

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

JOÃO MARCELO AZEVEDO DE PAULA ANTUNES

PESQUISA DE *Mycobacterium leprae* EM TATUS
SELVAGENS DA ESPÉCIE *Dasypus novemcinctus* NO
ESTADO DO ESPÍRITO SANTO

VITÓRIA
2007

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

A636p Antunes, João Marcelo Azevedo de Paula, 1979-
Pesquisa de *Mycobacterium leprae* em tatus selvagens da
espécie *Dasypus novemcinctus* no Estado do Espírito Santo / João
Marcelo Azevedo de Paula Antunes. – 2007.
105 f. : il.

Orientadora: Patrícia Duarte Deps.
Co-Orientador: Marcos Santos Zanini.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Espírito
Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Tatu. 2. Dasypus. 3. Mycobacterium leprae. 4. Hanseníase -
Espírito Santo (Estado). I. Deps, Patrícia Duarte. II. Zanini, Marcos
Santos, 1956- . III. Universidade Federal do Espírito Santo.
Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

JOÃO MARCELO AZEVEDO DE PAULA ANTUNES

**PESQUISA DE *Mycobacterium leprae* EM TATUS
SELVAGENS DA ESPÉCIE *Dasypus novemcinctus* NO
ESTADO DO ESPÍRITO SANTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Ciências, na área de concentração em Patologia Geral das Doenças Infecciosas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Patrícia Duarte Deps

VITÓRIA
2007



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

O mestrando JOÃO MARCELO AZEVEDO DE PAULA ANTUNES, apresentou dissertação intitulada: "PESQUISA DE *Mycobacterium leprae* EM TATUS SELVAGENS DA ESPÉCIE *Dasypus novemcinctus* DO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO" em sessão pública, como requisito final para obtenção do título de **Mestre em Ciências – Patologia Geral das Doenças Infecciosas**, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

Considerando a apresentação oral dos resultados, a qualidade e relevância dos mesmos, a Comissão Examinadora da Dissertação decidiu, aprovar sem restrições, a dissertação e habilitar o médico veterinário JOÃO MARCELO AZEVEDO DE PAULA ANTUNES, a obter o Grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS – PATOLOGIA GERAL DAS DOENÇAS INFECCIOSAS**.

Vitória-ES, 05 de novembro de 2007

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Marcos da Cunha Lopes Virmond".

Prof. Dr. Marcos da Cunha Lopes Virmond

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Paulo César Amaral Ribeiro da Silva".

Prof. Dr. Paulo César Amaral Ribeiro da Silva

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Patrícia Duarte Daps".

Profa. Dra. Patrícia Duarte Daps
(Orientadora)

A Jorge, Tania, João Claudio, Georgiana e Larissa, que sempre
estiveram ao meu lado em todos os momentos e são as razões
da minha vida

"A imaginação é mais importante que o conhecimento.
O conhecimento é limitado. A imaginação envolve o
mundo."
Albert Einstein (1879-1955).

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as maravilhas que tem me permitido. Obrigado por colocar no meu caminho pessoas tão especiais como estas.

A minha orientadora Patrícia Duarte Deps, que tornou um dos meus sonhos em realidade. O meu muito obrigado por toda a confiança em mim depositada. A sua alegria e o seu conhecimento foram fontes diárias para o meu amadurecimento pessoal e profissional.

Ao meu Co-orientador Marcos Santos Zanini, que desde do início da minha vida académica sempre acreditou em mim.

Ao Professor Richard W. Truman, pesquisador do National Hansens's Diseases, pela imprescindível contribuição e participação na realização deste trabalho.

A Professora Diana L. Williams, pesquisadora do National Hansens's Diseases, pela amizade e imprescindível contribuição na realização deste trabalho

A Tana L. Pittman, pesquisadora do National Hansens's Diseases, pelos ensinamentos e amizade.

A Doutoranda da FIOCRUZ Alejandra Martinez pela amizade e por tudo que aprendi com esta pessoa maravilhosa.

Aos especialistas em captura de animais selvagens, André Ribeiro da Silva e Onézio Azolin da Silva pela amizade e ajuda na captura dos tatus.

Ao Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira, meu respeito e profunda admiração pela incessante vontade de saber.

A Dr^a. Angélica B. Miranda Espinosa, coordenadora do Núcleo de Doenças Infecciosas, todo o meu respeito pela sua dedicação e amizade.

A todos meus amigos e familiares. Obrigado pela amizade e pela presença em todos os momentos da minha vida.

A todos os demais amigos do NDI, que com suas diferentes características pessoais, tornam a rotina de trabalho mais alegre e amena.

A Fátima Aparecida Pereira, secretária da pós-graduação, pela amizade e pelo auxílio nas questões burocráticas.

Aos meus pais Jorge e Tania, agradeço por tudo que hoje sou... se sei o que é ser uma pessoa de bom caráter é porque vocês me ensinaram, não somente com palavras, mas com atos e com exemplo. Obrigado por todas as oportunidades que vocês me deram, imprescindíveis para que eu pudesse buscar os meus ideais. Amo vocês!

As meus irmãos João Claudio e Georgiana, que mesmo de longe estavam tão perto. Vocês são um grande exemplo de persistência e de sempre acreditar nos nossos sonhos. Amo vocês.

A minha namorada, obrigada pela presença e desculpa pela ausência neste período, que às vezes parecia sem fim. O seu carinho, atenção e incentivo foram fundamentais para que eu pudesse chegar até aqui.

RESUMO

Introdução: *Mycobacterium leprae* foi a primeira bactéria a ser indicada como agente etiológico de uma doença infecciosa. A hanseníase permanece até os dias de hoje uma doença enigmática e que não é completamente entendida. A identificação do *M. leprae* é difícil, particularmente por sua inabilidade de cultivo *in vitro*. Pacientes multibacilares são as principais fontes do bacilo. A transmissão natural da hanseníase entre tatus foi descrita pela primeira vez em 1975, no sudeste dos EUA. Esta descoberta sugeriu a possibilidade do tatu-galinha desenvolver uma função na transmissão da hanseníase em humanos. A procura dos reservatórios da hanseníase é a principal estratégia para eliminação da doença, tal como os pacientes multibacilares e as fontes ambientais. Então, realizou-se um estudo de prevalência em 69 tatus selvagens da espécie *Dasypus novemcinctus*, capturados no estado do Espírito Santo, no período de julho de 2004 a julho de 2005.

Objetivos: Procurou-se avaliar a presença do *M. leprae* nos tatus da espécie *D. novemcinctus* no estado do Espírito Santo, através de achados de sinais clínicos de infecção na necropsia e na técnica de PCR, utilizando dois pares de *primers*: 18 kDa e ML1/ML2, bem como avaliar e comparar os dois pares de *primers* utilizados para a detecção da infecção.

Métodos: Após anestesiados, os tatus foram pesados, definidos os sexos, submetidos ao exame clínico e coleta de fragmento de tecidos para a técnica de PCR. Sessenta e cinco tatus foram necropsiados e fragmentos de fígado, baço, cérebro e linfonodos foram analisados pela técnica de PCR.

Resultados e Conclusões: Em 95% dos animais estudados foi evidenciado pelo menos um sinal clínico da hanseníase. Através da técnica de PCR foi detectada 6% (4 animais) de positividade na pesquisa de DNA de *M. leprae*, utilizando os *primers* ML1/ML2. Dos 4 animais positivos no PCR convencional, somente dois permaneceram positivos pela técnica de Real Time PCR e confirmados pelo seqüenciamento. O método diagnóstico mais sensível para detecção de *M. leprae* foi o PCR, utilizando os pares de *primers* ML1/ML2. Estes resultados sugerem a infecção adquirida naturalmente nos tatus da espécie *D. novemcinctus* no estado do Espírito Santo, Brasil.

Palavras-chaves: Tatus; *Dasypus novemcinctus*; *Mycobacterium leprae*; Hanseníase, Espírito Santo; Brasil.

ABSTRACT

Introduction: *Mycobacterium leprae*, was the first agent to be linked to an infectious disease, and leprosy still today an enigmatic disease which is not fully understood. Multibacillary patients are thought to be the main source of *M. leprae*. Identification of *M. leprae* is difficult, partly due to the inability of the bacillus to grow *in vitro*. The natural transmission among nine-banded armadillos in the southern parts of the United States has been described since 1975. This discovery suggested the possibility that the nine-banded armadillo plays a role in the transmission of human leprosy. The search of *M. leprae* sources is the main point of strategy for leprosy elimination, such as multibacillary patients and environmental sources. It was realized a prevalence study in 69 nine-banded armadillos, *Dasypus novemcinctus*, from state of Espírito Santo, Brazil, during 2004 to 2005. **Objectives:** Assess the *M. leprae* infection in armadillos from *D. novemcinctus* from state of Espírito Santo through the clinical signs of leprosy found in the necropsy and PCR technique using two set of primers, ML1/ML2 and 18 kDa, such as compare the set of primers. **Methods:** After anesthesia, the armadillos were weighed, sex was determined, clinical exam was made and samples were collected for PCR. Tissue samples (liver, spleen, brain and lymph nodes) from 65 nine-banded armadillos were collected to looking for natural infection of *M. leprae* by PCR technique. **Results and Conclusion:** 95% of the armadillos had at least one clinical sign for leprosy in wild armadillos. Four (6%) animals were positive in conventional PCR. Two animals that were positive in conventional PCR remained positive in Real Time PCR, and confirmed by sequencing. The best method to detect *M. leprae* was the PCR using the ML1/ML2 set of primers. These results suggest the infection acquired naturally in *D. novemcinctus* from state of Espírito Santo, Brazil.

Key words: Nine-banded armadillos, *Dasypus novemcinctus*, *Mycobacterium leprae*, leprosy, Espírito Santo, Brazil.

SUMÁRIO

1	Introdução	18
1.1	Objetivos.....	20
2	Revisão de Literatura.....	21
2.1	Considerações Gerais.....	21
2.2	Aspectos epidemiológicos.....	22
2.3	A hanseníase no Brasil e no estado do Espírito Santo.....	23
2.4	Características do <i>M. leprae</i>	23
2.4.1	Parede Celular Micobacteriana.....	24
2.4.2	PGL-1.....	25
2.4.3	O genoma do <i>M. leprae</i>	26
2.4.4	Métodos para o diagnóstico da infecção pelo <i>M. leprae</i>	27
2.4.5	ELISA.....	28
2.4.6	A técnica da PCR.....	30
2.4.7	PCR utilizado para detecção do DNA de <i>M. leprae</i>	30
2.4.8	Amostras clínicas para a realização da PCR.....	32
3	Transmissão da hanseníase.....	34
4	Reservatórios de <i>M. leprae</i>	35
4.1	Solo e Água.....	35
4.2	Artrópodes.....	36
4.3	Anfíbios.....	37
4.4	Mamíferos.....	37
5	Aspectos biológicos dos tatus.....	37
6	Hanseníase em tatus.....	39
6.1	Distribuição geográfica dos tatus.....	39
6.2	Infecção pelo <i>M. leprae</i> em tatus.....	39
6.3	A origem da infecção natural em tatus.....	42

6.4	Detecção de <i>M. leprae</i> em tatus.....	43
6.5	Distribuição geográfica da hanseníase em tatus nos EUA.....	46
6.6	Associação da hanseníase de tatus com humanos.....	47
7	Métodos.....	49
7.1	Planejamento do estudo.....	49
7.2	Amostra de tatus estudada.....	49
7.3	Exame clínico e documentação dos animais.....	49
7.4	Coleta de materiais.....	50
7.5	Técnica da PCR.....	51
7.6	Processamento das amostras utilizando a técnica de PCR.....	51
	Extração do DNA.....	51
	Condições da PCR.....	52
	Composição da reação de mistura.....	52
	Ciclos.....	52
	Detecção dos produtos da amplificação.....	53
	Controles positivos e negativos da amplificação.....	53
	Confirmação dos resultados positivos através da técnica de Real Time PCR e sequenciamento.....	54
7.7	Cronograma de estudos.....	55
7.8	Cálculo do tamanho da amostra.....	56
7.9	Codificação e armazenamento dos dados.....	56
7.9.1	Considerações éticas.....	56
8	Resultados.....	57
8.1	Informações gerais.....	57
8.2	Procedência dos tatus.....	57

8.3	Sexo.....	57
8.4	Peso.....	58
8.5	Achados clínicos.....	58
8.6	PCR.....	58
8.7	Real Time PCR.....	60
8.8	Seqüenciamento do DNA.....	60
9	Discussão.....	63
9.1	Procedência dos tatus e aspectos geográficos dos locais de captura.....	63
9.2	Aspectos clínicos da hanseníase em tatus e sua relação com achados laboratoriais.....	63
9.3	Técnica da PCR.....	65
9.4	Aspectos epidemiológicos.....	70
10	Conclusões.....	74
11	Considerações Finais.....	75
12	Referências.....	76
13	Anexos.....	98

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Genoma Circular do <i>M. leprae</i>	27
Figura 2.	Os estágios da hanseníase no tatu infectado experimentalmente e suas transições.....	46
Figura 3.	Imagem da amplificação específica do DNA do <i>M. leprae</i> , fragmento com 372 pares de base visibilizados através do gel de agarose dos tatus F64 (linha 2), F68 (linha 3), M74 (linha 5) e M90 (linha 7).....	60

