se repete por pelo menos 28 vezes e que apresenta um índice alto de sensibilidade e especificidade para o *M. leprae*.

Tendo em vista os poucos dados sobre resistência a drogas em hanseníase, faz-se necessário adicionar esforços à rede de monitoramento proposta pela OMS em 2009, para aqueles países onde a doença ainda é endêmica. O Brasil possui altas taxas de prevalência da doença, com detecção de casos novos em queda lenta, especialmente nas regiões norte e nordeste. Ainda não se sabe o impacto que os possíveis casos de resistência medicamentosa possam ter na epidemiologia/controlar da doença, por isso o desenvolvimento de métodos alternativos para detecção precoce destes casos seria muito importante, considerando que o “padrão ouro” como a técnica de inoculação em coxim plantar de camundongos (técnica de Shepard), possui baixa sensibilidade, além de o resultado ser demorado. A utilização do material extraído das lâminas, poderia contribuir positivamente na detecção de cepas com resistência primária e permitir ao paciente receber tratamento com drogas alternativas ao esquema padrão, uma vez que estas já são coletadas de rotina para o diagnóstico da doença.

As técnicas moleculares, embora apresentem altos índices de sensibilidade e especificidades, possuem barreiras para sua implantação na rotina, pelo seu alto custo e a necessidade de profissionais capacitados com conhecimentos específicos. As técnicas de biologia moleculares comumente conhecidas como “*métodos in house*”, aos poucos foram substituídas pelos kits comerciais, que apresentam resultados amplamente satisfatórios, porém com custo elevado. Neste estudo, o DN foi melhor para a extração do DNA do bacilo, porém o CH apresentou um índice maior de positividade para a amplificação dos genes da

resistência, tornando essa metodologia também viável para estudos moleculares, inclusive de resistência a drogas em hanseníase, além da vantagem de oferecer um custo financeiro menor. As amostras que amplificaram para os genes da resistência serão submetidas ao sequenciamento para avaliar o perfil de susceptibilidade destas cepas.

6. Conclusão

- As lâminas de raspado intradérmico coradas por Ziehl-Neelsen e arquivadas, podem ser utilizadas para a extração do DNA genômico do *M. leprae* e amplificação dos genes *folP1*, *rpoB* e *gyrA*, envolvidos na resistência a drogas.
- Para a extração do DNA genômico o kit DNeasy apresentou uma porcentagem maior de extração quando comparado com o Chelex 100.
- Em relação à amplificação para os genes *folP1*, *rpoB* e *gyrA*, as amostras que foram submetidas a extração pelo Chelex apresentaram um índice maior de amplificação quando comparado com o DNeasy.

7. Referências

1. Scollard, DM, Adams, LB, Gillis, TP Krahenbuhl JL, Truman, RW, Willians, DL. The continuing challenges of leprosy. Clin.Microbiol.Rev. 2006 19(2): 338-381, 2006.
2. Fontes, ANB. Estudo de variabilidade genética em isolados de *Micobacterium leprae* e sua aplicação na epidemiologia molecular da hanseníase.[dissertação]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2005.
3. Brennan, PJ, Nikaido H. The enveloped of mycobacteria. Annu. Rev. Biochem. 1995; 64: 29-63.
4. Rastogi, N. Recent observations concerning structure and function relationships in the mycobacterial cell enveloped: elaboration of a model in terms of mycobacterial pathogenicity, virulence and drug-resistance. Res. Microbiol. 1991; 142: 464-76.
5. Normas e manuais técnicos/Caderno de atenção básica. Ministério da Saúde. Brasília, 2007. 1ªed.
6. Hasting, RC. Leprosy. Edinburg: Churchill Livingstone.
7. Godal, T, Lofgren, M, Negassi K. Immune response to M. leprae of healthy leprosy contacts. Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis. 1972; 40: 243-50.
8. Casanova, JL, Abel, L. Genetic dissection of immunity to mycobacteria : the human model. Ann. Ver. Immunol. 2002; 20: 581-620.
9. Basombrio, B, Cochrane, R.G, Prieto J.G, Khanplkar, V.R, Kitamura, K, Latapi, F, Rabello, F.E.A,Vegas, M, Wade, H.W, Arnold, H. Comission of classification – Draft Report of Classification Committee. In: Memoria de VI Congresso Internacional de Leprologia 1953, Madrid. Gobierno de Espana y Asociacion Internacional de la Lepra: 1953, p. 75-86.

