

## 5 – RESULTADOS

Do total de 128 amostras estudadas, obtidos de 128 pacientes, 66 casos (51,56%) foram do sexo masculino e 62 casos (48,48%) do sexo feminino. A idade dos pacientes variou de 03 anos a 88 anos, com maior incidência na faixa etária de 20 a 29 anos no sexo masculino, que apresentou 18 casos (27,28%). No sexo feminino a faixa etária de maior frequência foi entre 40 a 49 anos com 19 casos (43,93%). Tanto no sexo masculino como no feminino houve um discreto predomínio em pacientes de cor branca com 29 casos masculinos (43,93%) e 22 casos femininos (35,48%).

**Tabela 13:** Distribuição por sexo, faixa etária e cor.

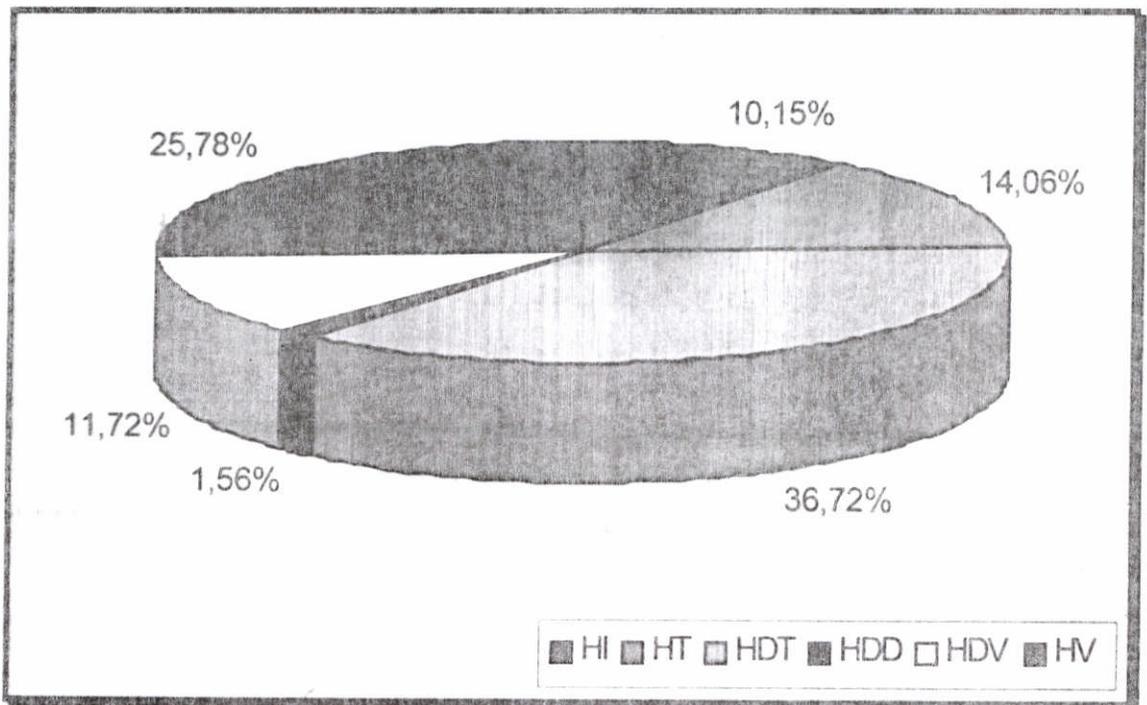
Idade/Cor	Sexo Masculino					Sexo Feminino					Sub. T. Masc./Fem.
	Br	Pd	Pt	N. Inf	Sub.T	Br	Pd	Pt	N. Inf	Sub. T.	
0 – 09	02	00	01	00	03	01	00	00	00	01	04
10 – 19	01	01	05	00	07	03	02	02	01	08	15
20 – 29	07	03	07	01	18	02	03	00	00	05	23
30 – 39	04	03	02	00	09	01	01	04	00	06	15
40 – 49	08	01	01	02	12	06	05	05	03	19	31
50 – 59	03	03	01	00	07	02	03	00	00	05	12
60 – 69	03	01	01	00	05	01	03	01	00	05	10
70 – 79	01	00	00	00	01	04	01	00	01	06	07
80 – 89	00	00	01	00	01	01	01	00	00	02	03
N. Inf.	00	01	00	02	03	01	01	00	03	05	08
	29	13	19	05	66	22	20	12	08	62	128

Br - branca / Pd - Parda / Pt - Preta / N. Inf. - Não Informado / Sub.T - Sub. Total

### 5.1 – Resultado do exame histopatológico em HE e Wade: perfil amostra.

Os 128 materiais obtidos de 128 pacientes portadores de hanseníase foram analisados pelo exame histopatológico, utilizando-se a classificação de Ridley e Jopling, 1962.

A forma clínico-histopatológica mais freqüente foi a HDT com 47 casos (36,72%), seguidas de HV com 33(25,78%), HT com 18 (14,06), HDV com 15 (11,72%), HI com 13(10,15%) e a forma menos freqüente foi HDD com dois casos (1,56%) (Gráfico 1).



**Gráfico 1:** Frequência das formas clínico-histopatológicas da hanseníase, representada em porcentagem de casos.

Os 128 materiais foram analisados pela coloração de Wade para a identificação do baar e apresentou o seguinte resultado: 55 casos (43,00%) foram positivos para baar e constituem o grupo MB. E 73 casos (57,00%) foram negativos e constituem o grupo PB (Gráfico 2).

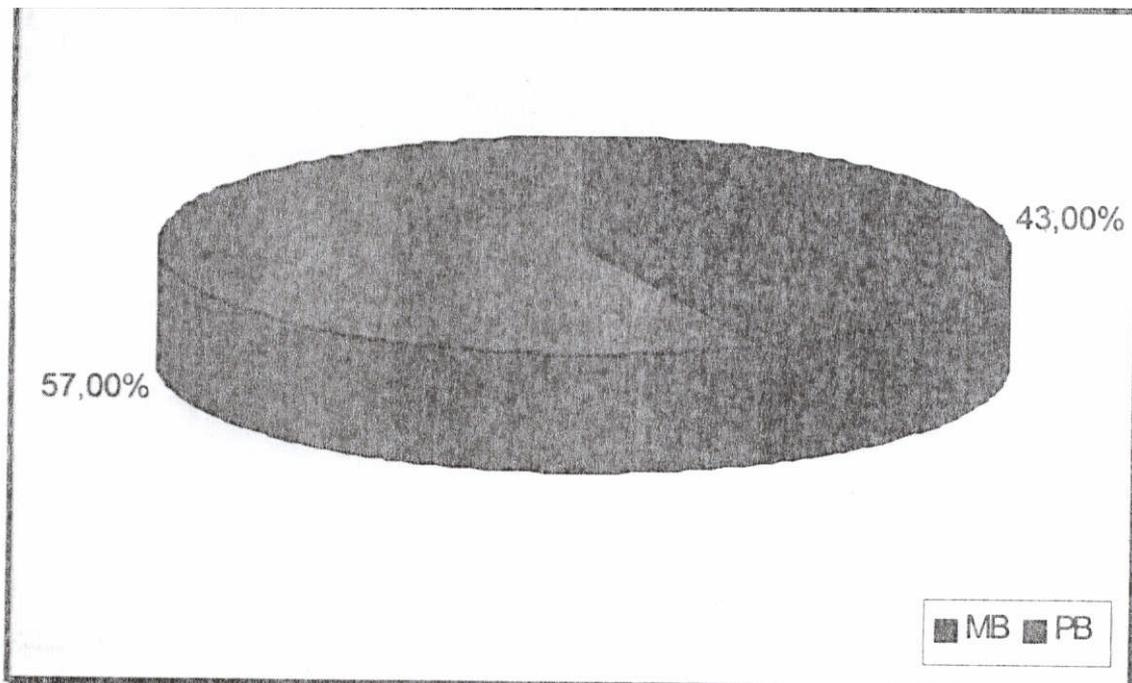


Gráfico 2 : Frequência dos casos de hanseníase PB e MB pela coloração de Wade, do total de casos estudados, representada em porcentagem.