LISTA DE FOTOGRAFIAS

Fotografia 1.	Tatu preparado para a necropsia.....	100
Fotografia 2.	Linfonodos mesentéricos aumentados do animal M74.....	100
Fotografia 3.	Baço do tatu F77 com bordos irregulares.....	101
Fotografia 4	Tatu F71 com lesões na parte ventral.....	101
Fotografia 5	Baço do tatu M66 com presença de pontos branco.....	102
Fotografia 6	Hepatomegalia no tatu M72.....	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	<i>Primers</i> utilizados para amplificação de seqüências específicas do <i>M. leprae</i>	51
Tabela 2.	<i>Primers</i> e <i>probes</i> usados para amplificação de seqüências específicas do <i>M. leprae</i> utilizados na técnica de Real Time PCR.....	55
Tabela 3.	Procedência dos 69 tatus capturados no Espírito Santo.....	57
Tabela 4.	Resultados gerais dos sinais clínicos e da biologia molecular dos tatus necropsiados.....	103
Tabela 5.	Relação dos animais positivos para a PCR e sinais clínicos.....	59
Tabela 6.	Resultados positivos em um ou mais dos testes realizados nos tatus, incluindo PCR e Real Time PCR.....	61

LISTA DE SIGLAS

Ac: anticorpos

Ag: antígenos

pb: pares de bases

BSA: Albumina Sérica Bovina

BAAR: Bacilo Álcool Ácido Resistente

BCG : Bacilo de Calmete Guerin

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

DT: Hanseníase Dimorfo-tuberculóide

DV: Hanseníase Dimorfo-Virchowiana

ELISA: enzyme linked immuno sorbent assay

EUA: Estados Unidos da América

CG: Citosina-Guanina

LHE: Laboratório de Hanseníase Experimental, Centro de Ciências da Saúde da UFES, Vitória-ES

LPV: Laboratório de Patologia Veterinária, Centro de Ciências Agrárias da UFES, Alegre-ES

µL: Microlitros

µM: Micromolar

M. leprae: *Mycobacterium leprae*

M. tuberculosis: *Mycobacterium tuberculosis*

ND: Natural dissacarídeo

ND-O-BSA: Natural dissacarídeo com radical octila ligado a albumina sérica bovina

NT: Natural trissacarídeo

NT-P-BSA: Natural trissacarídeo com radical fenólico ligado a albumina sérica bovina

NHDP: National Hansen's Diseases Program Laboratory, Baton Rouge, Louisiana, USA

Ig: imunoglobulina

IgM: imunoglobulina M

kDa: Kilo-Daltons

MB: Multibacilar

OMS: Organização Mundial de Saúde

PB: Paucibacilar

PGLs: Glicolipídio Fenólico

PCR: Polymerase Chain Reaction

PQT: Poliquimioterapia

PGL-1: Glicolipídio Fenólico 1

RMGV: Região Metropolitana da Grande Vitória

SNPs: Single Nucleotide polymorphisms

TT: Hanseníase Tuberculóide

VV: Hanseníase Virchowiana

WHO: World Health Organization

1 INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica, considerada problema de saúde pública em quinze países, sendo estes países responsáveis por 94% dos casos novos registrados no ano de 2006. Apesar de todo o empenho dos países endêmicos para alcançar sua eliminação e mesmo o declínio de novos casos em todo mundo, a hanseníase ainda é endêmica em vários estados brasileiros, (WHO, 2007), inclusive no estado do Espírito Santo. (RELATÓRIO DA SESA/ES, 2007).

As formas de transmissão da hanseníase constituem um tema ainda bastante discutido, podendo ocorrer de formas diferentes em diferentes regiões. Entretanto, é consenso que os pacientes bacilíferos sem tratamento sejam as fontes mais importantes de bacilos e sua transmissão parece ocorrer através de contato íntimo e prolongado do hanseniano com um indivíduo susceptível (Noordeen, 1994).

Os tatus da espécie *Dasypus novemcinctus* vêm sendo investigados como sendo fontes de bacilos e possíveis transmissores da hanseníase em algumas regiões do Continente Americano. Após vários estudos, alguns autores já consideram que animais provenientes da região sudeste dos EUA, sejam fontes de *Mycobacterium leprae* e teriam importância na manutenção da endemia nessas regiões (Lechat, 2000; Truman, 2005).

As 20 espécies de tatus existentes são animais exclusivos da fauna neotropical (parte da América Central e América do Sul), exceto o tatu da espécie *D. novemcinctus*, introduzido na América do Norte entre os séculos 19 e 20. Hoje a distribuição geográfica desta espécie vai do estreito de Magalhães (sul da Patagônia) até o centro-sul dos EUA (Pereira Júnior et al., 2004). Entretanto, os tatus não estão presentes em todos os países onde a hanseníase é endêmica (Truman, 2005).

Atualmente, várias técnicas são utilizadas para diagnosticar hanseníase em tatus, sendo a técnica da PCR o teste de maior sensibilidade para detectar a presença de *M. leprae*, seguido de necrópsia, detecção de anticorpos anti-PGL-1 através de

sorologia, biópsia de nódulo inguinal e da orelha que detectam a presença da infecção (Job et al., 1991),

Um estudo sorológico mostrou que 16% dos tatus da espécie *D. novemcinctus* dos estados da Louisiana e do Texas nos EUA, mostravam sinais de infecção (Truman et al., 1991).

No Brasil, tatus selvagens da espécie *D. novemcinctus* provenientes do estado do Espírito Santo foram estudados por Dets et al. (2003a), onde 52,7% dos tatus foram positivos para a técnica da PCR para a presença do *M. leprae*. Todavia os resultados, através da técnica da PCR não foram confirmados. Entretanto, neste estudo pretende-se investigar a presença do *M. leprae* em outros tatus selvagens do estado do Espírito Santo, utilizando a técnica da PCR com dois pares de *primers*. A técnica de seqüenciamento foi realizada nos casos positivos para a técnica da PCR, onde houve amplificação de DNAs para confirmação dos resultados.

1.1 Objetivos

Objetivo principal

- 1- Avaliar a presença do *M. leprae* nos tatus da espécie *D. novemcinctus* no estado do Espírito Santo através da técnica da PCR utilizando dois pares de *primers*: 18 kDa, que amplifica a região do gene codificante de 18 kDa e os *primers* ML1/ML2, que amplificam a sequência repetitiva RLEP.

Objetivos secundários:

- 1- Comparar a eficiência dos dois pares de *primers* utilizados para a detecção do *M.leprae* em amostras de tatus;
- 2- Correlacionar a positividade pela técnica da PCR com os sinais clínicos da hanseníase em tatus.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Considerações Gerais sobre a hanseníase

A hanseníase é uma doença infecciosa granulomatosa crônica de pele e nervos periféricos, causada pela bactéria intracelular *Mycobacterium leprae*, que leva a danos nos nervos periféricos, resultando em perdas motoras e sensoriais, ocasionando alguns casos de deformidades e incapacidades características em seres humanos (Britton; Lockwood, 2004).

As referências mais remotas de aparição da hanseníase datam de 600 a.C. Na Idade Antiga a doença foi registrada entre os egípcios, chineses e hindus (Lopes, 2005). Em trabalho publicado recentemente, Monot et al. (2005), estudaram a disseminação da hanseníase através da análise de pequenas diferenças nas seqüências do DNA do *M. leprae*, conhecidas como polimorfismos de base única ou *single nucleotide polymorphisms* (SNPs). Amostras de *M. leprae* provenientes de várias partes do mundo foram analisados e enquadrados em quatro diferentes genótipos. Após a análise destes genótipos, os autores concluíram que a hanseníase teria a sua origem na Ásia Central ou Leste da África. A hanseníase no Brasil parece ser proveniente da Europa e de escravos oriundos da África Ocidental.

O período de incubação da hanseníase varia de três meses a quarenta anos (Rees; McDougall, 1977). Estima-se que 70 a 90% da população seja resistente ao *M. leprae* devido à imunidade inata, que poderia estar reforçada pela vacinação com BCG ou por reação cruzada em pessoas que tiveram contato com o *Mycobacterium tuberculosis* ou outras micobactérias atípicas (Talhari; Neves, 1997).

2.2 Aspectos epidemiológicos

A hanseníase era amplamente disseminada pela Europa e Ásia, mas atualmente ocorre principalmente em regiões tropicais e vem sendo associada com a pobreza e baixos padrões de higiene (Britton; Lockwood, 2004; Kerr-Pontes et al., 2005).

A falta de conhecimento do número definido de pessoas infectadas e assintomáticas que podem exercer papel ativo na transmissão da doença, obscurecem ainda mais os determinantes que influenciam na sua distribuição geográfica (Britton; Lockwood, 2004).

Apesar do esquema de tratamento com a PQT ser efetivo resultando em cura e na diminuição do número de casos nos últimos vinte anos, o número de casos novos registrados a cada ano não têm diminuído no mesmo ritmo, e em algumas regiões, permanece o mesmo (Britton; Lockwood, 2004; Lockwood; Suneetha, 2005). Assim, muitos autores acreditam que a hanseníase não irá desaparecer brevemente. (Fine, 2007; Meima et al., 2004).

Há aproximadamente 15 anos, a OMS fixou como meta que, no ano 2000, a hanseníase estaria eliminada do Planeta como problema de saúde pública. Uma vez não alcançada esta meta, a OMS considerou a possibilidade da eliminação para o final de 2005. Tais metas, todavia, não foram alcançadas, fazendo com que a OMS determinasse uma nova estratégia global de eliminação da hanseníase a ser alcançada até o ano de 2010 (WHO, 2007).

Em 2006 houve uma concentração de 23% dos novos casos registrados em apenas 4 países: Brasil, República Democrática do Congo, Moçambique e Nepal. No início de 2007, a OMS divulgou uma prevalência de 224.717 casos e em um aspecto mundial a detecção está em declínio (WHO, 2007).

2.3 A hanseníase no Brasil e no estado do Espírito Santo

A detecção de novos casos de hanseníase no Brasil está aumentando, com muitos casos em mulheres (46%) e em crianças (8%). O Brasil no início de 2007, possuía 60.527 casos registrados, 15.091 casos a mais se compararmos com 2006. O Brasil é o segundo país em número de casos no mundo e praticamente todos os casos diagnosticados nas Américas são notificados pelo Brasil (WHO, 2007).

O Brasil e os outros países deverão manter os esforços para alcançar a meta de eliminação da hanseníase até o ano 2010, utilizando a nova estratégia de eliminação conhecida como *Final Push*, baseada principalmente na detecção e tratamento precoces dos casos novos com conseqüente interrupção da cadeia de transmissão (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

O estado do Espírito Santo, no final de 2006, figura como área endêmica em hanseníase, sendo seu coeficiente de prevalência de 3,69/10.000 habitantes e seu coeficiente de detecção de 3,49/10.000 habitantes, considerado segundo os parâmetros de endemicidade da OMS, como “muito alto” e áreas com focos de “hiperendemicidade” (RELATÓRIO DA SESA/ES, 2006).

Os índices em 2006, no estado do Espírito Santo, nos municípios de Alegre, Marechal Floriano, Serra e Vitória foram os seguintes: coeficiente de prevalência de: 1,22, 1,41, 3,83 e 2,43/10.000 habitantes e coeficientes de detecção de: 1,22, 1,41, 3,7 e 1,99/10.000 habitantes, respectivamente (RELATÓRIO DA SESA/ES).

2.4 Características do *M. leprae*

O *M. leprae* foi descoberto em 1873 por G. H. Armauer Hansen, razão pela qual é denominado também bacilo de Hansen, pertence ao gênero *Mycobacterium* e ordem Actinomicetales. O bacilo é imóvel e é um BAAR, pois uma vez corado pela fucsina não é descorado pela solução álcool-ácido. Essa característica se deve ao fato de sua parede celular conter grande quantidade de lipídios e estes reterem o corante, mesmo sob a ação de solventes orgânicos acidificados (Brennan; Nikaido, 1995).

Pelo método de Ziehl-Neelsen, os bacilos apresentam-se corados uniformemente em vermelho e, quando viáveis, em forma de bastonetes, na maioria retos ou ligeiramente encurvados, isolados ou agrupados em globos (globias). Essas formas permitem diferenciá-los das outras micobactérias que não formam globias. Além disso, podem se corar descontinuadamente (bacilos granulados), interpretados como inviáveis (Rees; Young, 1994).

É um parasita intracelular obrigatório e apresenta afinidade por células cutâneas e dos nervos periféricos. O *M. leprae* cresce a 30-33°C e divide-se a cada 12-13 dias, permanecendo viável até 36 horas no meio ambiente ou aproximadamente nove dias à temperatura de 36,7° C e 77,6% de umidade média (Bryceson, 1992).

Embora o *M. leprae* não cresça em meio de cultura, o bacilo se multiplica 6 a 8 meses após sua inoculação em coxim da pata do camundongo, método de Shepard, (1960). Porém, os resultados dessa prova são muito demorados e a sua multiplicação acaba sendo impedida pelas defesas do animal, que surgem quando o número de bacilos atinge 10^6 . Também pode ser feita inoculação em camundongos timectomizados ou irradiados, sendo este modelo eficiente para investigação de drogas anti-*M. leprae* para a detecção de organismos resistentes às drogas e também para estudos dos Ag de *M. leprae* (Rees, 1966).

Na década de 70 conseguiu-se a multiplicação do *M. leprae* em tatus (*D. novemcinctus*), reproduzindo a doença semelhante às formas contagiantes de hanseníase (Storrs, 1971).

2.4.1 Parede celular micobacteriana

A parede celular micobacteriana é um complexo de ácidos micólicos, peptidoglicanos e arabinogalactanos interligados similares na composição com de todas as micobactérias (Daffe et al., 1993). A parede celular contém peptidoglicanos compostos de cadeias alternadas de *N*-acetilglucosaminas e *N*-glicolilmuramato interligados por pontes cruzadas de peptídeos, que são ligados ao galactano pelo arabinogalactano (Draper et al., 1987; Daffe et al., 1993).