10. Ridley, DS, Jopling, H. Classification of leprosy according to immunity: five group system. *Int. J. Lepr.* 1966; 34: 255-73.
11. Bhatia, AS, Katoch, K, Rangarajan, B, Narayanan, RB, Mukher, JEE. Clinical and histopathological correlation in the classification of leprosy. *Int. J. Of Leprosy.* 1993; 3(61): 433-8.
12. Who. Expert Committee on Leprosy. Seventh report. Geneva: World Health Organization.
13. Opromolla, DVA. *Noções de Hansenologia.* Bauru; 2000
14. Chae, GT, Kim, MJ, Kang, TJ. DNA-PCR and RT-PCR for the 18-kDA gene of *Mycobacterium leprae* to assess the efficacy of multi-drug therapy for leprosy. *J Med Microbiol.* 2002; (51): 417-22.
15. World Health Organization Study Group. Chemotherapy of leprosy for control programs. Report. Geneva; 1982. (WHO – Technical Report Series. Geneva, 675).
16. Hanseníase/Situação epidemiológica. Disponível em: < <http://www.portal.saude.gov>> Acesso em: 2013.
17. World Health Organization Study Group. Chemotherapy of leprosy for control programs. Report. Geneva; 1982. (WHO – Technical Report Series. Geneva, 675).
18. Pettit, JHS, Rees, RJW. Sulfone resistance in leprosy. An experimental and clinical study. *Lancet* 1964; 2: 673.
19. Baohong, J. Drug resistance in leprosy – a review. *Lepr. Rev.* 1985; 56: 265-78.
20. Shepard, CC. The experimental disease that follows the injection of human leprosy bacilli into foot-pads of mice. *J. Exper. Med.* 1960; 112: 445-54.

21. Pettit, JHS, Rees, RJW. Sulfone resistance in leprosy. An experimental and clinical study. *Lancet* 1964; 2: 673.
22. Matsuoka, M, Kashiwabara, Y, Namisato, M. A *Mycobacterium leprae* isolate resistant to dapson, rifampin, ofloxacin and sparfloxacin. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 2000; 68 (4): 452-55.
23. Baohong, J. Drug resistance in leprosy – a review. *Lepr. Rev.* 1985; 56: 265-78.
24. Grosset, JH. Study of 39 documented relapses of multibacillary leprosy after treatment with rifampin. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1989; 57: 607-14.
25. Williams, D.L.; Spring, L.; Harris E. et al. Dihydropteroate synthase of *Mycobacterium leprae* and dapson resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44 (6):1530-37, June 2000.
26. World Health Organization. Guidelines for Global Surveillance of Drug Resistance in Leprosy. 2009; 32p.
27. Williams, DL, Gillis, TP. Molecular detection of drug resistance in *Mycobacterium leprae*. *Leprosy Review.* 2004; 75: 118-30.
28. You, EY, Kang, TJ, Kim, SK, Lu, SB, Chae GT. Mutations in genes related to drug resistance in *Mycobacterium leprae* isolates from leprosy patients in Korea. *Journal of infection.* 2005; 50: 6-11.
29. Honoré, N. & Cole, S.T. Molecular basis of rifampin resistance in *Mycobacterium leprae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 37: 414-18, 1993.
30. Kamble, RR, Shinde VS, Madhale SP, Kamble AA, Pavikumar BP, Jadhav RS. Extracion and detection of *Mycobacterium leprae* DNA from ZNF-stained skin smear slides

for better identification of negative skin smears. Indian Journal of Microbiology, 2010; 28(1): 57-9.

31. Fontes, ANB et al . Genotyping of *Mycobacterium leprae* present on Ziehl-Neelsen-stained microscopic slides and in skin biopsy samples from leprosy patients in different geographic regions of Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2013 . Available from http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S007402762012000900021&lng=en&nrm=iso access on 14 Feb. 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762012000900021>.

32. Van der Zanden AGM, Te Koppele-Vije EM, Vijaya Bhanu N, Van Soolingen D and Schouls LM. Use of DNA extracts from Ziehl-Neelsen-stained slides for molecular detection of rifampin resistance and spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 2003; 41(3): 1101-8.

33. Jensen, RW, Rivest, J, Li W, Vissa, V. DNA Fingerprinting of *Mycobacterium leprae* Strains Using Variable Number Tandem Repeat (VNTR) - Fragment Length Analysis (FLA). J Vis Exp. 2011 Jul 15;(53). pii: 3104. doi: 10.3791/3104.