Os 73 casos com baar negativo (PB) foram classificados histopatologicamente em 13 casos (17,80%) com a forma HI, 18 casos (24,60%) de HT e 42 casos (57,60%) HDT (Gráfico 3).

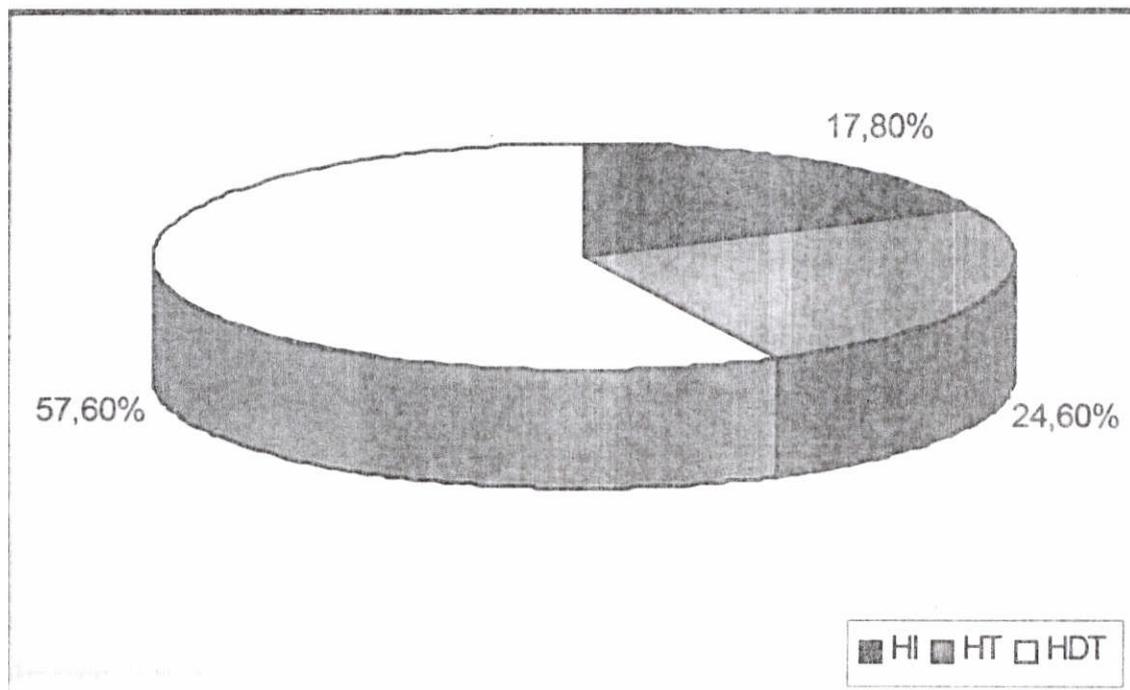


Gráfico 3: Frequência das formas clínico-histopatológicas de hanseníase PB, representada em porcentagem.

Os 55 casos com baar positivo (MB) foram classificados clínico-histopatologicamente em 5 casos (9,10%) de HUT, 2 casos (3,60%) de HDD, 15 casos (27,30%) de HDV e 33 casos (60,00%) de F-IV (Gráfico 4).

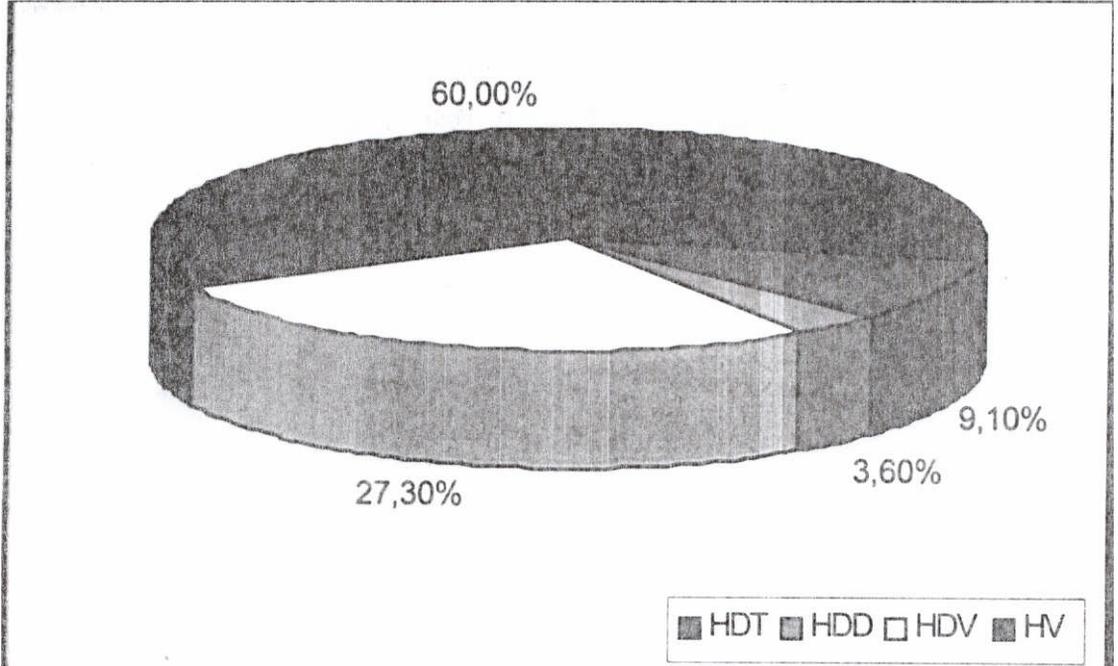


Gráfico 4: Frequência das formas clínico-histopatológicas de hanseníase MB, representada em porcentagem.

## 5.2 - Resultado global da PCR

Dos 128 casos submetidos à técnica da PCR, ocorreu amplificação em 105 casos (82,00%), são os casos de PCR positiva (PCR +), 23 casos (18,00%) não amplificaram, são os casos com a PCR negativa (PCR -) (Gráfico 5).