Três cadeias ramificadas de arabinos são ligadas em volta do galactano, formando ao longo da camada de peptidoglicanos uma zona eletro-densa ao redor do *M. leprae*. Ácidos micólicos são ligados às cadeias terminais dos arabinanos para formar um folheto interno de uma bicamada pseudolipídica. O outro folheto é composto por uma rica coleção intercalada de ácidos micólicos monomicolatos de trehalose, ácidos micocerosóicos de dimicocerosatos de phthiocerol e glicolipídeos fenólicos, formando a zona eletro-transparente. Estas moléculas juntas com o fosfatidilinositol e com os fosfolipídeos são liberados da parede celular formando um tipo de cápsula (Draper et al., 1987; Daffe et al., 1993; Vissa; Brennan, 2001).

2.4.2 Antígeno Glicolipídio fenólico 1 (PGL-1)

Existem lipídios localizados na camada mais externa do envelope micobacteriano, entre estes merece destaque o Ag PGL-1. Este é específico do *M. leprae* e constitui um dos glicolipídios mais abundantes da superfície deste bacilo (Brennan; Barrow, 1980).

Estudos recentes sugerem que o PGL-1 está envolvido na interação do *M. leprae* com a laminina das células de Schwann, sugerindo a função do PGL-1 na interação de nervos periféricos e bacilos (Ng et al., 2000). O PGL-1 estimula uma potente resposta imunológica com produção de IgM que é proporcional a carga bacilar (Roche et al., 1991).

2.4.3 O genoma do *M. leprae*

Um grande avanço para o entendimento da biologia de *M. leprae* foi a recente conclusão do seqüenciamento de seu genoma (Cole et al., 2001a). O genoma do *M. leprae* é constituído por 3.268.203 pb e tem um conteúdo G+C de 57,8%, valores menores aos encontrados em *M. tuberculosis*, que possui 4.441.529 pb, conteúdo G+C de 65,6% e aproximadamente 4000 genes que codificam proteínas (**Figura 1**).

O genoma de *M. leprae* contém 1.116 pseudogenes ou genes degenerados (equivalentes a 27% de seu genoma), assim denominados devido à perda de regiões necessárias para a sua transcrição ou tradução. Uma análise funcional dos genes preservados do *M. leprae* revela a integridade da maioria das vias anabólicas. Entretanto, mutações foram encontradas nos genes envolvidos na regulação, na detoxificação, no reparo de DNA e no transporte ou fluxo de metabólitos (Vissa; Brennan, 2001).

O acúmulo dessas mutações provocou perdas em genes que são essenciais para a sobrevivência no ambiente intracelular. Nesse sentido, a degradação genômica ocasiona a perda de função por parte do genoma bacteriano, sendo este processo denominado evolução por redução (Andersson; Andersson, 1999) e observado em alguns patógenos intracelulares. Essa perda pode estar relacionada ao fato desses patógenos viverem num ambiente extremamente estável e rico em metabólitos, o que exigiria pouca versatilidade metabólica para sobrevivência.

Aproximadamente 2% do genoma de *M. leprae* é composto por seqüências repetitivas. Existem mais de 26 elementos de inserção extintos com quatro famílias de repetições dispersas, presentes em cinco ou mais cópias, sendo RLEP (37 cópias), REPLEP (15 cópias), LEPREP (8 cópias) e LEPRPT (5 cópias). Embora não se conheça similaridade entre as seqüências dos elementos de transposição, a repetição RLEP ocorre predominantemente na terminação 3' dos genes e, em alguns casos, dentro de pseudogenes, sugerindo assim que seja capaz de realizar transposição (Cole et al., 2001b).

É provável que a atual disposição do genoma do *M. leprae* reflita múltiplos eventos de recombinação entre seqüências repetitivas conservadas. Em pelo menos um exemplo, a recombinação provavelmente resultou na deleção de um bloco de genes localizados entre seqüências REPLEP, enquanto que em outros ocorreram translocação de regiões cromossômicas. Evidências preliminares sugerem que essas repetições dispersas são capazes de realizar transposição, pois em alguns casos foram encontradas dentro de seqüências correspondentes a genes conhecidos em *M. tuberculosis*. A perda maciça de genes no *M. leprae* poderia explicar o seu longo tempo de geração e sua incapacidade de se multiplicar *in vitro*.

Mecanismos de recombinação de grandes fragmentos também foram sugeridos entre precursores de *M. tuberculosis*. Estes mecanismos provavelmente perdidos durante o processo de evolução, deram origem a atual composição genética do patógeno (Gutteriez et al., 2005).

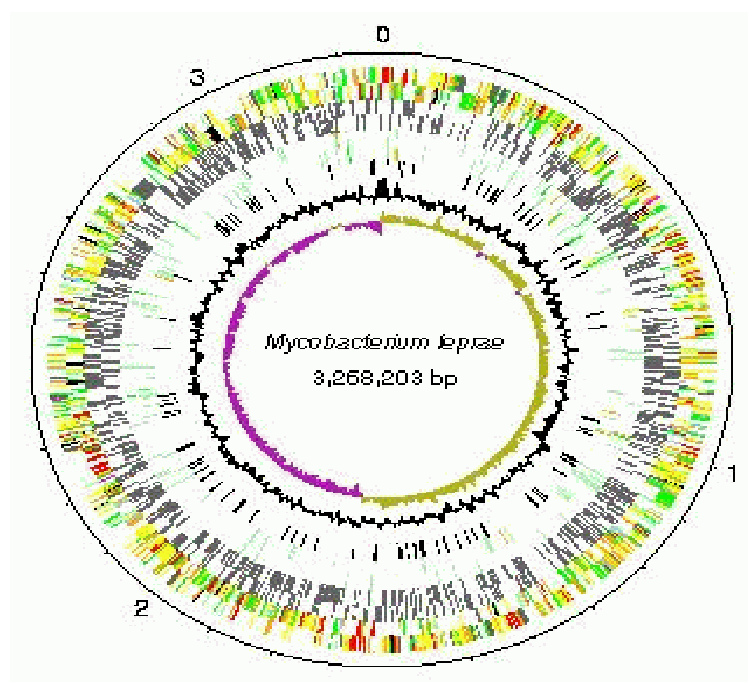


Figura 1 – Genoma circular de *M. leprae* mostrando a posição e a orientação dos prováveis genes funcionais, pseudogenes e seqüências repetitivas. Ver http://www.sanger.ac.uk/Projects/M_leprae ou <http://genolist.pasteur.fr/Leproma/> para informações adicionais.

Fonte: Cole et al., 2001a.

Apesar de existirem regiões conservadas entre os genomas de *M. tuberculosis* e *M. leprae*, aproximadamente 150 genes no *M. leprae* não são compartilhados com *M. tuberculosis*. Alguns desses genes poderiam estar envolvidos na patogenicidade espécie-específica do bacilo de Hansen (Gutteriez et al., 2005).

2.4.4 Métodos para o diagnóstico da infecção pelo *M. leprae*

O diagnóstico da hanseníase é baseado nos sinais e sintomas clínicos. Nos países endêmicos o diagnóstico é frequentemente feito pela presença de lesões cutâneas

anestésicas, espessamento dos nervos, e o encontro de BAAR na linfa. Não há até o momento, exame laboratorial capaz de diagnosticar e classificar a forma da hanseníase (Britton; Lockwood, 2004).

No diagnóstico e classificação da hanseníase os recursos utilizados são: exame dermatoneurológico, prova da histamina, prova da pilocarpina, baciloscopia e histopatologia. O padrão ouro para o diagnóstico das formas anatomoclínicas da hanseníase é a biópsia obtida da margem de lesão ativa e examinada por um experiente patologista, que irá reconhecer os padrões histológicos, o envolvimento de nervos e nas formas multibacilares (MB), a identificação do BAAR (Clements; Scollard, 1996). O limite de detecção na microscopia é de 10^4 bacilos/ml (Shepard; McRae, 1968). Entretanto para finalidades de pesquisa laboratoriais as técnicas de ELISA e PCR são bastante utilizadas (Williams et al., 1990).

Métodos sorológicos (ELISA e ML FLOW[®]) e de Biologia Molecular serão discutidos à seguir.

2.4.5 ELISA

A técnica de ELISA detecta Ac anti o PGL-1 do *M. leprae* (Bührer et al., 1998; Douglas et al., 1987). O diagnóstico sorológico é deficiente nos pacientes PB que possuem moderada ou grande resposta imune celular, poucos bacilos e com poucos Ac circulantes detectáveis (Scollard et al., 2006). Utilizando o ELISA, Ac específicos anti PGL-1 do *M. leprae* estão presentes em 70-90% dos pacientes das formas MB não tratadas, 40 a 50% dos pacientes PB e 1 a 5% dos indivíduos controles sadios (Cho et al., 2001; Roche et al., 1990).

O PGL-1 existente na parede celular do *M. leprae* e o Ac IgM anti-PGL-1 têm sido motivo de vários estudos. O ELISA é um método em que se detecta os Ac anti-PGL-1 (Buchanan et al., 1983; Douglas et al., 1987).

A molécula do PGL-1 é composta de um único trissacarídeo, o 3,6-di-O-metil- β -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3-di-O-metil- α -L-ranopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-3-O-metil- α -L-

ranopiranosil (Hunter; Brennan, 1981).

A resposta imune predominantemente, é a produção de IgM (Young et al., 1984), que é quase inteiramente direcionado contra o açúcar terminal, ou seja, a última parte do dissacarídeo, considerado o principal determinante antigênico do PGL-1 (Brett et al., 1986; Fujiwara et al., 1987).

Foi mostrado que a remoção do açúcar terminal resultava na perda da ligação da maioria dos Ac, enquanto a remoção da cadeia longa de ácidos graxos da molécula do PGL-1 não produzia efeito na ligação dos Ac. Estes resultados sugerem que a síntese química da última parte do dissacarídeo produz um epítipo que estimula a produção de Ac monoclonais, utilizados para se detectar a presença do PGL-1 (Young et al., 1984).

Este achado foi a base para a produção dos Ag sintéticos utilizados no lugar do PGL-1 (nativo), que é escasso e de difícil aquisição (Eggelte et al., 1988).

Assim, Ag semi-sintéticos são produzidos através da síntese de açúcares (natural di- ou tri-sacarídeos, ND ou NT, respectivamente) após a identificação do açúcar terminal como o Ag primário determinante do PGL-1 e ligá-los à BSA com um anel octila (O) ou um fenólico (P) (Fujiwara et al., 1984). O Ag ND-O-BSA é considerado ser pelo menos igual ou melhor do que os outros derivados do antígeno PGL-1 (Fujiwara et al., 1984; Wu et al., 1988; Chanteau et al., 1988).

Estudos prévios sugerem que a presença de Ac IgM anti-PGL-1 pode ser indicativo de infecção passada ou presente (Klatser, 1994). A hanseníase é uma doença infecciosa que apresenta um amplo espectro clínico e imunológico. As formas MB geralmente apresentam uma deterioração da imunidade celular, muitos bacilos, alta carga antigênica e altos níveis séricos de Ac. Já as formas PB geralmente apresentam os parâmetros de imunidade celular preservados, escassos bacilos e pouca ou nenhuma elevação dos níveis de Ac. Sendo assim, as técnicas sorológicas para detecção de Ac anti *M. leprae* direcionadas principalmente para o diagnóstico das formas MB da hanseníase (Britton; Lockwood, 2004).

Em estudo populacional nas Filipinas realizado em 1992, onde a prevalência da hanseníase era alta, Cho et al. (1992), verificaram que a presença de Ac anti-PGL-1 nos contatos (13,9%) é estatisticamente igual a dos controles (11,3%) indicando que a população geral está igualmente exposta ao *M. leprae*. O ELISA tem forte correlação com o índice bacilar dos pacientes MB (Cellona et al., 1993).

Recentemente foi desenvolvido um teste de fluxo imunocromatográfico, ML Flow test®, que também detecta Ac IgM anti PGL-1. A sensibilidade do ML Flow® é de 97,4% em pacientes MB e sua especificidade é de 90,2% e tem boa correlação com o ELISA (91%; $\kappa=0,77$) (Bührer-Sékula et al., 2003;). O ML Flow test®, é um teste sorológico, utilizado como uma ferramenta adicional para classificação de novos pacientes (Bührer-Sékula et al., 2007).

2.4.6 A técnica da PCR

A DNA polimerase DNA dependente é uma enzima que tem como função a síntese do DNA na célula, e ela multiplica as seqüências de ácidos nucleicos *in vitro*, e dá início a sua replicação. Com a adição dos “*primers*” (iniciadores), ocorre a ligação das cadeias complementares. Milhões de cópias da região de interesse serão geradas num ciclo de três passos à diferentes temperaturas. O produto da amplificação pode ser visibilizado por eletroforese em gel de agarose, em forma de bandas. A reação da PCR tem demonstrado ser muito sensível quando utilizados *primers* adequados (Saiki et al., 1985; Kogan et al., 1987; Shibata et al., 1988).

2.4.7 PCR utilizado para detecção do DNA de *M.leprae*

O exame mais utilizado na detecção do *M. leprae* na pesquisa da hanseníase é o método de extração, amplificação e identificação do DNA do *M. leprae* em espécimes clínicas, utilizando o PCR e outras técnicas de biologia molecular (Gillis; Williams et al., 1991; Scollard et al., 1996; Katoch, 1999). As técnicas baseadas no PCR tem mostrado uma especificidade de 100% e uma sensibilidade de 34 a 80% em pacientes PB e mais de 90% em MB (Scollard et al., 2006).