34. Silva, Marcio Roberto et al . Identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex based on amplification and sequencing of the *oxyR* pseudogene from stored Ziehl-Neelsen-stained sputum smears in Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 106, n. 1, Feb.2011. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762011000100002&lng=en&nrm=iso>.access15 Feb. 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762011000100002>.

35. Kamal, R, Natrajan M, Katoch K, Katoch VM. Evaluation of diagnostic role of in situ PCR on slit-skin smears in pediatric leprosy. Indian J Lepr. 2010 Oct-Dec;82(4):195-200.

36. Schnoor, SK. Otimização de tecnica de extração de DNA de *Mycobacterium leprae* de lâminas do exame baciloscópico para diagnóstico e detecção da variabilidade genética. [monografia]. Bauru. Instituto Lauro de Souza Lima. 2008.

37. World Health Organization. Guidelines for Global Surveillance of Drug Resistance in Leprosy. 2009; 32p.
38. Walsh, PS, DA Metzger, e R. Higuchi. 1991. Chelex[®]. 100 como um meio de extracção simples de ADN para a PCR-based tipagem de material forense *Biotechniques* 10 (4): 506-13.
39. Suenaga, E., H, Nakamura. 2005. Avaliação de três métodos para a extracção eficaz de DNA a partir de cabelo humano. *J Chromatography Biology Analyt Technol Biomed Life Sei* 820 (1): 137-41.
40. Vandenberg, N., RA van Oorschot, e RJ Mitchell. 1997. Uma avaliação das estratégias de DNA seleccionados de extracção para tipagem curta em tandem repeat. *Electrophoresis* 18 (9): 1624-6.
41. Doce, D, M. Lorente, A. Valenzuela, JA Lorente, e JC Alvarez. 1996. Aumentar o rendimento de extracção de ADN a partir de manchas de saliva com um método de Chelex modificado. *Forensic Sci Int* 83 (3): 167-77.
42. Willard, JM, DA Lee, e MM Holanda. 1998. Recuperação do ADN por amplificação por PCR a partir de sangue e amostras forenses utilizando uma resina quelante. *Métodos de Biologia Molecular* 98: 9-18.
43. Willard, JM, DA Lee, e MM Holanda. 1998. Recuperação do ADN por amplificação por PCR a partir de sangue e amostras forenses utilizando uma resina quelante. *Métodos de Biologia Molecular* 98: 9-18;
44. Kit DNeasy Blood and Tissue Kits - Qiagen[®]. Genomic DNA. Disponível em: < <http://www.qiagen.com/Products/Catalog/SampleTechnologies/DNASampleTechnologies/Genomic-DNA/DNeasy-Blood-and-Tissue-Kit#orderinginformation> > Acesso em: 2013.

45. Ridley, DS. 1971. The SFG (Solid-Fragmented-Granular) Index for bacterial morphology. *Leprosy Review* 42: nº 2, 273-277.
46. Patrícia S. Rosa et al. Resistência a drogas em pacientes multibacilares da colônia de Santo Antonio do Prata/PA e Rondonópolis/MT, tratados entre 1994 e 2004. [resumo]. *Hansen. int.* 2011, vol 36(1), supl.(1).
47. Comey, CT .1994. DNA amplificado estratégias de extração para análise de polimorfismo de comprimento de fragmentos. *J Forensic Sci* 39 (5): 1254-1269.
48. Kang, TJ, Kim, SK, Lee, SB, Chae, GT, Kim, JP. Comparison of two different PCR amplification products (the 18-kDa protein gene vs. RLEP repetitive sequence) in the diagnosis of *Mycobacterium leprae*. *Clin Exp. Dermatol.* 2003; 28: 420-4.

8. Anexos



Instituto Lauro de Souza Lima
Caixa Postal 3021 – CEP: 17034-971 – Bauru/ SP/ Brasil
Fone: 55 14 3103-5921
Fax: 55 14 3103-5914

CT.: C.E.P. nº 063/2011

Bauru, 17 de novembro de 2011

Ilma. Sra.
Suzana Madeira Diorio

Prezada Senhora,

O projeto de pesquisa intitulado “Detecção de mutações associadas a resistência a drogas em hanseníase a partir de DNA do *Mycobacterium leprae* extraído de lâminas de baciloscopia coradas por Ziehl-Neelsen”, protocolo 228/11, foi apreciado neste Comitê de Ética em Pesquisa, e foi **APROVADO**.

Aproveitamos a oportunidade para reiterar nossos protestos do mais elevado apreço.
Atenciosamente

Dra Ida Maria Foschiani Dias Baptista
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
Instituto Lauro de Souza Lima