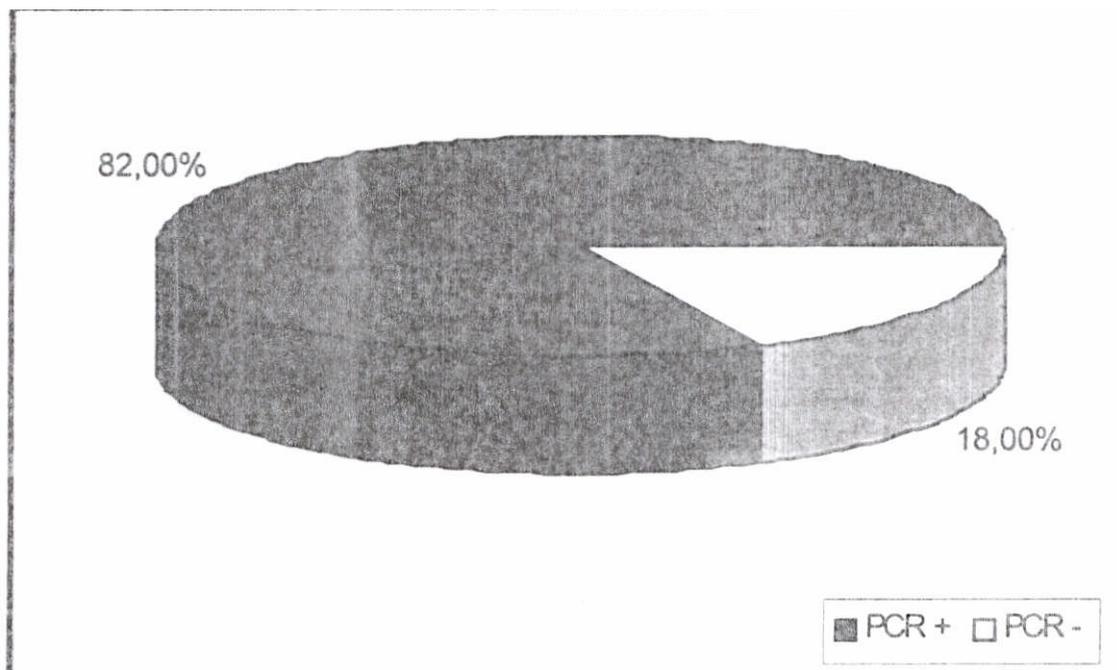
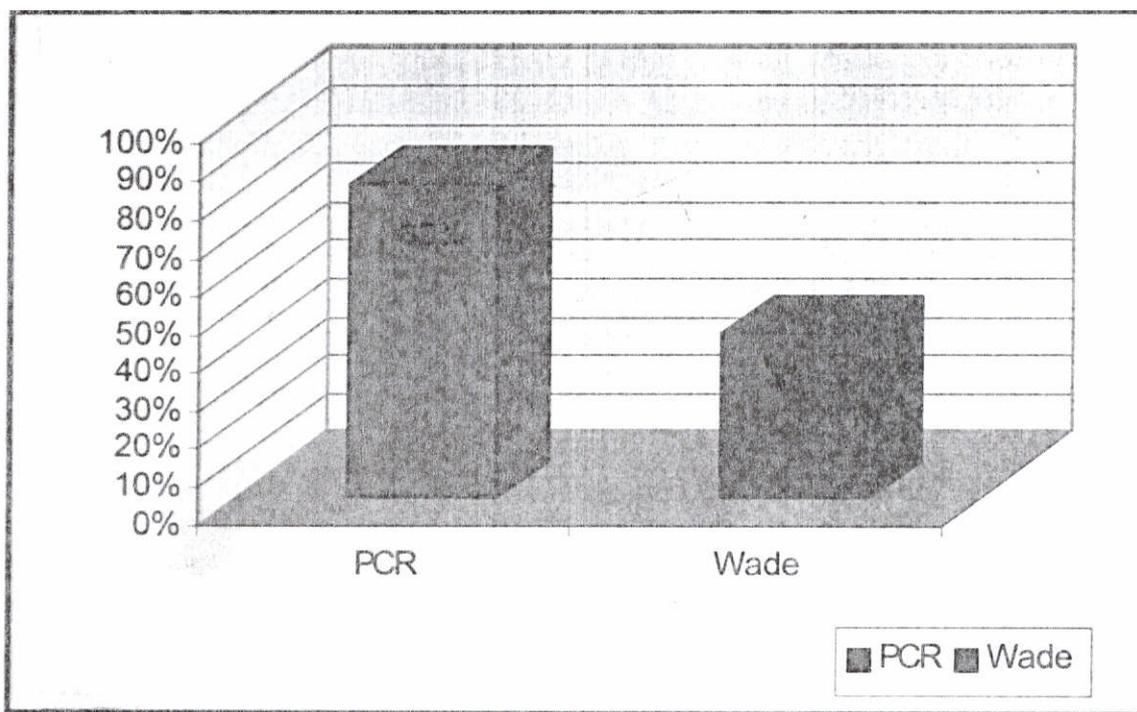


Gráfico 5: Resultado da PCR nas 128 amostras de hanseníase, representado em porcentagem.

### 5.3 - Resultado comparativo entre o método da PCR, e de Wade.

Das 128 amostras de pele fixadas em formol e emblocadas em parafina, o exame histopatológico corado pelo método de Wade apresentou positividade em 55 casos (43,00%) e pela técnica da PCR a positividade ocorreu em 105 casos (82,00%).



**Gráfico 6:** Resultado da positividade entre o método da PCR e Wade.

A PCR apresentou positividade diferente entre os dois grupos de hanseníase. Na forma PB, a PCR foi positiva em 62 casos (35,00%) e não amplificou em 11 casos (15,00%) (Gráfico 7).

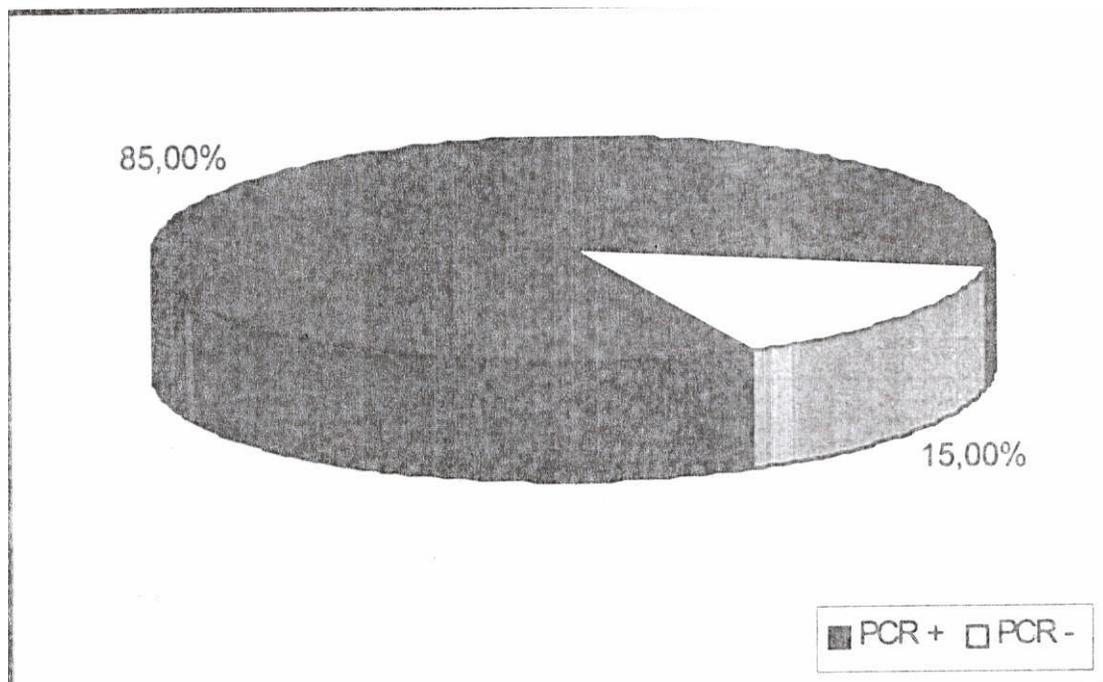


Gráfico 7: Resultado da PCR na forma da hanseníase PB, representado em porcentagem.