Em 1989, foi identificado um fragmento de cromossomo do DNA do *M. leprae*, isolado de um DNA recombinante, procedente de um banco de DNA. Este continha uma sequência repetitiva e específica do *M. leprae* tornando possível sua detecção num equivalente a 4×10^3 células de uma lesão através de hibridização (Clark-Curtiss; Docherty, 1989). Woods e Cole (1990), relataram que esta sequência repetitiva descoberta um ano antes, denominada RLEP, continha pelo menos 28 cópias e 12 diferentes classes, sugerindo a não existência de duas cópias idênticas. Cole et al. (2001b), fez mais contribuições nos estudos das sequências repetitivas, confirmando que a sequência RLEP continha 37 cópias no genoma. As sequências repetitivas do *M. leprae*, RLEP são adjacentes, mas não fazem parte da sequência do gene que codifica o antígeno 65 kDa (Grosskinsky et al, 1989).

Sequências repetitivas são constituintes comuns de todos os organismos, mas mais proeminentes em eucariotos. Existem duas formas principais de DNA repetitivo no genoma bacteriano: dispersas e repetições em *tandem* (*tandem repeats*). As repetições em tandem ou DNAs satélites são sequências geralmente de 2 a 10pb, que repetem numerosas vezes e têm posições definidas em cada cromossomo. Já as sequências dispersas ou elementos transportáveis (*transposons*) podem mudar de lugar no genoma. As sequências repetitivas dispersas RLEP, repetem até 37 vezes no genoma do *M. leprae* e possuem um segmento conservado de 488 pb encontrado em todas as cópias de RLEP e flanqueadas por sequências adicionais, que estão presentes em somente duas RLEP independentes. Conseqüentemente, a sequência pode variar de 601 até 1075 pb. O cromossomo do *M. leprae* é composto por até 1% de RLEP, que trabalham remodelando o genoma como *stop codons*, flanqueando genes, assemelhando-se a transposons e na maioria das vezes como pseudogenes (Cole et al., 2001b).

Os *primers* que amplificam sequências repetitivas específicas do *M. leprae*, são capazes de detectar pequenas quantidades de *M. leprae*, equivalente a um décimo do genoma bacteriano (100 ag ou 10^{-16} microorganismos) (Donoghue et al., 2001).

Williams et al. (1990), relataram o uso de PCR para replicar *M. leprae*, baseado nas sequências de DNA presentes no gene que codifica a proteína de 18 kDa com

amplificação de um fragmento com 360 pb. Outros fragmentos amplificados podem identificar o *M.leprae*, como o de 372 pb, 386 pb ou 347 pb que são seqüências do gene groE-L codificado do Ag imuno-dominante da proteína de 65 kDa (Hackel et al., 1990; Plikaytis et al., 1990). Também o fragmento do gene codificado do Ag de 36 kDa, do Ag rico em prolina de 494 bp, 530 pb ou de 285 pb (Hartskeerl et al., 1989; De Wit et al., 1991; Kampirapap et al., 1998).

Os resultados dos estudos realizados por Kang et al. (2003), mostraram que PCR para a seqüência repetitiva RLEP é mais sensível quando comparada a PCR para o gene 18 kDa e mais específica do que ao do índice baciloscópico.

A técnica de Real Time PCR tem a melhor sensibilidade (91,3%), na detecção de *M. leprae*, detectando até 5 moléculas (25 fg) do microorganismo, quando são utilizados os *primers* que amplificam o Ag do gene codificante 85-B. Esta técnica foi 17,7% superior quando comparada com a técnica da PCR convencional para o mesmo gene, além de detectar e quantificar DNA de *M. leprae* em amostras clínicas onde o bacilo não foi detectado. (Martinez et al., 2006).

Recentemente, Goulart et al. (2007) utilizaram a técnica de Nested-PCR com dois pares de *primers* para amplificar a região do DNA genômico do *M. leprae*, a RLEP. Os pares de *primers* amplificaram fragmentos de 372pb e de 130pb, sendo o *amplicon* menor (130pb) mais sensível que o *amplicon* maior (372pb), no diagnóstico da hanseníase em PB e MB.

2.4.8 Amostras clínicas para a realização da PCR

O PCR pode demonstrar a presença de *M. leprae* numa variedade de amostras clínicas, tais como: pele, nervos, tecidos viscerais, secreção de pele erosada, secreção nasal, secreção purulenta, bulbo capilar e sangue (Williams et al., 1992; Santos et al., 1993; Chemouilli et al., 1996; Yasuyuki et al., 1992; De Wit et al., 1993; Pattyn et al., 1993; Kyu et al., 1994; Santos et al., 1995; Lee et al., 1994). Tanto o PCR, quanto a hibridização do DNA podem ser realizados a partir de qualquer tipo de tecido ou fluído, desde que se possa extrair o DNA celular. Lee et al. (1994),

demonstraram que o *M. leprae* pode ser detectado com sucesso, mesmo que em pequenas quantidades de pele e sangue periférico.

Os resultados falso-positivos e falso-negativos podem ocorrer na técnica de PCR. (De Wit et al., 1991; Williams et al., 1992). Foi demonstrado a possibilidade de se obter diferentes resultados de PCR em diferentes amostras clínicas oriundas do mesmo paciente (Misra et al., 1995; Santos et al., 1993). Por outro lado, resultados negativos podem ser obtidos em amostras positivas confirmadas microscopicamente (De Wit et al., 1991; Yoon et al., 1993; Withchwechkan et al., 1995). Além do fator de chance de achar a bactéria, principalmente se elas estão presentes em pequenas quantidades ou muito dispersas no tecido. Outra explicação para os resultados falso negativos é quando possui a presença de substâncias nas amostras que podem inibir a técnica da PCR (De Wit et al., 1991).

O PCR pode ser positivo em organismo morto, já que o DNA pode persistir aí por um longo período. Vários estudos têm relatado uma diminuição dos resultados positivos através da PCR em pacientes recebendo tratamento com PQT (Withchiwechkan et al., 1995; Kampirapap et al., 1998). Entretanto, vários pacientes após tratamento com PQT mantêm PCR fortemente positivo, sugerindo que a PQT não elimina todas as bactérias após o tratamento, ou mesmo caracterizando talvez a "resistência" da micobactéria (Williams et al., 1992).

Vários métodos têm sido propostos para remover as substâncias inibidoras (Boom et al., 1990; Wilson et al., 1993; Kox et al., 1994), além do que, a inibição pode ser monitorada pela adição de uma pequena quantidade do DNA específico para duplicação da amostra como um controle interno (Kolk et al., 1992).

Os resultados falso-positivos podem ocorrer através da contaminação por minúsculas quantidades de fragmentos de DNA disseminados via aerossóis, após realizações prévias da técnica de PCR ou através de contaminação cruzada entre as amostras (Persing, 1991; Kolk et al., 1992; Kox et al., 1994; Warndorff et al., 1996). Para evitar a contaminação, protocolos detalhados e precauções específicas são obrigatoriamente empregadas nos grandes centros de pesquisa. Separação física das diferentes etapas da técnica de PCR é necessária, bem como usar somente

materiais descartáveis no laboratório (Kwok; Higushi, 1989). Além disso, substituindo-se uracil por timina nas misturas da PCR, pode-se reduzir o risco de contaminação com DNA previamente amplificado (Longo et al., 1990).

Em um estudo onde se pesquisou o melhor método de fixação de tecidos infectados pelo *M. leprae*, se concluiu que o método a base de etanol 70% foi considerado o melhor meio para armazenar amostras para PCR. Entretanto, as amostras fixadas em formol 10% podem ser utilizados nas técnicas de PCR para detecção do *M. leprae*, sem perda de especificidade e mínima perda na sensibilidade se comparada com amostras frescas e não fixadas (Fiallo et al., 1992).

Donoghue et al. (2001), relataram que existem diversos métodos para detectar *M. leprae* baseados na técnica de PCR, porém nos casos em que os *amplicons* são grandes, haverá dificuldades principalmente naquelas amostras onde o DNA estiver danificado ou fragmentado. O DNA se degrada rapidamente após a morte e se fragmenta com o tempo. Nestas situações onde o material genético não está íntegro, os *primers* que amplificam seqüências repetitivas, são os mais recomendados. Isto porque os *primers* direcionados para o Ag 18 kDa estão presentes em uma simples cópia por bacilo.

3 Transmissão da hanseníase

O mecanismo da transmissão da hanseníase ainda não é bem conhecido (Deps, 2001; Britton; Lockwood, 2004; Scollard et al., 2006). Provavelmente, o principal meio de transmissão do *M. leprae* é por disseminação de aerosol de secreção nasal (Noordeen, 1994), e percutâneo através de pele danificada (Ramaprasad et al., 1997).

Acredita-se que os pacientes MB sejam os principais disseminadores do *M. leprae*, sendo freqüentemente encontrados em secreções nasais (Hatta, 1995). Entretanto, DNA de *M. leprae* também pode ser encontrado em swabs nasais em até 5% de indivíduos sadios em áreas endêmicas (Hatta, 1995; Ramaprasad, 1997).

Estudos realizados com camundongos “*nude*” mostraram que a infecção pode ser transmitida via mucosa nasal ou por injeção subcutânea, mas não por via pulmonar, pele intacta ou por ingestão (Chehl et al., 1985). O *M. leprae* foi encontrado na placenta (Bryceson, 1992) e no leite materno (Pedley, 1967), porém transmissão transplacentária ou por ingestão de leite materno são desconhecidas.

Na literatura encontram-se relatos de casos de hanseníase por contágio acidental com agulhas contaminadas (Marchoux, 1934; Klingmüller, 1938) ou por material utilizado para fazer tatuagem (Porritt; Olsen, 1948), contágio após mordedura de cão (Gupta et al., 1984) e após vacinação com BCG (Storner et al., 1981).

4 Reservatórios do *M. leprae*

Dr Sand, em 1909, no II Congresso Internacional de Hanseníase, apresentou suas dúvidas quanto a hanseníase ser somente transmitida pelo homem e sugeriu a possibilidade desta doença ser também transmitida pelo solo e animais (apud Meyers et al., 1993). Assim, a seguir alguns reservatórios e prováveis fontes ambientais de *M. leprae* são citados.

4.1 Solo e água

Kazda et al. (1986), através de exames microbiológicos, encontraram a presença do *M. leprae* em amostras de solo, água e vegetação de várias regiões do mundo onde a hanseníase era ou já tinha sido endêmica (Noruega, Costa do Marfim, Portugal, Peru, Índia, Louisiana-EUA). Na Índia, em diferentes localidades amostras de solo foram positivas para a técnica da PCR, utilizando primers para as seqüências repetitivas RLEP (Lavanaia et al., 2006).

Salem e Fonseca (1982), publicaram um artigo relatando a presença de BAAR na água do lago do Aleixo, na margem do rio Amazonas, local habitado por uma

comunidade de hansenianos.

Matsuoka et al. (1999), relataram uma maior prevalência de hanseníase nos indivíduos que utilizavam água cuja pesquisa de *M. leprae* pela técnica de PCR fora positiva em relação aos indivíduos que utilizavam água PCR negativa. Os autores concluíram que a água constituía-se num reservatório e fonte de infecção para do *M. leprae*.

4.2 Artrópodes

Em 1911, Ehlers et al. (apud Dungal, 1961), encontrou BAAR no estômago de alguns artrópodes, após picarem doentes com hanseníase.

Souza Araújo (1941), encontrou BAAR no sangue sugado por carrapatos (*Amblyoma cajennense*) removidos de hansenianos. Foi demonstrado que 2 de 4 macacos desenvolveram hanseníase após serem picados por pulgas contendo BAAR, que por sua vez, adquiriram os bacilos após picarem hansenianos (Dungal, 1960).

Narayanan et al. (1972), na Índia, observaram que 70% dos mosquitos e 50% dos percevejos que sugaram sangue de pacientes com hanseníase não tratada, abrigavam BAAR, os quais apresentaram crescimento típico após inoculados na pata de camundongos e o não crescimento no meio de Lowenstein-Jensen, sugerindo ser *M. leprae* viáveis.

Ainda, Bona et al. (1985), no Brasil, pesquisaram BAAR no *Culex fatigans*. Foi encontrado 90% de positividade de BAAR nestes insetos, os quais eram provenientes de entornos de pacientes com hanseníase.

4.3 Anfíbios

BAAR formando globias dentro de macrófagos em lesões semelhantes a granulomas hansênicos em anfíbios, especificamente em três rãs, foram achados por Machicao e La Placa (1954).

4.4 Mamíferos

Em 1934 foi publicado uma entidade denominada de “lepra bubalorum”, ocorrida em 21 búfalos que viviam nas águas da Indonésia (Lobel, 1936).

Donham e Leininger (1977), relataram uma doença semelhante a hanseníase em um chimpanzé vindo da Serra Leoa (África). Dois meses após sua chegada nos EUA, o chimpanzé apresentou nódulos cutâneos. A biópsia de lesão nodular do lóbulo de orelha revelou infiltrado de macrófagos contendo grande número de BAAR.

Um outro caso interessante foi do macaco mangabei, originário da Nigéria, que desenvolveu uma doença indistinguível da hanseníase, quatro anos após entrar nos EUA (Walsh et al., 1981), além das lesões infiltradas de BAAR, este macaco desenvolveu paralisia, resultando em deformidades nos pés e mãos.

Infecções experimentais em tatus, da espécie *D. novemcinctus*, tiveram seu início em 1968 nos EUA e demonstraram que este animal era susceptível à infecção pelo *M. leprae* (Kirchheimer; Storrs, 1971). Opromolla et al. (1980), no Brasil, também conseguiram desenvolver hanseníase em tatus da espécie *D. novemcinctus*.

