

CASUÍSTICA E MÉTODOS



3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. Casuística

O grupo de estudo foi constituído por 43 indivíduos, dos quais 25 eram pacientes com hanseníase atendidos no Serviço de Dermatologia Dr. Diltor Opromolla, do Instituto Lauro de Souza Lima de Bauru, e 18 eram voluntários sadios, funcionários da mesma instituição, que participaram como grupo controle. Dos 25 pacientes estudados, 13 eram do sexo feminino e 12 do sexo masculino, com idade variando de 38 a 76 anos.

Os pacientes foram classificados de acordo com os critérios estabelecidos no 6º Congresso Internacional de Madri (1953)⁽²⁰⁾, sendo **09** virchovianos, **06** dimorfos e **10** tuberculóides. Levando-se em conta o esquema de PQT estabelecido pela OMS (1982)⁽²²⁾, os pacientes foram ainda classificados em MB (15) e PB (10). Entre os 25 pacientes avaliados, 13 apresentaram reações, sendo 08 com reação tipo 1 e 05 com reação tipo 2.

Ao serem incorporados no estudo, os pacientes e o grupo controle foram esclarecidos sobre os propósitos dos procedimentos a serem adotados tendo a coleta de sangue sido realizada após plena concordância deles e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. A Comissão de Ética em Pesquisa do Instituto Lauro de Souza Lima emitiu parecer favorável à realização deste estudo (anexo).

3.2. Métodos

3.2.1. Exame Baciloscópico

A baciloscopia foi realizada no momento do diagnóstico, de modo que o IB de cada paciente foi calculado pela média dos índices de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) nos esfregaços de linfa cutânea, colhidos em

quatro locais (lesão ativa ou área com alteração de sensibilidade, lóbulos auriculares, cotovelo)(66), corados pelo método de Ziehl-Neelsen e quantificados de 0 a 6+, de acordo com a escala logarítmica proposta por Ridley & Hilson(4:67).

3.2.2. Coleta de Sangue

Amostras de sangue foram coletadas por punção venosa (10 ml), sem anticoagulante para obtenção de soro, o qual foi distribuído em alíquotas e estocado a -20°C até o momento do uso.

As amostras de sangue dos pacientes foram coletadas em cinco momentos: no momento do diagnóstico (momento 0) e após 2, 4, 6 e 12 meses de tratamento (momentos 2, 4, 6 e 12, respectivamente). As amostras sanguíneas do grupo controle foram coletadas em um único momento. O soro foi empregado na determinação dos níveis de anticorpos anti PGL-I, neopterin e CRP.

3.2.3. Pesquisa de anticorpos anti-PGL-I

Para detecção de anticorpos IgM anti-PGL-I do *M. leprae* em soro de pacientes e do grupo controle, foi utilizado o método imunoenzimático ELISA, desenvolvido de acordo com a metodologia descrita por Bretti et al.(68), empregando-se *kit* padronizado pelo Royal Tropical Institute de Amsterdã. A técnica baseia-se no uso de placas de poliestireno que apresentam 96 orifícios revestidos pelo antígeno semi-sintético NTP-BSA (trissacarídeo natural ligado ao radical fenil e acoplado a soro albumina bovina).

As placas foram revestidas com o antígeno semi-sintético e com BSA (soro albumina bovina) na proporção de 1:1, isto é, 48 orifícios foram recobertos com o antígeno, e 48 orifícios, somente com BSA. O antígeno foi diluído em tampão acetato carbonato de amônia, pH 8,2, na concentração

de 0,01 mg/ml, e o BSA, na concentração de 0,1 g/ml. Cada orifício da placa recebeu 50 µl do antígeno ou do BSA. As placas foram incubadas por 18 horas a temperatura ambiente e, em seguida, foram estocadas a 4°C até o momento do uso.

Para a realização do teste, as placas foram lavadas quatro vezes com solução salina tamponada (SST), pH 7,2, contendo 0,1% de Tween 20 (SST-T) e, a seguir, foram bloqueadas por 60 min com 100 µl de BSA a 1% em tampão fosfato, na temperatura de 37°C.

Os soros a serem testados foram diluídos 1:500 em SST-T contendo 10% de soro normal de cabra e, a seguir, foram adicionados, em duplicata, aos orifícios das placas. Como controle foram empregados soros positivo e negativo. Após incubação da placa por 60 min a 37°C e quatro lavagens com SST-T, adicionaram-se 50 µl de soro de cabra anti-IgM humana conjugado a peroxidase (Cappel/Organon Teknika, Turnhout, Belgium), diluído 1:10.000 em SST-T contendo 10% de soro normal de cabra.