No grupo PB, a positividade da PCR ocorreu em 11 casos (15,06%) na forma HI, em 16 casos (21,90%) na forma HT e em 35 Casos (48,00%) na forma HDT (Gráfico 8).

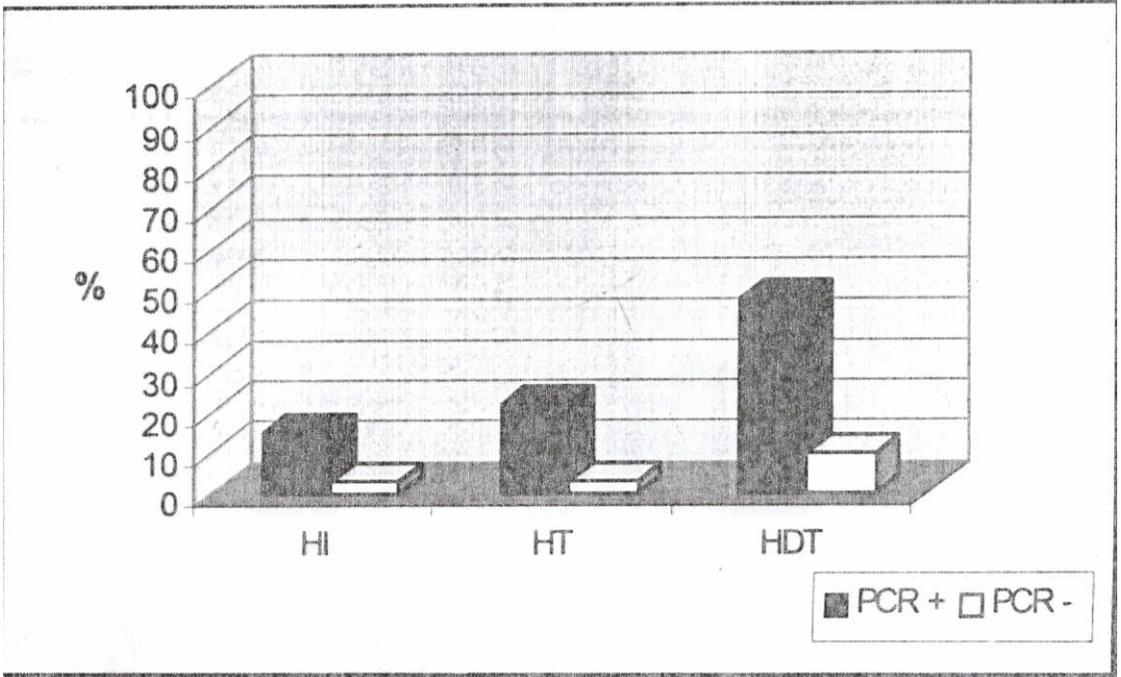


Gráfico 8: Resultado da PCR nas diversas formas da hanseníase PB, representado em porcentagem:

HI = 15,06%

HT = 21,90%

HDT = 48,00%

Resultado comparativo entre o exame histopatológico pela coloração de Wade e a técnica da PCR, nos casos da hanseníase PB.

O exame histopatológico pelo Wade não demonstrou presença de bacilos em nenhum caso (0,00%), e, pela técnica da PCR a positividade ocorreu em 62 casos (85,00%).

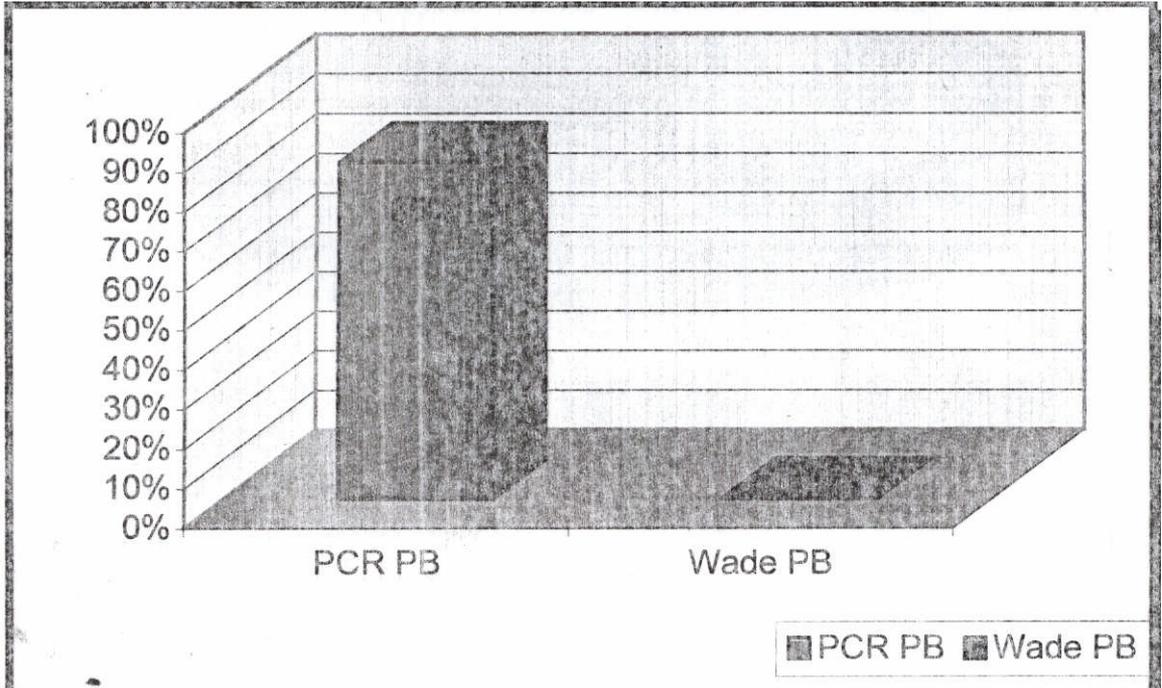
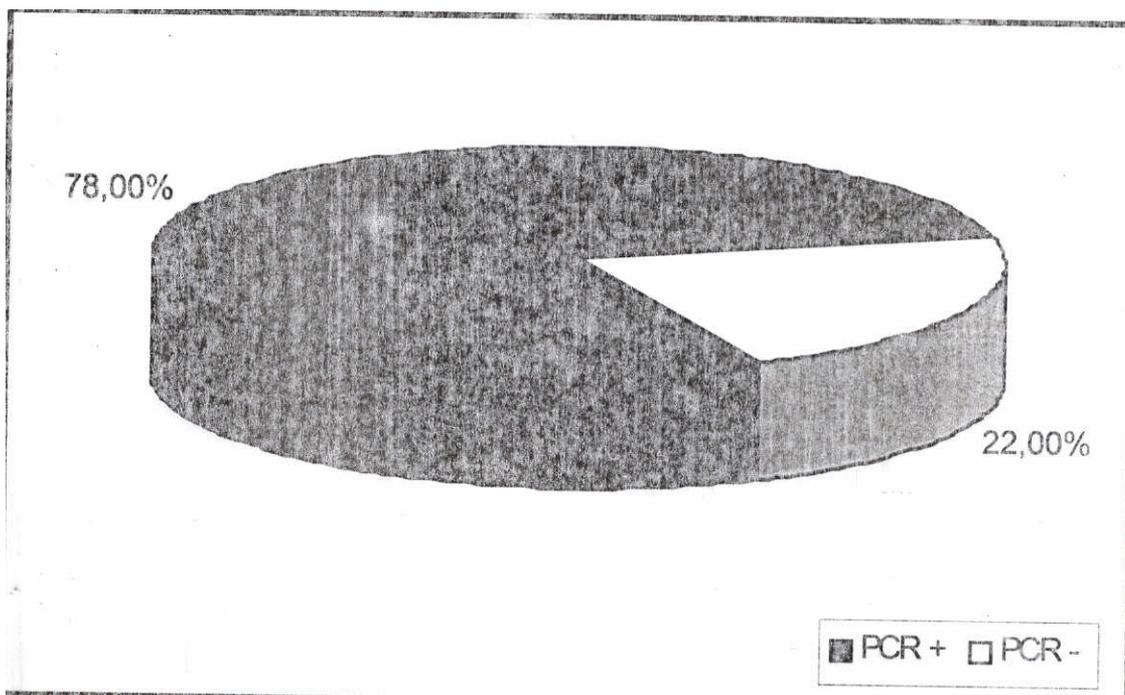