5 Aspectos biológicos dos tatus.

De modo semelhante ao Projeto do Genoma Humano, o genoma do tatu da espécie *D. novemcinctus* foi sequenciado (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/tracemb.html>). O tatu, mamífero pertencente a subclasse *Eutheria*, superordem *Edentata*, ordem

Xenarthra e a família *Dasypodidae*, conta nos dias atuais com aproximadamente dez gêneros sobreviventes (Linnaeus, 1766). Os tatus são placentários e as 20 espécies de tatus existentes possuem gestação completa, dentro do útero como nos seres humanos (Pereira Júnior et al., 2004). Tatus ocupam diversos habitats, mas parece existir uma forte associação com fontes de água (Loughry; McDonough, 1998).

A espécie *D. novemcinctus* é a única espécie encontrada na América do Norte (Storrs et al., 1971). Em diversas regiões (terras baixas) do sudeste dos EUA, a densidade chega a mais de sete tatus por acre e estes animais não formam comunidades (Truman et al., 1991).

Esta espécie é uma das mais dispersas no Brasil, sendo conhecida como tatuê ou tatu-galinha. É também denominada de tatu de nove bandas ("*nine banded armadillo* ou *nine banded long-nosed armadillo*") (Pereira Júnior et al., 2004).

Um animal adulto pesa em torno de 2,5 a 5 Kg (Arruda et al., 1988).

Parasitas como *Trypanosoma cruzi* (Lainson et al., 1979; Paige et al., 2002), *Tunga travassosi* (Anderson; Benirschke, 1966), *Tunga terasma* (Antunes et al., 2006), sarcosporídios (Lindsay et al., 1996, Antunes et al., 2007), além de cestóides e helmintos (Storrs, 1971; Arruda et al., 1988; Antunes et al., 2005), são frequentemente encontrados nos tatus da espécie *D. novemcinctus*. Alguns autores têm identificado a presença de *Paracoccidioides brasiliensis* em tatus da espécie *D. novemcinctus* (Naiff et al., 1986; Bagagli et al., 1998; Fernandes et al., 2003). Alguns autores relataram infecção por outras micobactérias nos tatus da espécie *D. novemcinctus* (Coelho et al., 1988; Dhople et al., 1992). Também os tatus são hospedeiros de protozoários, como o que causa a leishmaniose (Pereira Júnior et al., 2004).

Lesões traumáticas são comuns e foram estudadas na espécie *D. novemcinctus* por Job et al. (1986).

6 Hanseníase em tatus

Além dos humanos, os tatus da espécie *D. novemcinctus* são os únicos hospedeiros endêmicos naturais do *M. leprae* (Truman, 2005). A hanseníase em tatus foi pela primeira vez reportada em 1975 (Walsh et al., 1975) e em 1983 foi confirmado que o *M. leprae* encontrado em seres humanos é morfologicamente idêntico ao que infecta os tatus. Além da espécie *D. novemcinctus*, também as espécies *Dasypus hybridus* e *Dasypus sabanicola* desenvolvem a hanseníase experimentalmente (Smith et al., 1983; Job 2000). No Brasil o tatu é um dos animais mais populares da fauna brasileira, e o tatu-galinha (*D. novemcinctus*) encontrado em todo território nacional (Pereira Júnior et al., 2004), sendo a hanseníase em tatus selvagens reportada pela primeira vez no Brasil em 2002 (Deps et al., 2002b).

6.1 Distribuição geográfica dos tatus

Tatus não são espécies nativas dos EUA. São espécies nativas da América do Sul. Existentes no México por volta de 1880, acredita-se que tenham chegado ao estado da Louisiana por volta de 1926 e cruzaram o estado em direção ao rio Mississippi no ano 1957. Atualmente, existem tatus também nos estados do Colorado e da Flórida levados por particulares, por volta de 1922 e em algumas ilhas do Caribe levados por embarcações (Talmage; Buchannan, 1954; Smith; Doughtty, 1984; McDonough et al., 1998). Os tatus da espécie *Dasypus novemcinctus*, estão presentes desde o sul da Patagônia na Argentina até a região centro-sul dos EUA, sendo esta espécie encontrada em todas as regiões do Brasil (Pereira Júnioe et al., 2004).

6.2 Infecção pelo *M. leprae* em tatus

A infecção experimental em tatus foi a primeira evidência de que poderia ocorrer casos de doença ocorrendo naturalmente. Kichheimer e Storrs (1971), relataram o desenvolvimento de hanseníase virchowiana nos tatus da espécie *D. novemcinctus*, após a inoculação de material contaminado com *M. leprae* proveniente de hansenoma humano. Assim iniciaram as pesquisas para estabelecer a frequência

de infecção natural nos tatus com *M. leprae* e para o uso dos tatus como modelo experimental nos estudos da hanseníase (Kichheimer; Storrs, 1971; Binford et al., 1976; Truman et al., 1991).

Em 1976, Binford et al. (1976), estudaram 15 animais infectados experimentalmente com *M. leprae* e demonstraram que os tatus desenvolviam uma doença disseminada similar a hanseníase virchowiana humana. Lesões de hanseníase tuberculóide e dimorfa não foram descritas nestes animais. Walsh et al. (1978), encontraram doença generalizada em 40 a 65% dos animais infectados experimentalmente e Kirchheimer e Sanchez (1981) encontraram em 88 a 93%.

Job et al. (1985b), realizaram estudo retrospectivo de 42 tatus infectados experimentalmente, sendo 34 adultos selvagens e 8 filhotes nascidos em cativeiro. A infecção foi considerada generalizada quando os BAAR eram encontrados em fragmentos de tecidos de orelhas ou em nódulos de pele que não fossem dos locais de inoculação ou no sangue. Dos 42 tatus estudados, 36 desenvolveram doença generalizada, sendo que não houve diferença estatística entre os sexos. As doses intravenosas com grande número de bacilos provocaram a doença num período de tempo menor que os outros inóculos. Os bacilos foram demonstrados nos hansenomas cutâneos, nervos, linfonodos, fígado, baço, medula óssea, testículos, adrenais, músculos e olhos. Com menor frequência os bacilos foram encontrados nos pulmões, meninges, cérebro, rins e trato digestivo.

Convit et al. (1978), após estudos em tatus infectados experimentalmente, reportaram a presença de bacilos nos hansenomas cutâneos, nervos, linfonodos, fígado, baço, medula óssea, testículos, adrenais, músculos e olhos. Com menor frequência foram encontrados nos pulmões, meninges, cérebro, rins e trato digestivo.

Na Argentina, Resoagli et al. (1981), encontraram um tatu da espécie *D. novemcinctus* doente, que após investigações, demonstrou estar infectado pelo *M. leprae*. A necrópsia deste tatu mostrou adenomegalia axilar e da cadeia mesentérica. Hepatomegalia com pontilhado hemorrágico, esplenomegalia com coloração marrom e nódulos brancos disseminados. Hipertrofia das glândulas

suprarrenais e congestão renal. Na microscopia do baço e fígado observou-se a presença de histiócitos vacuolados e BAAR formando ou não globias. Logo depois em 1984, Martinez et al. (1984) ainda na Argentina, estudaram outro tatu com as mesmas características macro e microscópicas, resultando em diagnóstico de hanseníase naturalmente adquirida.

Smith et al. (1983), estudaram 451 tatus selvagens provenientes do Texas e encontraram doença semelhante a hanseníase em 21. Entretanto, o critério utilizado para o diagnóstico era de que deveria ter alguma evidência histológica da doença e todas as culturas para as outras micobactérias negativas, nos meios de Lowenstein-Jensen e Middlebrook, não importando se tivessem quadro clínico característico ou não.

Apesar de tatus exibirem características de envolvimento de nervos, deformidades e incapacidades não são observadas (Binford et al., 1977 Meyers et al., 1978; Folse; Smith, 1983).

Um nódulo no local da inoculação experimental é geralmente o primeiro sinal do desenvolvimento da infecção pela micobactéria. O nível de Ac começa a se elevar quando surge o nódulo no local da inoculação e continua a se elevar quando surgem outros nódulos em outras localizações. A formação de Ac ocorre durante o desenvolvimento de infecção sistêmica, simultânea ao aumento da carga bacilar (Harboe, 1981).

Binford et al. (1977), fizeram as seguintes observações sobre os aspectos histopatológicos de 41 tatus infectados experimentalmente e que foram necropsiados e corados pela hematoxilina-eosina e Fite-Faraco:

- 1 Os BAAR estavam no interior de macrófagos (histiócitos), células do sistema retículo-endotelial do fígado, baço, células do alvéolo pulmonar, células endoteliais vasculares e células de Schwann. Em animais com infecções antigas os BAAR apresentavam globias;
- 2 Nas lesões de pele não foram observadas células epitelióides, células

gigantes de Langerhans;

- 3 Uma comparação da disseminação da doença em 15 tatus naturalmente infectados e 15 experimentalmente infectados não mostrou diferença entre o acometimento dos diferentes órgãos. Foi relatada a ocorrência de nódulos íntegros e ulcerados na pele e na carapaça do animal (Binford et al., 1977).

6.3 A origem da infecção natural em tatus

Relatar hanseníase em tatus selvagens tem sido muito controverso. Há estudos que dizem que a hanseníase em tatus selvagens foi descoberta a partir de quando o animal foi usado como modelo experimental que teriam escapado de centros de estudo de hanseníase (Weiser, 1975; Skinsnes, 1976). Entretanto, esta hipótese não é mais aceita, já que outros estudos indicaram a ocorrência natural da infecção.

A hipótese ambiental foi confirmada em 1985 com o advento das técnicas de detecção do Ac anti PGL-1. Entre 1960-1964, Roth et al. (1964), coletaram amostra de sangue de animais selvagens para uma pesquisa sobre leptospirose, inclusive amostras dos tatus da espécie *D. novemcinctus*. Estes soros ficaram armazenados durante 25 anos e somente em 1986, 17 soros de 182 foram positivos para o PGL-1, indicando que o *M. leprae* deva ser enzoótico entre tatus pelo menos desde 1961. Isto também indica que a hanseníase em tatus selvagens poderia não ser originada por possível contaminação accidental do ambiente por parte dos Centros de Pesquisa em Hanseníase, porque somente em 1968 estes centro começaram a trabalhar com tatus (Truman et al., 1986b).

Segundo Truman, os tatus adquiriram a hanseníase por meios naturais em diferentes localidades durante os anos (Truman, 2005).

6.4 Detecção de *M. leprae* em tatus

Através dos estudos com Mitsuda concluiu-se que os tatus exibem a resposta imunológica completa do espectro da infecção pelo *M. leprae*, alcançando os pólos TT a LL, classificando-os de acordo com a escala de Ridley-Jopling (Job et al., 1983; Job et al., 1985b). A maioria dos tatus infectados exibindo a hanseníase são MB, com evolução lenta, como demonstrado em animais infectados experimentalmente que necessitam de 18-24 meses de incubação antes dos tatus sucumbirem a doença.

Apenas animais adultos desenvolvem a hanseníase, e não há relatos de diferença de susceptibilidade na progressão da doença entre os tatus infectados (Truman; Sanchez, 1993; Walsh et al., 1986). A hanseníase em tatus produz poucos sinais e sintomas, não sendo fácil a distinção de um animal normal de um infectado. A hanseníase nos tatus é sistêmica e envolve primariamente os tecidos reticuloendoteliais (Binford et al., 1976; Binford et al., 1977).

Todos os Ac dos tatus são reconhecidos por anti-IgM humanos mas não por anti-IgG ou anti-IgA humanos (Truman et al., 1986a; Eggelte et al., 1988). Como acontece com os hansenianos, os tatus também reconhecem o Ag PGL-1 do *M. leprae* e produzem Ac contra determinante do 3,6-di-O-metil glucose (Eggelte et al., 1988).

Tatus MB possuem uma resposta imunológica forte com produção de Ac, sendo que em tatus infectados em laboratórios, existem Ac IgM específicos contra o antígeno PGL-1 do *M. leprae* (Hunter et al., 1982). Os níveis de Ac IgM contra o antígeno PGL-1 aumenta com o aumento da carga do bacilo e persiste no animal durante o curso da doença (Truman et al., 1986a).

Os estudos em macacos mostraram que estes animais produzem Ac IgM anti-PGL-1 (Gormus et al., 1988), enquanto que nos tatus o estabelecimento da infecção poderia ser detectado mais precocemente do que por métodos previamente utilizados, como os histopatológicos (Truman et al., 1986a). Assim, o ELISA tem sido usado para monitorizar o desenvolvimento de doença em tatus e também em macacos mangabeí experimentalmente infectados (Eggelte et al., 1988).

Job et al. (1992), avaliaram a presença de Ac IgM anti-PGL-1 em tatus infectados experimentalmente com diferentes doses de bacilos. A presença dos Ac foi correlacionada com infecção pelo *M. leprae* e a disseminação da doença nos vários órgãos. Os níveis dos Ac encontrados foram elevados nos animais com doença disseminada, não mostrando positividade nos casos moderados ou com baixa carga bacilar. De 27 animais infectados apenas 5 tiveram níveis positivos na sorologia, entretanto 18 animais mostraram evidência histopatológica de infecção em mais de um órgão.

A presença de Ac IgM anti-PGL-1 ocorre em 20% dos tatus selvagens da Louisiana (Truman et al., 1986a).

Deps et al. (2004), relataram pela primeira vez o uso do teste rápido ML Flow® para detectar Ac IgM anti PGL-1 em tatus selvagens. Em outro estudo, foi encontrado positividade em 11 (29,7%) de 37 tatus estudados, utilizando o mesmo teste rápido (Deps et al., 2007).