As placas foram agitadas suavemente e incubadas por 60 min a 37°C e, a seguir, foram realizadas quatro lavagens com SST-T. Posteriormente, foram adicionados 50 µl/orifício do substrato crom6geno (2,2 mM de ortofenilenodiamina e 3,5 mM de peróxido de hidrogênio em 33 mM de tampão citrato-fosfato pH 5,0). A reação processou-se no escuro, por 15 minutos, a temperatura ambiente e foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 2,5 N

A atividade enzimática foi avaliada por leitura espectrofotométrica em 490 nm. Os resultados foram expressos em densidade óptica (D.O.), subtraindo-se os valores médios das D.O. obtidas nos orifícios com BSA dos orifícios com NTP-BSA. Foram considerados positivos os soros com D.O. 0,200 (cut-off)(69).

3.2.4. Quantificação de Neopterin

Os níveis séricos de neopterin foram avaliados mediante o ensaio imunoenzimático por competição (Neopterin ELISA, IBL, Hamburg, Germany). Resumidamente, o teste foi iniciado colocando-se nos orifícios da placa, previamente sensibilizada com anticorpo policlonal de cabra anti-IgG de coelho, 10 μ l dos soros-padrão de neopterin, 10 μ l dos soros controles, cujos valores médios eram: 3,5-5,9 nmo¹/1 e 17-28 nmo¹/1, e 10 μ l das amostras de soro a serem testadas, em duplicata.

A seguir, foram acrescentados 100 μ l de neopterin marcada com peroxidase na diluição 1:201 e 50 μ l de anticorpo de coelho anti-neopterin. Imediatamente a placa foi incubada por 90 min em campo escuro, temperatura ambiente. Durante esse período, a neopterin das amostras compete com a neopterin conjugada à enzima para se unir aos sítios de ligação do anticorpo anti-neopterin; este complexo imune se ligará ao anticorpo que reveste a placa. Essa etapa foi seguida por lavagem intensa para assegurar a remoção de todos os componentes não ligados.

Após a adição de 200 μ l do substrato tetrametil-benzidina (TMB), por 10 min, à temperatura ambiente, a reação foi bloqueada adicionando-se 100 μ l de NaOH 2 N. A leitura foi realizada em microleitor automático de FUSA, empregando o comprimento de onda de 450 nm.

Por ser um método competitivo, o valor da D.O. será inversamente proporcional à concentração de neopterin das amostras. Portanto, quanto mais alta for a concentração de neopterin na amostra, mais baixo será o valor da D.O. Os resultados foram expressos em nmo¹/1 a partir de curva padrão estabelecida em cada ensaio. Foram considerados normais os valores <10 nmo¹/1(70)

3.2.5. Quantificação de CRP

Para pesquisa da CRP, utilizou-se *Kit* comercial da marca Omega Diagnostics (Scotland, UK), por aglutinação passiva com partículas de látex.

O teste foi realizado em placas de fundo escuro delimitadas por 6 campos; em cada campo foram colocados 25 μ l de soro e adicionados 25 de partículas de látex sensibilizadas com anticorpos anti-CRP. Em seguida, a mistura foi homogeneizada e as placas permaneceram sob agitação suave, durante dois minutos. Posteriormente, procedeu-se à leitura observando-se a presença ou não de aglutinação manifestada visualmente pela formação de grumos.

Os soros com resultados positivos, no exame qualitativo, foram diluídos em solução de NaCl a 0,9%, na razão 2, a partir de 1:2. Os resultados foram expressos em mg/l, considerando-se positivo 6mg/l.

3.2.6. Análise Estatística

Para verificar se houve diferença significativa nos níveis de anticorpos anti-PGL-I, neopterin e CRP entre pacientes com hanseníase MB e PB, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney (comparação de duas amostras independentes). Para os pacientes classificados nas diferentes formas clínicas (HV, HD e HT) e nos estados reacionais (reação tipo 1, tipo 2 e sem reação), foi empregado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (comparação de mais de duas amostras independentes) e o teste de comparações múltiplas de Dunn.

Para verificar diferenças no decorrer do tratamento (momento do diagnóstico e após 2, 4, 6 e 12 meses), foram utilizados o teste de Friedman e o teste de comparações múltiplas de Dunn.

A correlação entre o IB e os achados sorológicos (anticorpos anti- PGL-I, neopterina e CRP) foi estabelecida calculando-se os coeficientes de correlação não paramétrica por postos (Spearmnan) entre pares de variáveis.

Em todas as situações estudadas, os dados estatísticos calculados foram considerados significativos quando $p < 0,05$ (p = probabilidade de erroneamente concluir pela significância)⁽⁷¹⁾