Gráfico 9: Resultado comparativo entre a PCR e Wade na hanseníase PB.

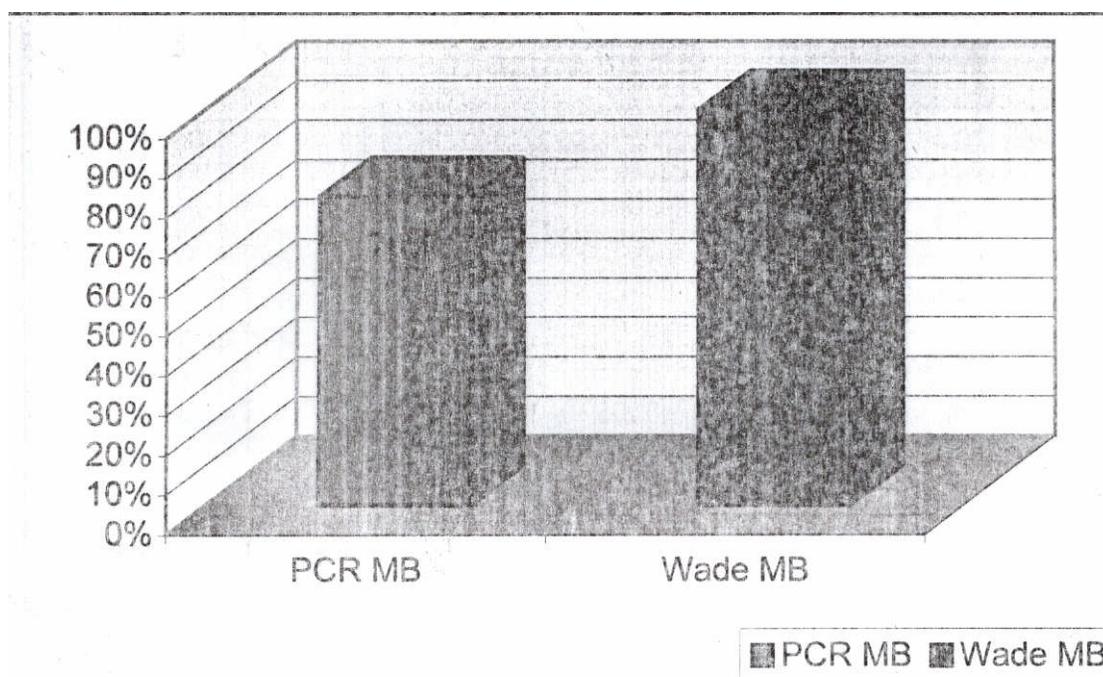
Nos 55 casos de MP, a PCR amplificou 43 casos (78,00%) e não amplificou 12 casos (22,00%) (Gráfico 10).



**Gráfico 10:** Resultado da PCR na forma da hanseníase MB, representado em porcentagem.

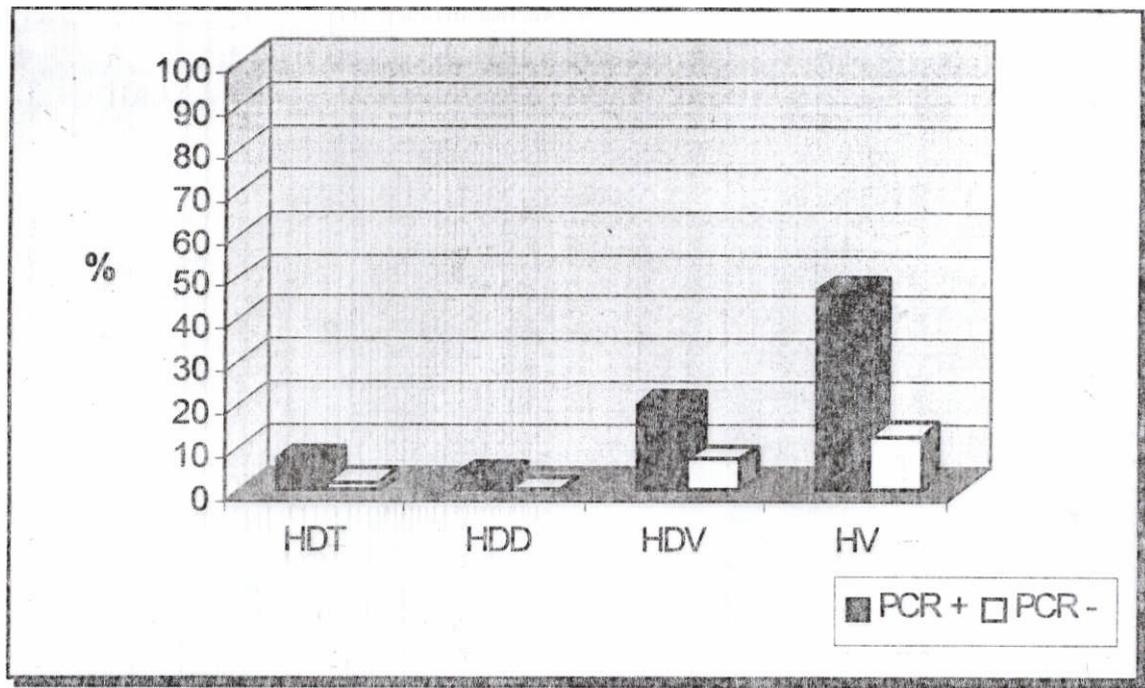
Resultado comparativo entre o exame histopatológico pela coloração de Wade e a técnica da PCR, nos casos da hanseníase MB.

A coloração de Wade demonstrou presença de bacilos em 55 casos (100,00%) e a técnica da PCR foi positiva em 43 casos (78,00%).



**Gráfico 11:** Resultado comparativo entre o método da PCR e Wade na hanseníase MB.

A positividade da PCR em diferentes grupos de MB foi em quatro casos (7,20%) de HDT, dois casos (3,60%) de HDD, 11 casos (20,00%) de HDV e 22 casos (47,20%) em HV (Gráfico 12).