Hartskeerl et al. (1989), usaram a técnica de PCR para identificar infecção pelo *M. leprae* em tatus. Utilizaram *primer* que amplifica o gene de 36 kDa em amostras de fígado de tatus infectados experimentalmente. Foram testados em três animais infectados com *M. leprae* e dois não infectados. Os resultados foram positivos somente nos animais infectados.

Na disseminação generalizada da doença em estágios tardios, nenhum órgão é poupado, mas regiões frias do corpo tendem a mostrar maior envolvimento pelo *M. leprae* como: pele, nódulos, linfonodos e outros tecidos através de esfregaços diretos, exames histopatológicos e PCR (Job et al., 1985b; Walsh et. al, 1986; Job et al., 1991).

Job et al. (1991), usaram a técnica de PCR para pesquisar a presença de *M. leprae* em linfonodos inguinais de 30 tatus selvagens capturados na Louisiana, encontrando uma positividade de 53,3%. Neste mesmo trabalho, os autores fizeram uma comparação da técnica de PCR com outros métodos de detecção de *M. leprae*

em tecidos de tatus. Concluíram que o PCR usando o *primer* para codificar o Ag 18 kDa, é o teste de maior sensibilidade para detectar infecção pelo *M. leprae*.

Rastogi et al. (1999), utilizaram a técnica de PCR, através da análise do polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição ("pra" – antígeno rico em prolina) que culmina com a ampliação da porção de 438 pb do gene *hsp65* presente em todas as micobactérias. Esta técnica foi seguida por dois processos de digestão do produto amplificado através das enzimas de digestão *BstEII* e *HaeIII* resultando em fragmentos de 315 pb e 135 pb e fragmentos de 265 bp e 130 pb do gene que codifica a proteína de 65 kDa. Os autores após aplicarem a técnica em amostras de tecidos de tatus e camundongos atríquicos e atímicos infectados com *M. leprae* obtidos de hansenomas humanos, verificaram que o método identifica pequenas quantidades do *M. leprae*, com alta especificidade e sensibilidade, sugerindo ser aquele o método ideal para a detecção de infecção pelo *M. leprae*.

Zumarraga et al. (2001), repetiram a técnica utilizada por Rastogi et al. (1999), em amostras de 6 tatus com diagnóstico de hanseníase naturalmente adquirida, provenientes da Argentina de 6 pacientes hansenianos, além de amostras de outras 4 micobactérias. As amostras dos tatus utilizadas eram fragmentos do fígado e dos linfonodos poplíteos e axilares. Os resultados de Rastogi et al (1999), foram confirmados obtendo positividade apenas nos hansenianos e nos tatus.

Scholl et al. (1996), estabeleceram quatro estágios da hanseníase nos tatus infectados experimentalmente: 1) não-infectados, 2) infectados, 3) soroconversão e 4) histopatologia positiva (BAAR observados em nervos de cortes de orelhas) (**Figura 2**). E concluíram que a morte segue, freqüentemente, pouco tempo depois da observação de bacilos na histopatologia da orelha.

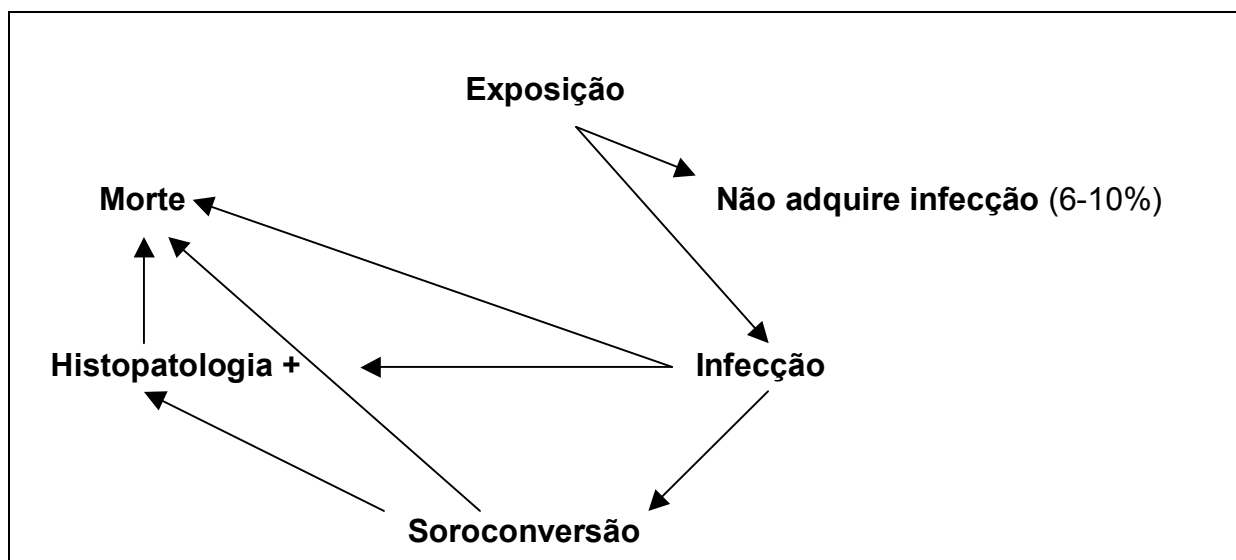


Figura 2: Os estágios da hanseníase em tatu infectado experimentalmente e suas transições (baseado em Scholl et al., 1996).

6.5 Distribuição geográfica da hanseníase em tatus nos Estados Unidos da América

Ao longo do rio Mississippi, no estado da Louisiana, estendendo-se ao sul do Texas, os tatus encontraram um ambiente favorável para sua existência. Nessas regiões (terras baixas) do estado da Louisiana e do Texas existem um grande reservatório de *M. leprae* entre os tatus selvagens (Smith et al., 1983; Walsh et al., 1986; Job et al., 1986).

Um levantamento realizado entre 565 tatus capturados no sudeste dos EUA, identificou uma média de 3,8% de prevalência de achados histopatológicos e 16% de detecção de Ac IgM contra Ag PGL-1 (Truman et al., 1991). Roth et al. (1964) relataram que a hanseníase em humanos nessa mesma região não mudou significativamente durante um período de 30 anos. As infecções por *M. leprae* nestes tatus da Louisiana, sugerem que o *M. leprae* tem-se abrigado nestas regiões por muitas gerações (Truman et al., 1991).

6.6 Associação da hanseníase de tatus com humanos

O quantidade de tatus infectados nos EUA, sugerem que os tatus possam contribuir em muitos casos de infecção em humanos, mas a importância que eles tem sobre a saúde humana nestas regiões tem sido difícil de descrever (Truman, 2005).

Muitos casos de hanseníase nos EUA têm aumentado entre os imigrantes de países endêmicos ou de americanos que adquiriam a doença enquanto moravam nestes países. Entretanto, existe uma detecção persistente de 30-40 casos por ano da infecção nos estados do Texas e da Louisiana entre os cidadãos nativos (Enna et al., 1979; Neill et al., 1985; Joseph et al., 1985). Há relatos de casos de 13 indivíduos que desenvolveram a hanseníase nos estados Louisiana e do Texas que não tiveram conhecimento da exposição ao *M. leprae* e outros relataram o contato direto com tatus, seja manipulando o animal ou consumindo sua carne (Freiberger; Fudenberg, 1981; Lumpkin et al., 1983; Lumpkin et al., 1984; West et al., 1988).

Lumpkin et al. (1983), relataram a ocorrência de cinco casos de hanseníase em caçadores de tatus nos EUA, enquanto Thomas et al. (1987), referem a exposição aos tatus como uma possível fonte de infecção entre hansenianos residentes nos EUA, porém, nascidos no México.

Em um estudo caso controle Filice et al. (1977), com 19 pacientes nascidos na Louisiana, não foi encontrado associação entre os contatos com os tatus e a presença de hanseníase em humanos. Na Louisiana e no Texas, a exposição a tatus é comum e cerca da metade de todos os casos de hanseníase atendidos na Clínica de Houston no Texas relatou contato direto ou indireto com tatus (Bruce et al., 2000).

Em inquérito epidemiológico realizado por Rodrigues et al. (1993), onde foram entrevistados 205 pacientes hansenianos no interior do estado de São Paulo a respeito da ingestão de carne de tatu, 101 referiram o uso da carne de tatu antes de adquirir a doença, sendo que 99 pacientes referiram não conhecer casos familiares de hanseníase. Os autores aventaram a possibilidade de transmissão da doença por alimento infectado pelo *M. leprae*.

Deps et al. (2002a), realizaram um inquérito epidemiológico com 280 ex-hansenianos no Espírito Santo, e verificaram que 90,4% já haviam consumido carne de tatu mais de uma vez, antes do diagnóstico de hanseníase, em comparação com 9,6% da população controle. Deps et al. (2003b), relatam os aspectos epidemiológicos da transmissão da hanseníase em relação a exposição ao tatu e sugere uma possível fonte de *M. leprae* através do consumo da carne de tatu, principalmente nos hansenianos sem história de contatos com outros pacientes portadores de hanseníase antes do seu diagnóstico.

Ainda, Lane et al. (2006), relataram um caso de hanseníase em uma mulher do estado da Georgia nos EUA, que é considerado um estado não endêmico para hanseníase. Os autores relataram o contato direto da paciente com tatus e concluíram que houve associação do contato com os tatus e o desenvolvimento da doença.

7 Métodos

7.1 Planejamento do estudo

Em um estudo seccional ou de prevalência, planejou-se num primeiro momento a captura de tatus de todas as regiões do estado do Espírito Santo. A dificuldade de se conseguir especialistas em capturas de animais silvestres concentrou as nossas coletas em apenas 4 municípios (Vitória, Serra, Marechal Floriano e Alegre).

Os tatus foram capturados neste municípios por especialistas em captura de tatus, durante o período de julho de 2004 a julho de 2006. Após a captura os animais eram encaminhados para o Laboratório de Hanseníase Experimental (LHE), no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), no município de Vitória ou para o Laboratório de Patologia Veterinária (LPV), do Centro de Ciências Agrárias da UFES, situado no município de Alegre. Os animais foram transportados em caixas de madeira devidamente ventiladas e com pouca iluminação para redução do estresse.

7.2 Amostra de tatus estudada

Foram estudados tatus selvagens da espécie *Dasypus novemcinctus* provenientes do estado do Espírito Santo.

7.3 Exame clínico e documentação dos animais

No LHE ou no LPV, os animais eram anestesiados utilizando Tiletamine/Zolazepan, 8.5mg/Kg por via intramuscular, que são anestésicos para imobilizações por 30 a 40 minutos (Fournier-Chambrillon et al., 2000). Após a anestesia, os tatus eram pesados e o sexo era determinado.

Os tatus eram lavados com água e sabão neutro utilizando uma pequena escova e depois eram limpos com gaze embebida em Povidine®, seguido de álcool a 70°.

A seguir, os tatus eram submetidos ao exame clínico a procura de lesões ulceradas na pele, na carapaça, no subcutâneo, nas regiões nasal e auricular, e também eram palpados a procura de linfadenomegalias.

Durante a necropsia, segundo Binford et al. (1975; 1977); Martinez et al. (1984), as seguintes alterações foram consideradas como sinais clínicos sugestivos de hanseníase em tatus: linfadenomegalia visível e/ou palpável (linfonodos mesentéricos, cervicais e inguinais), lesões ulceradas externas na parte ventral, carapaça, cauda e cabeça. Visceromegalias visíveis e/ou palpáveis, alterações hepáticas e esplênicas como: alterações na coloração do órgão (hipocoradas e violáceas), alterações na conformação ou estrutura do órgão (pontos brancos e bordos irregulares).

Em seqüência, os tatus eram colocados em um dispositivo especial de madeira, previamente esterilizado com formalina, de modo a expor o seu lado ventral, bem como os seus quatro membros (Garbino et al., 1996). O registro fotográfico foi realizado em todos os animais (**Fotografia 1**).

7.4 Coleta de material

Durante a anestesia, o sangue era coletado pela veia subclávia em frascos Vacutainer® sem anticoagulante. Depois de centrifugado, o soro era separado, armazenado em tubo de Eppendorf® de 1,5 ml e congelado a -4°C.

Após a coleta de sangue e exame clínico, os tatus eram sacrificados sob ação da anestesia pela técnica de exsanguinação e depois, a necropsia era realizada. Durante a necropsia diversas amostras de tecidos eram coletados como: cérebro, pulmão, coração, língua, pele, orelha, rim, baço, fígado, intestino, testículo, útero e linfonodos cervicais, inguinais e mesentéricos. Amostras de tecidos foram coletadas e armazenadas em formol a 10% tamponado, em álcool 70% e em tubos

Eppendorf® de 2.0 ml, que foram congeladas a -4°C, ambas destinadas à técnica de PCR.

7.5 Técnica da PCR

A técnica de PCR foi realizada no *National Hansens' Diseases Program Laboratory* (NHDP), Baton Rouge, Louisiana, EUA. Todos os animais foram testados para dois tipos de *primers*: primeiro todos os tatus foram testados utilizando o *primer* que amplifica o antígeno 18 kDa; e depois, para os *primers* ML1 e ML2, que amplificam a sequência repetitiva RLEP (**Tabela 1**). Foi planejado que amostras positivas em quaisquer dos dois *primers* seriam checadas pela técnica de Real Time PCR seguida pelo sequenciamento para confirmação dos resultados.

Tabela 1 - *Primers* utilizados para amplificação de sequências específicas do *M. leprae*.