**Gráfico 12:** Resultado da PCR nas diversas formas da hanseníase MB, erro percentagem:

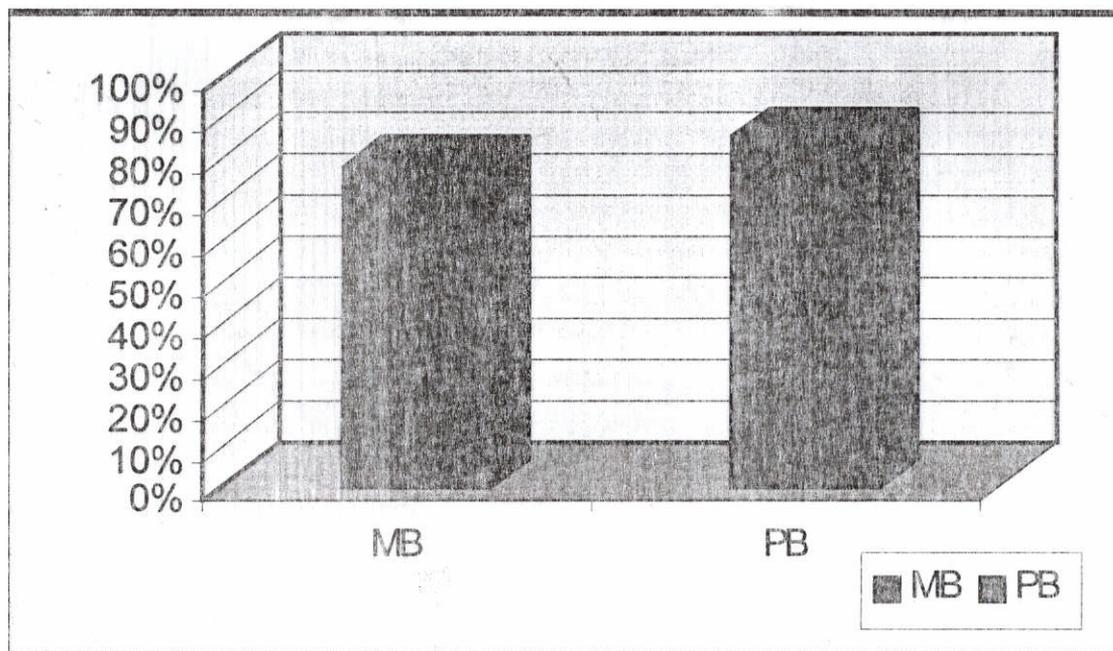
HDT = 7,20%

HDD = 3,60%

HDV = 20,00%

HV = 47,20%

Não foi observada a diferença significativa ( $P < 0,05$ ) quando comparada a porcentagem de positividade da PCR nas amostras de lesões paucibacilares (PB) e multibacilares (MB) (Gráfico 13).



**Gráfico 13:** Resultado da PCR nas formas da hanseníase PB e MB.

Comparação do resultado, em porcentagem, de PCR positiva e negativa nas diversas formas clínico-histopatológicas da hanseníase PB e MB (Gráfico 14).

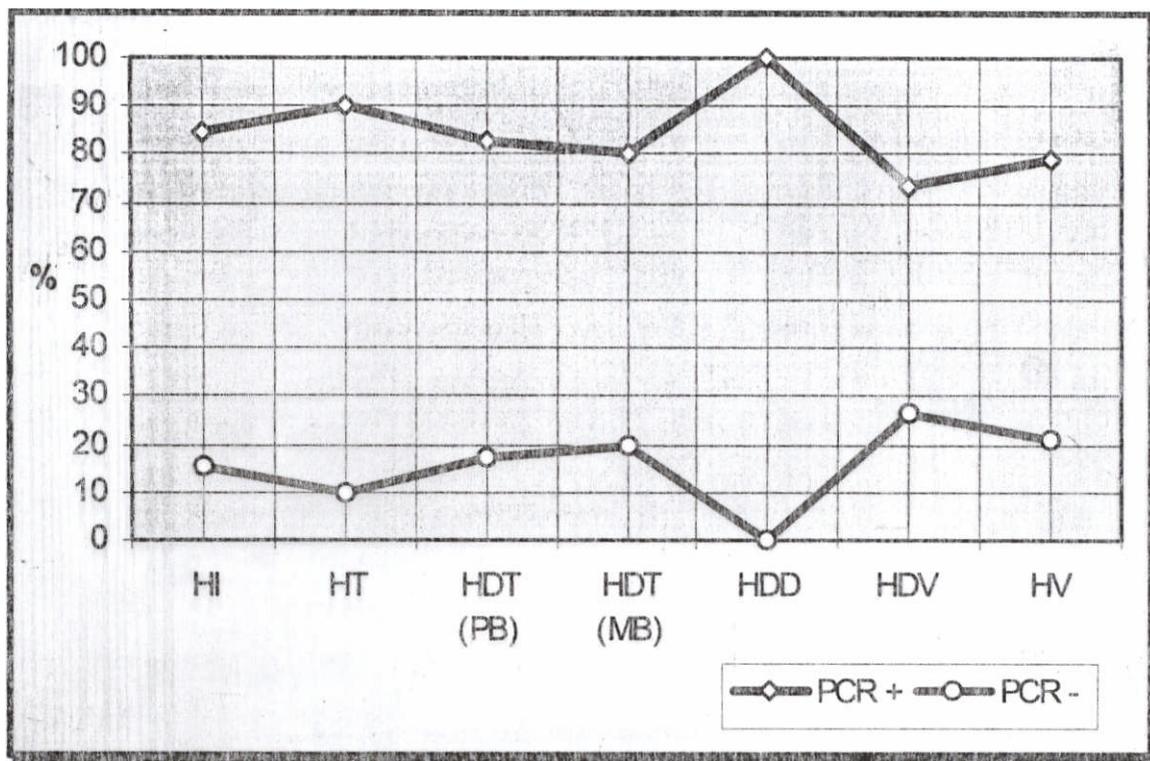


Gráfico 14: Resultado comparativo de PCR + e PCR - nas diversas formas clínicas da hanseníase, em porcentagem de ocorrência:

HI (13 casos) = 84,62%: PCR +; 15,38%: PCR -

HT (18 casos) = 88,89%; PCR +; 11,11%: PCR -

HDT (42 casos PB) = 83,34%: PCR +; 16,66%: PCR -

HDT (05 casos MB) = 80,00%; PCR +; 20,00%: PCR -

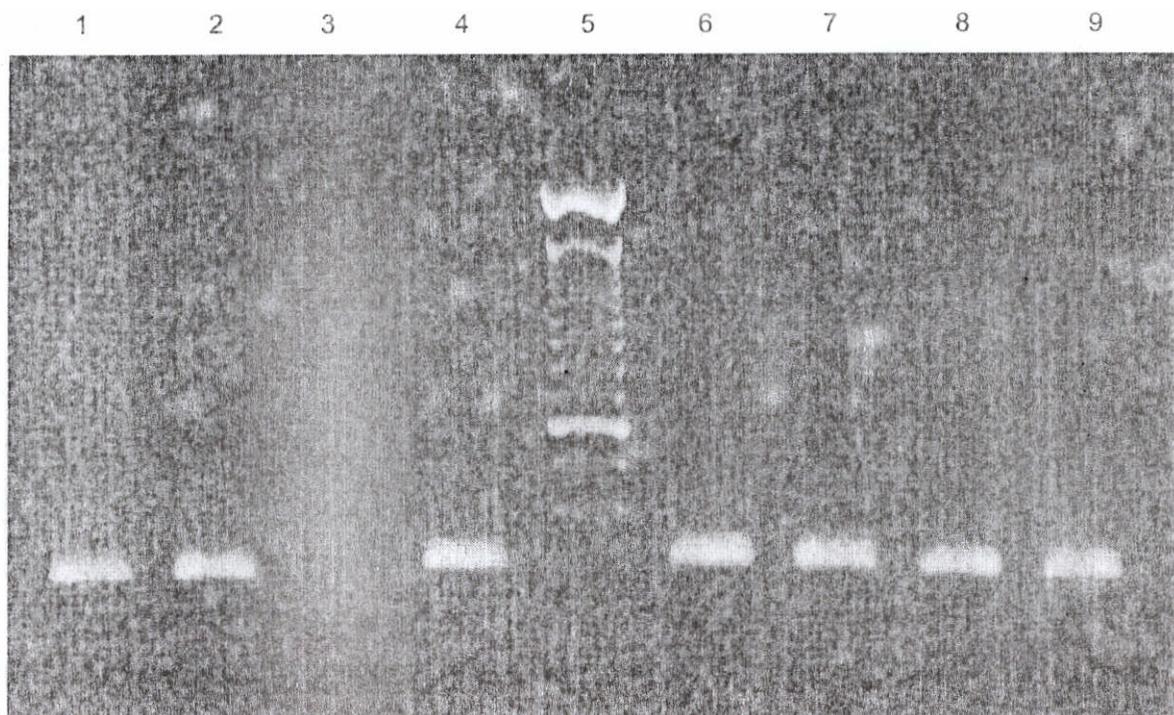
HDD (02 casos) = 100,00%: PCR +

HDV (15 casos) = 73,33%: PCR +; 26,67%: PCR -

HV (33 casos) = 78,80%: PCR +; 21,20%: PCR -

#### 5.4 - Documentação fotográfica dos produtos amplificados

Resultado do teste de inibidores na reação da PCR nas amostras de tecido fixado, pela  $\beta$ -actina que amplificou fragmento de 304pb (Figura 1).



**Figura 1:** Fotografia do gel de agarose a 1,5% após separação eletroforética dos produtos da PCR pela  $\beta$ -actina. Linhas 1, 2, 4, 6, 7, 8 e 9: gene  $\beta$ -actina positiva; Linha-a:  $\beta$ -actina negativa; Linha 1: OP; Linha 2: ON; Linha 3: CR (somente reagentes); Linha 4: PB com POP, positiva; Linhas 6 e 7: MB com PCR positiva. Linha 8: -MB com PCR negativa; Linha 9: PB com POR negativa; Linha 5; marcador de tamanho molecular (100pb).

Resultado dos produtos da primeira etapa da FOR utilizando os iniciadores T<sub>1</sub>U<sub>2</sub> e T<sub>1</sub>D amplificaram o DNA do gênero *Mycobacterium* com fragmentos de 310pb nas amostras de tecidos fixados (Figura 2).

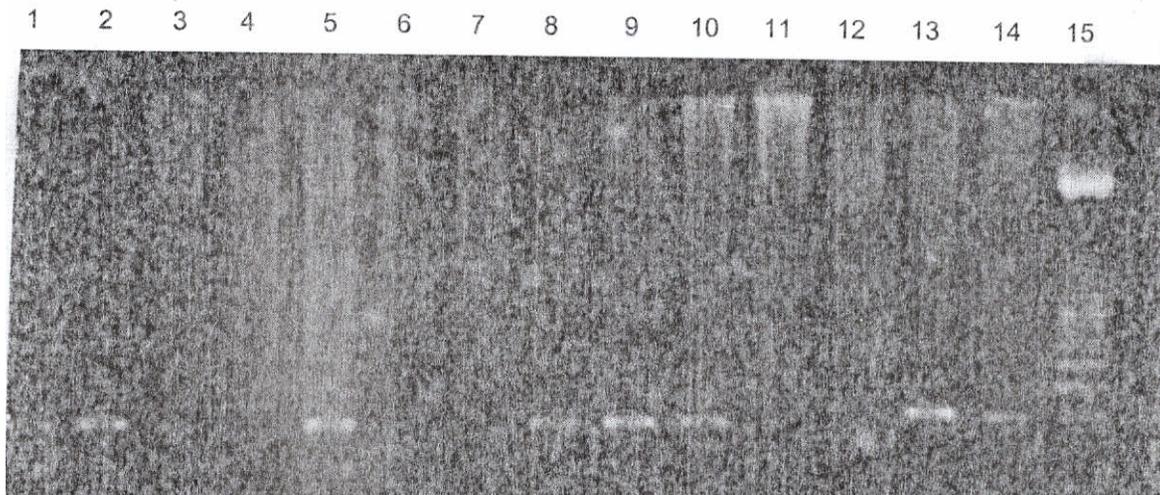


Figura 2 Fotografia do gel de agarose a 2% após separação eletroforética dos produtos da POR. Linhas 2, 5; 10 e 13: MB com PCR positiva; Linhas 7 e 11: MB com PCR negativa; Linhas 1, 9 e 14: PB com POR positiva; Linhas 3 e 12: PB com PCR negativa; Linha 4: ON; Linha 8: OP; Linha 6: CR; Linha 15: marcador de tamanho molecular (100pb).

Produtos da segunda etapa da PCR, com fragmento de 133pb, submetidos a ação enzimática com enzima de restrição Alu1 para a caracterização da espécie *M. leprae* resultando em fragmentos de 1100 das amostras de tecidos fixados (Figura 3).

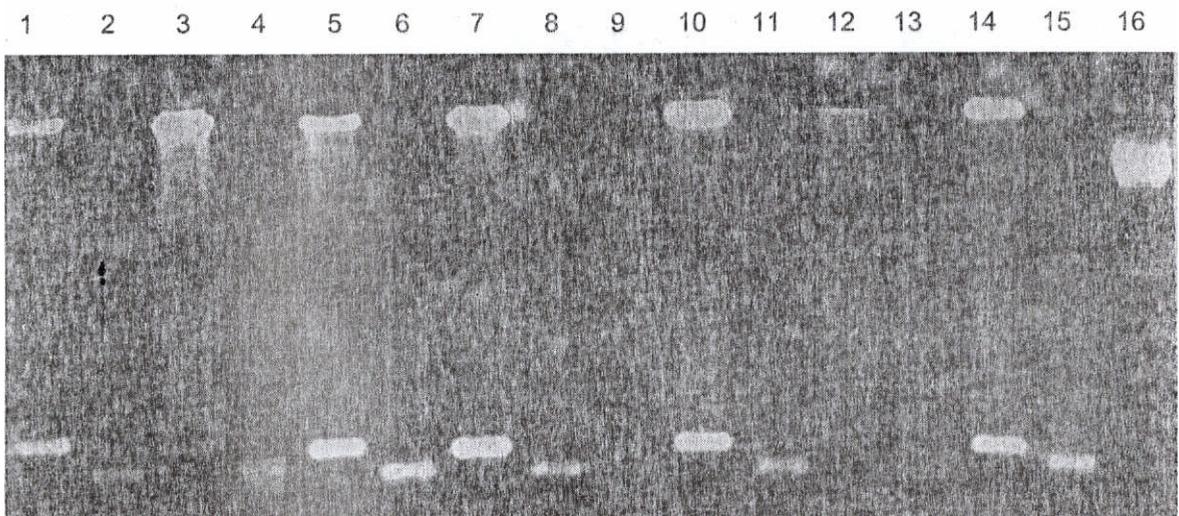
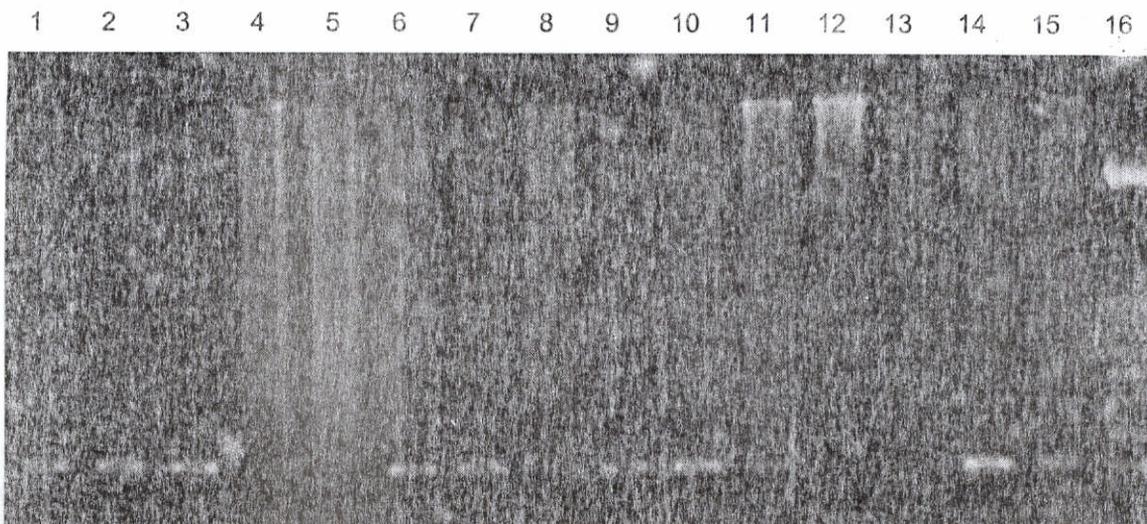