Primers	Sequências
<i>M. leprae</i> 18 KDa-Forward	ATTCGTCGCGAGTTCGACCTTCCT
<i>M. leprae</i> 18 KDa-Reverse	TGACAACAAACGCGTTGTTTCGATTC
<i>M. leprae</i> RLEP-Forward (ML-1)	GCACGTAAGCCTGTCCGGTGC
<i>M. leprae</i> RLEP-Reverse (ML-2)	CGGCCGGATCCTCGATGCAC

7.6 Processamento das amostras utilizando a técnica de PCR

Extração do DNA

O preparo das amostras para a extração do DNA foi realizado em laboratório de bio-segurança nível PIII. As amostras foram descongeladas em temperatura ambiente. Os seguintes tecidos foram analisados: linfonodo inguinal, linfonodo cervical, linfonodo mesentérico, cérebro, fígado e baço.

As amostras de linfonodos, cérebro, fígado foram cortados e aliquotados em parcelas de 25 mg, enquanto a amostra de baço foi cortada e aliquotada em parcelas de 10 mg, segundo recomendações do fabricante.

Após o descongelamento das amostras, seguiu-se a extração do DNA usando o Kit comercial DNeasy® Kit (Qiagen, Valencia, CA), de acordo com as instruções do fabricante. Após a extração do DNA, o mesmo era quantificado, utilizando o equipamento NanoDrop® ND-1000 espectrofotômetro (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE).

Condições da PCR

As amplificações da seqüência específica do *M. leprae*, do antígeno 18 kDa (360pb) e do RLEP (372pb), foram realizadas utilizando o protocolo padrão para PCR que é descrito a seguir.

Composição da reação de mistura

Em um tubo de reação para a técnica da PCR de 0,5ml, foram colocados diferentes quantidades de *templates* de DNA (1 a 5 µL), dependendo da concentração (que variava de 50 a 200 ng/ml). Os reagentes da mistura por reação foram: 25,75 µL de H₂O_d, 5 µL de 10X tampão para reação de PCR, 5 µL de MgCl₂ (2µM), 4 µL de mix deoxinucleotideos trifosfato (10 µM), 2,5 µL de cada *primer* (20 µM), e 0,25 µL de polimerase AmpliTAQ Gold® (Applied Biosystems, Foster City, CA), totalizando um volume final de 50 µL.

Ciclos

Os tubos de propilpropileno com as reações de mistura foram colocados em termociclador automático. Os tubos foram aquecidos a 95°C por 5 minutos para desnaturação do DNA cromossômico. Posteriormente, foram submetidos a 40 ciclos.

A mistura de reação contendo parte da amostra foi então submetida por 2 minutos a 60°C para anelamento dos *primers*; 3 minutos a 72°C para extensão e finalmente 2 minutos a 94 °C para dissociação de novos fragmentos do *template*. Um aquecimento de 72°C por 10 minutos antes do final da reação era feita.

Detecção dos produtos de amplificação

Uma parcela de 17 µL de cada produto da PCR era adicionado aos poços do gel de agarose a 2% contendo brometo de etídio (E-gel®, Invitrogen, Carlsbad, CA) e a eletroforese era feita por 30 minutos em voltagem constante. Os fragmentos de PCR eram visualizados através de transiluminação UV e era documentada usando o equipamento Gel Doc 2000 (Bio-Rad, Hercules, CA).

As amostras foram consideradas positivas, quando banda compatível com a região de 360 pb e de 372 pb da sequência do gene era amplificada na reação. A ausência de sinal na faixa compatível com o controle interno de amplificação foi definida como inibição da amplificação. Nessa situação, era empregado o teste de inibição adicionando 1µl do nosso controle positivo (*Thai-53 M. leprae* DNA) em cada amostra que foi considerada inibida e então a reação de PCR era repetida. Se a inibição da reação persistisse, uma nova quantificação, diluições e resuspenções do DNA eram feitas e a reação de PCR repetida.

Controles positivos e negativos de amplificação

Foram utilizadas soluções contendo DNA purificado da cepa (*Thai-53*) de *M. leprae* e água purificada, como controles positivo e negativo de amplificação, respectivamente.

Confirmação dos resultados positivos através da técnica de Real Time PCR e sequenciamento

Resultados positivos no PCR foram confirmados através da técnica de Real Time PCR, utilizando TaqMan® *probe* (Bio-Rad, Hercules, CA), numa reação total de 25 µL. Cinco µL do *template* do DNA das amostras que foram positivas pelo PCR, adicionadas de 2,5µL de H₂O_d para a reação com os *primers* para a seqüência repetitiva (RLEP) e 4,5 µL para a reação para o antígeno 18kDa. Foi utilizado 12,5 µL de Master Mix Universal para PCR (Applied Biosystems, USA) para ambos os *primers*, 2,5 µL de cada *primer* RLEP, (20 µM), e 1,25 µL de cada *primer* 18kDa (20 µM) e 2,5 µL da *probe* TaqMan® (1:10 dilution) para a reação da RELP e 0,5 da *probe* TaqMan® (1:10) para a reação do 18kDa, e então eram colocados na placa óptica para a reação de Real Time PCR.

As seqüências dos *primers* (18kDa e RLEP) e das *probes* foram adquiridas a partir do Sanger Center (www.sanger.ac.uk) e alinhados para as regiões de identidade utilizando o programa Omiga 2.0 (Oxford Molecular Ltd., Madison, WI). Os *primers* e a *probes* fluorescentes foram escolhidos utilizando o programa Primer Express (PE Applied Biosystems, Foster City, CA), baseado no critério de estringência estabelecido para as reações da Taqman PCR.

Todos os reagentes utilizados nos ensaios para TaqMan foram recomendados pelo fabricante (Applied Biosystems). A reação de PCR e a análise de dados foram executados no equipamento de Real Time PCR ABI 7300 System (Applied BioSystems). Foram utilizadas condições padrões de PCR da AmpErase UNG de ativação por 2 minutos a 50° C, ativação da AmpliTaq Gold DNA Polimerase por 10 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de 15 segundos para dissolver e 1 minuto a 60°C para anelamento e extensão.

As seqüências dos *primers* e das *probes* utilizadas neste estudo para as reações de Real Time PCR foram as seguintes (**Tabela 2**).

As amostras que foram positivas no PCR e Real Time PCR, foram purificadas utilizando um Kit de purificação QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen), de acordo

com as recomendações do fabricante. Após a purificação do DNA, o sequenciamento do material genético foi realizado pelo LSU Genelab facility (www.lsu.edu/genelab).

As reações do seqüenciamento foram realizadas utilizando a técnica de marcação fluorescente dos *Dyes Terminators* no programa BigDye Terminator version 3.1 (Applied BioSystems) pelo analizador genético ABI Prism 3130 (Applied BioSystems).

Tabela 2 - *Primers e probes* usados para amplificação de seqüências específicas do *M. leprae* utilizados na técnica de Real Time PCR.

Primers	Probes	Sequences
<i>M. leprae</i> 18 KDa taqman-F	ACACCGCGTGGCCGCTCG	CGATCGGGAAATGCTTGC
<i>M. leprae</i> 18 KDa taqman-R	ACACCGCGTGGCCGCTCG	CGAGAACCAGCTGACGATTG
<i>M. leprae</i> RLEP taqman-F	CGCCGACGGCCGGATCATCGA	GCAGCAGTATCGTGTTAGTGAA
<i>M. leprae</i> RLEP taqman-R	CGCCGACGGCCGGATCATCGA	CGCTAGAAGGTTGCCGTAT

7.7 Cronograma de estudo

Maio de 2005: Elaboração do projeto sumarizado, pesquisa bibliográfica e verificação das condições de exeqüibilidade do estudo.

Junho de 2005: Solicitação da licença para captura/coleta/transporte/exposição dos tatus ao IBAMA (Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) –ES (**Anexos**).

Julho de 2005 a dezembro de 2006: Captura e coleta de amostras de tecidos nos tatus.

Janeiro a junho de 2007: Realização da técnica de PCR, Real Time PCR e seqüenciamento das amostras de tecido dos tatus.

Julho a agosto de 2007: Análise dos resultados, preparo da discussão e finalização do estudo.

7.8 Cálculo do tamanho da amostra

O tamanho da amostra para se obter a prevalência foi estimado com base no cálculo para a realização de um estudo descritivo, cuja variável dependente é qualitativa e dicotômica, com um intervalo de confiança determinado em 95%. O cálculo da prevalência foi baseado nos relatos sobre sua distribuição na literatura científica. Baseado em pesquisa anterior, observou-se que a positividade da hanseníase nos tatus do Espírito Santo variou de 11,3% no teste de ELISA a 52,8% na reação de PCR (Deps, 2003a), com o valor de prevalência (inicial) a 12%, com precisão 5% de significância, o tamanho calculado da amostra foi de 63 tatus.

7.9 Codificação e armazenamento dos dados

Com base no preenchimento dos protocolos de pesquisa, foi criado um banco de dados utilizando-se o programa estatístico SPSS, "*Statistical Package for the Social Sciences*", versão 9.0 para Windows 95, onde os dados foram digitados e armazenados.

7.9.1 Considerações éticas

Foram estudados tatus da espécie *Dasypus novencinctus* de áreas rurais do estado do Espírito Santo após autorização do IBAMA, Proc.02009.000553/00. Após esta, foi obtida a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São Paulo/Universidade Federal de São Paulo, no dia 02 de março de 2001, Ref. CEP N° 107/01 (**Anexos**).

8 RESULTADOS

8.1 Informações Gerais

Sessenta e nove tatus foram capturados. Destes 69 animais, 04 morreram durante o transporte.

8.2 Procedência dos tatus

Os tatus foram capturados nas áreas rurais de 4 municípios do estado do Espírito Santo: Três em Marechal Floriano, 5 na Serra, 13 em Vitória e 48 em Alegre (Tabela- 3).

Tabela 3 - Procedência dos 69 tatus capturados no Espírito Santo

Procedência	Número (%)
Alegre	48 (69,56%)
Marechal Floriano	3 (4,34)
Serra	5 (7,24%)
Vitória	13 (18,84%)
Total	69 (100%)

8.3 Sexo

Foram capturados 31 tatus machos (M) e 38 fêmeas (F).

8.4 Peso

O peso variou de 400 a 6000 gramas (g). Os tatus foram divididos em dois grupos, grupo 1 dos que pesavam 2499g ou menos e grupo 2 dos que pesavam 2500g ou mais.

Grupo 1: nove (13%) tatus;

Grupo 2: sessenta (86%) tatus.

Isto foi feito com o objetivo de separar aqueles tatus que provavelmente eram muito jovens (Grupo 1) dos adultos (Grupo 2).

8.5 Achados clínicos

Dos 65 animais necropsiados, pelo menos uma das alterações clínicas foram observadas em 62 (95%) dos animais (**Fotografias 2, 3, 4, 5, 6 e Tabela 4-Anexos**).

O aumento dos 3 linfonodos (cervicais, inguinais e mesentéricos) foram observados em 20 (29%) tatus; aumento de pelo menos um dos 3 linfonodos foi observado em 32 (49%). Dos 65 animais necropsiados, 20 (30%) apresentaram alterações hepáticas dentre elas: fígado hipocorado (12%), pontos brancos (7%), bordos irregulares (3%) e coloração violácea (4%). Vinte e quatro tatus (35%) apresentaram alterações esplênicas. Destes as seguintes alterações foram observadas: baço hipocorado (12%), coloração violácea (3%), pontos brancos (16%) e bordos irregulares (6%). Esplenomegalia foi encontrada em 18 (27%) animais e hepatomegalia em 16 (24%). Lesões externas do tipo úlceras em: carapaça, na parte ventral, patas, cabeça e cauda foram encontradas em 13 (20%) dos 65 tatus estudados.

8.6 PCR

Foram testadas amostras de 65 animais. O PCR foi negativo para os *primers* que amplificam o antígeno 18 kDa em todos os animais e positivo em 4 (6%) animais

quando utilizado os *primers* que amplificam a seqüência repetitiva RLEP. Dos 4 animais positivos, dois pesavam mais de 3kg (M74 e F64) e o animal M74 apresentou linfadenomegalia (**Fotografia 2**). Dos animais positivos para a PCR, todos apresentaram sinais clínicos sugestivos de hanseníase (**Tabela 5**).

Os resultados obtidos pela técnica de PCR das amostras de tecidos foram baseados na leitura visual do gel de agarose através de transiluminação UV e foi documentada usando o Gel Doc 2000 (Bio-Rad, Hercules, CA) (**Figura 3**).