Figura 3: Fotografia do gel de agarose a 2% após separação eletroforética dos produtos da POR e da digestão enzimática pela Alu-1. Linhas 1, 3, 5, 7, 10 e 14: segunda etapa da POR amplificou 133pb; Linhas 2, 4, 6, 8, 11 e 15: digestão pela enzima de restrição Alu1 do produto da segunda etapa da POR dos materiais das linhas 1, 3, 5, 7, 10 e 14, respectivamente, e resultou fragmento de 110pb; Linha 5: CP produto da segunda etapa da POR ; Linha 6: CP - digestão pela enzima de restrição Linha 9: CR não ocorreu amplificação; Linhas 12 e 13: ON não ocorreu a amplificação; Linha 16: marcador de tamanho molecular (100pb).

O resultado da ação enzimática com AluI sobre os produtos da segunda etapa da PM, amplificaram o DNA específico para a espécie *M. leprae* com fragmentos de 110 pb no gene groEL (Figura 4).



**Figura 4:** Fotografia do gel de agarose a 2% após separação eletroforética dos produtos da digestão enzimática com Alu-1 dos produtos da PCR, no gene groEL. Linhas 6, 7, 10 e 14: PB com PCR positiva (fragmentos de 110pb); Unha 8: PB com PCR negativa; Linhas 1, 2, 9, 11 e 15: MB com PCR positiva; Linhas 12 e 13: MB com PCR negativa; Linhas 4: ON; Linha 5: OR; Linha 3: CP; Linha 16: Marcador de tamanho molecular (100pb).

### 5.5 - Resultado da sensibilidade da PCR

O DNA extraído do CP amplificou em todas as diluições (1/10, 1/100 e 1/1000). Os CN e CR, não amplificaram. As dez amostras PCR positiva amplificaram na diluição de 1/10. As amostras de PB (1 a 4) amplificaram até a diluição de 1/100. As amostras de MB (5 a 10) amplificaram até a diluição de 1/10. (Tab. 13).

**Tabela 14:** Resultado da sensibilidade nas amostras com PCR positiva: PB (1 a 4) e MB (5 a 10).

	NORMAL	DILUIÇÕES		
		1/10	1/100	1/1000
CP	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
CN	0,0	0,0	0,0	0,0
CR	0,0	0,0	0,0	0,0
Amostra 1	Positiva	Positiva	Positiva	0,0
Amostra 2	Positiva	Positiva	Positiva	0,0
Amostra 3	Positiva	Positiva	Positiva	0,0
Amostra 4	Positiva	Positiva	Positiva	0,0
Amostra 5	Positiva	Positiva	0,0	0,0
Amostra 6	Positiva	Positiva	0,0	0,0
Amostra 7	Positiva	Positiva	0,0	0,0
Amostra 8	Positiva	Positiva	0,0	0,0
Amostra 9	Positiva	Positiva	0,0	0,0
Amostra 10	Positiva	Positiva	0,0	0,0

Seis amostras da hanseníase MB com PCR negativa foram submetidas ao teste de sensibilidade na diluição de 1/10, 1/100 e 1/1000.

O CP amplificou em todas as diluições. O CN e CR não amplificaram em nenhuma diluição.

Duas amostras inicialmente negativas (amostra 1 e 2) positivaram na diluição de 1/10 e 1/100, indicando presença de inibidores. As demais amostras permaneceram negativas (Tab. 15).

**Tabela 15:** Resultado do teste de sensibilidade das amostras MB com PCR negativa.

	NORMAL	DILUIÇÕES		
		1/10	1/100	1/1000
CP	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
CN	0,0	0,0	0,0	0,0
CR	0,0	0,0	0,0	0,0
Amostra 1	0,0	Positiva	Positiva	0,0
Amostra 2	0,0	Positiva	Positiva	0,0
Amostra 3	0,0	0,0	0,0	0,0
Amostra 4	0,0	0,0	0,0	0,0
Amostra 5	0,0	0,0	0,0	0,0
Amostra 6	0,0	0,0	0,0	0,0

#### 5.6 - Resultado do teste de inibidores

O resultado do teste de inibidores, pela  $\beta$ -actina, no CP, CN e nas amostras com PCR positiva, amplificaram fragmentos de 304pb, indicando ausência de inibidores. O CR, não ocorreu amplificação (Tab.16).

**Tabela 16:** Resultado do teste de inibidores da PCR pela  $\beta$ -actina nas amostras com PCR positiva. Amostras (1 a 3) PB e (4 a 6) MB.

	RESULTADOS
CP	Positiva para $\beta$ -actina
CN	Positiva para $\beta$ -actina
CR	0,0
Amostra 1	Positiva para $\beta$ -actina
Amostra 2	Positiva para $\beta$ -actina
Amostra 3	Positiva para $\beta$ -actina
Amostra 4	Positiva para $\beta$ -actina
Amostra 5	Positiva para $\beta$ -actina
Amostra 6	Positiva para $\beta$ -actina

O resultado do teste de inibidores, pela  $\beta$ -actina, das amostras da hanseníase MB com PCR negativa revelou provável presença de inibidores nas amostras 5 e 6. (Tab. 17)

Tabela 17: Resultado do teste de inibidores da PCR pela  $\beta$ -actina nos casos MB com PCR negativa.

	<b>RESULTADOS</b>
CP	Positiva para $\beta$ -actina
CN	Positiva para $\beta$ -actina
CR	0,0
Amostra 1	Positiva para $\beta$ -actina
Amostra 2	Positiva para $\beta$ -actina
Amostra 3	Positiva para $\beta$ -actina
Amostra 4	Positiva para $\beta$ -actina
Amostra 5	0,0
Amostra 6	0,0