Os animais com amostras positivas na seqüência RLEP e os respectivos tecidos foram:

- M74 e M90 – baço
- F64 – linfonodo mesenterico
- F68 – fígado

Tabela 5- Relação dos animais positivos para a PCR e sinais clínicos

Animal	Peso (Kg)	Fígado/ baço	Visceromegalias	Linfadenomegalias
M74	3,1	Hipocorados	Não	Mesentéricas e inguinais
M90	2,0	Fígado hipocorado, pontos brancos no baço	Baço	Não
F64	3,5	Hipocorados	Não	Não
F68	2,1	Coloração violácea	Não	Não

Legenda: Kg- Kilogramas

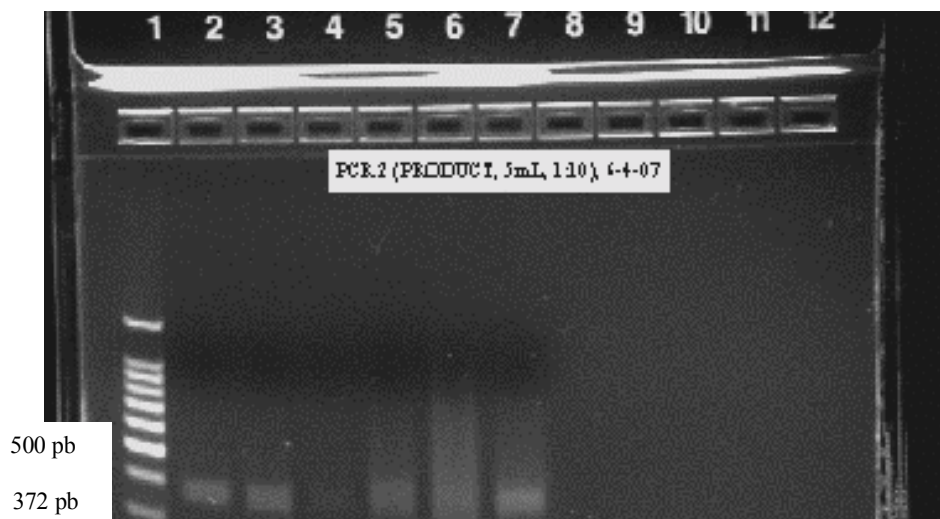


Figura 3. Imagem da amplificação específica do DNA do *M. leprae*, fragmento com 372 pb visibilizados através do gel de agarose dos tatus F64 (linha 2), F68 (linha 3), M74 (linha 5) e M90 (linha 6), controle positivo (linha 7) e controle negativo (linha 8 a 12).

8.7 Real Time PCR

Apenas os 4 animais positivos para a técnica de PCR foram testados para a técnica de Real Time PCR. Os tatus M90 e F68 foram positivos para a técnica de Real Time PCR para os dois *primers* (18 kDa e ML1/ML2) em diferentes tecidos (**Tabela 6**). A técnica de seqüenciamento foi realizada para confirmar os animais M90 e F68, que foram positivos na técnica de PCR e de Real Time PCR.

8.8 Seqüenciamento do DNA

O seqüenciamento dos 4 tatus positivos pela técnica de PCR foi tentado, sendo positiva em apenas 2 animais. Estes 2 animais também foram positivos no PCR e no Real Time PCR. Foram obtidas seqüências idênticas para a seqüência repetitiva RLEP cópias 4 e 6 específicas do *M. leprae* nos tatus F68 (fígado) e M90 (baço) respectivamente.

Tabela 6. Resultados positivos em um ou mais dos testes realizados nos tatus, incluindo PCR e Real Time PCR.

Tatus	PCR (RLEP) Tecidos	Real Time PCR (RLEP) Tecidos	Real Time PCR (18 kDa) Tecidos
M74	+ / baço (RLEP)	Neg	Neg
M90	+ / baço (RLEP)	+ / pulmão, coração e língua	+ / pulmão, coração, língua, pele, orelha, baço e fígado
F64	+ / linf. mesentérico	Neg	Neg
F68	+ / fígado	+ / intestino, língua, útero, pele, pulmão, orelha e baço	+ / intestino, língua, útero, pele, pulmão, coração e baço

Neg/(-) - negativo; pos/(+) - positivo.

Obs: O PCR utilizando o *primer* 18kDa foi negativo para todos os animais.

Resumo dos resultados da pesquisa de *M. leprae* em tatus selvagens:

- Dos sinais clínicos sugestivos de hanseníase do tipo: lesões externas como úlceras, linfadenomegalias, lesões hepáticas e esplênicas e visceromegalias, pelo menos um destes sinais foram encontrados em 62 (95%) dos tatus estudados;
- DNA de *M. leprae* foi encontrado em 6% dos tatus testados através da PCR com *primer* RLEP;
- Os animais positivos para a técnica de PCR demonstraram pelo menos um dos sinais clínicos estudados;
- Não houve positividade no PCR quando utilizado o *primer* 18kDa;

- Dois animais foram positivos pela técnica de Real Time PCR para os *primers* RLEP e 18Kda;
- O DNA das amostras dos 2 tatus positivos no Real Time PCR foram seqüenciados e confirmados como seqüência repetitiva RLEP cópias 4 e 6, que são específicas do *M. leprae*.

9 DISCUSSÃO

9.1 Procedência dos tatus e aspectos geográficos dos locais de captura

Quase 70% dos tatus estudados neste trabalho foram capturados no município de Alegre, justificando-se pela relativa facilidade de se encontrar especialistas em captura de animais selvagens naquele município. A prevalência da hanseníase é maior na Região Metropolitana da Grande Vitória (RMGV), comparada com Alegre. Assim, existe a necessidade de estudar mais animais provenientes da RMGV, bem como de estudar outras espécies de tatus existentes na nossa fauna, visto que os estudos americanos só realizaram a pesquisa na espécie *D. novemcinctus*, por ser esta a única existente naquele Continente (Storrs et al., 1971; Truman, 2005).

9.2 Aspectos clínicos da hanseníase nos tatus e sua relação com achados laboratoriais

Houve a preocupação de se estudar animais adultos com mais de 2500g, já que vários autores relataram a inexistência da hanseníase em animais menores (Job et al., 1983; Job et al., 1985a; Truman, 2005). Dos animais capturados no presente estudo, 60 (86%) de 69 tatus eram adultos.

No presente estudo, dos 4 tatus PCR positivos, apenas o animal M74 apresentou linfadenomegalia nas cadeias inguinal e mesentérica e pesava mais de 3kg. Este animal apresentou os dois mais importantes achados que sugerem a presença de hanseníase em tatus: PCR positivo e linfonodos aumentados na necropsia (Job et al., 1991). A pouca frequência dos achados clínicos nos animais PCR positivos encontrados neste estudo ainda continua em discussão. Ao contrário, Deps (2003a), encontrou apenas um tatu com evidente sinal clínico da hanseníase entre 56 estudados, com linfonodo palpável na região inguinal, altos níveis de anticorpos IgM anti-PGL-1, porém resultado negativo pela técnica da PCR. De acordo com Job et al. (1991), o aumento de linfonodos é considerado um sinal clínico da hanseníase em tatus.

Entre os animais do presente estudo com evidências laboratoriais de infecção pelo *M. leprae*, como PCR e/ou Real Time PCR positivo, outros sinais clínicos como fígado (M74, M90, F64) e baço hipocorados (M74, F64), fígado e baço violáceos (F68) e baço com pontos brancos (M90) foram encontrados, estando de acordo com vários autores que também encontraram alterações na necropsia sugestivas de infecção nos animais com evidências laboratoriais (Binford et al., 1976; Binford et al., 1977; Martinez et al., 1984).

Na Argentina, Resoagli et al., (1981); Martinez et al., (1984), relatam que linfonodos mesentéricos, pontos brancos em fígado ou baço e visceromegalias fazem parte dos sinais clínicos de hanseníase disseminada em tatus. Entretanto, Job et al. (1991), não descrevem estes tipos de alterações como típicas de hanseníase ocorrendo em tatus.

Não foram encontrados sinais clínicos tipo “hansenomas” entre os 69 tatus capturados e os 65 necropsiados, como os descritos nos tatus provenientes da Louisiana e Texas (Meyers et al., 1978; Job et al., 1991).

Martinez et al. (1984), não evidenciaram sinais clínicos de hanseníase em tatus. Portanto, para Smith et al. (1983), que estudaram 451 tatus, o exame físico foi inefetivo como instrumento para rastrear a infecção.

Os achados clínicos desta infecção em tatus não são freqüentes como mostra Walsh et al. (1986), que dos 50 animais infectados encontrados na Louisiana e Texas, somente 5 apresentavam evidências clínicas de infecção (10%). Martinez et al. (1984), na Argentina, relataram que os 2 tatus infectados não apresentaram sinais clínicos de hanseníase. As manifestações eram vistas na necrópsia e na microscopia, principalmente no fígado e no baço.

Os animais que foram encontrados sinais clínicos considerados como de hanseníase na forma de linfadenomegalia, poderiam estar na fase inicial da doença, sendo o aumento de linfonodos, um dos primeiros sinais clínicos desenvolvidos por um animal infectado (Binford et al., 1976; Binford et al., 1977; Job et al., 1991).

Entretanto, os sinais clínicos observados nos tatus com PCR negativo poderiam expressar as seguintes situações:

- congestão de linfonodos e vísceras ocorrendo fisiologicamente, dependendo da idade do animal ou outras doenças associadas;
- fase evolutiva da hanseníase;
- acometimento de linfonodos e vísceras decorrentes de outros processos patológicos/infecciosos ou não, que não foram avaliados no presente estudo;
- e verdadeiras lesões da hanseníase em tatus, o que acreditamos ser pouco provável, tendo em vista que apenas 4 dos 65 animais estudados foram positivos para a técnica da PCR. No entanto, estas lesões poderiam ser de hanseníase paucibacilar, que nas quais o PCR pode ser negativo.

A hanseníase em humanos apresenta um período de incubação longo, e se compararmos com a hanseníase em tatus, fica difícil estudar a sequência dos eventos seguintes a infecção pelo *M. leprae*. Portanto, sinais clínicos e patológicos precoces de hanseníase, não são claros, e até o momento são pobremente definidos (Meyers, 1999).

9.3 Técnica da PCR

No presente estudo foi utilizado o kit comercial DNeasy® Kit-Qiagen (Valencia, CA) na extração de DNA, que tem se mostrado eficiente nas extrações realizadas no National Hansen's Diseases Program (NHDP), Louisiana State University (EUA). Várias outras técnicas podem ser utilizadas para a extração do DNA, como em Woods e Cole (1989), que usaram o método de choque térmico para extração do DNA bacteriano e Williams et al. (1990), que realizaram a amplificação do DNA a partir de amostras sonicadas. A extração de DNA do *M. leprae* é considerada uma etapa difícil deste método porque este microorganismo é refratário às mais comuns técnicas de lise celular e é difícil conseguir extrair um DNA que seja viável para

estudos numa pequena fração da amostra. Os estudos de Woods e Cole (1989), de Williams et al. (1990), e de Deps et al. (2002b), utilizaram a técnica de hibridização para aumentar a sensibilidade da técnica de PCR.

Segundo Job et al. (1991), a amplificação de DNA provenientes de linfonodos de tatus utilizando o *primer* que codifica o antígeno 18 kDa é considerado o teste mais sensível para detectar a presença do *M. leprae*, seguido dos achados clínicos na necrópsia, ELISA para IgM anti o Ag PGL-1, biópsia de nódulo inguinal e por último biópsia de orelha. Job et al. (1991), não testaram a seqüência repetitiva, RLEP e assim consideram ser o *primer* para o Ag 18 kDa o teste mais sensível. Entretanto, o Ag 18 kDa existe em uma simples cópia no genoma do *M. leprae* (Williams et al., 1990), enquanto que a seqüência repetitiva espécie-específica do *M. leprae*, a RLEP (Clark-Curtiss; Docherty, 1989), contém pelo menos 28 cópias dispersas no genoma do *M. leprae* (Woods; Cole, 1990).

Como foi citado, diferentes técnicas foram desenvolvidas para detectar regiões gênicas do *M. leprae* através da técnica de PCR, como por exemplo, o antígeno 36 kDa (Kampirapap et al., 1998), o antígeno 18 kDa (Williams et al., 1990), o antígeno 65kDa (Plikaytis et al., 1990) e as seqüências repetitivas (Woods; Cole, 1989).

Entretanto, Kang et al. (2003), compararam a sensibilidade dos *primers* para o antígeno 18kDa e o da seqüência repetitiva RLEP. Concluíram que os *primers* que amplificam a seqüência repetitiva RLEP são os mais sensíveis. Os *primers* ML1 e ML2, que amplificam a seqüência repetitiva RLEP, têm se mostrado eficientes em tecidos de humanos (Woods; Cole, 1989; Santos et al., 1993; Santos et al., 1995) e de tatus (Deps et al., 2002b; Deps, 2003a), em amostras de sangue e tecidos.

No presente estudo, utilizando o *primer* RLEP, 4 amostras de tecidos foram positivos para a técnica de PCR: baço (tatus M74 e M90), linfonodo mesentérico (tatu F64) e fígado (tatu F68).

Dois importantes estudos em tatus com a técnica de PCR encontraram resultados semelhantes mesmo utilizando *primers* diferentes, o 18 kDa e o RLEP (Job et al, 1991; Deps, 2003a).

Job et al. (1991), encontraram 53,3% de infonodos inguinais positivos para PCR utilizando o *primer* que codifica o antígeno 18 KDa. Os autores propõem que no mecanismo fisiopatológico da disseminação da infecção, o *M. leprae* segue primeiro para os linfonodos inguinais, para a corrente sangüínea e a seguir para os demais órgãos.

Deps (2003a), encontrou 19 de 36 (52,7%) amostras de tecidos de tatus selvagens positivos para a técnica da PCR. Estes tatus foram capturados no mesmo estado que a do presente estudo e utilizaram os mesmos pares de primers, o ML1 e ML2. O DNA de *M.leprae* foi encontrado mais freqüentemente no cérebro (40,9%), seguido pela pele (22.2%), orelha (20%), pulmão (13.6%), baço (13%), pata (11.5%), lesão (11.1%), fígado (8.7%), rim (8.7%) e intestino (4.5%). Neste estudo, alguns animais PCR positivos foram ELISA positivos. Os resultados de Deps (2003a), são considerados muito maiores que os obtidos no presente estudo.

O cérebro também foi estudado por Opromolla et al. (1980), que encontrou *M. leprae* em cérebro de um tatu selvagem após 15 meses de inoculação experimental. No presente estudo, nenhuma amostra de cérebro foi positiva.

No presente estudo, a técnica de hibridização não foi possível de ser realizada, entretanto, os resultados positivos pela PCR foram testados através da técnica de Real Time PCR utilizando dois diferentes pares de *primers* (18 kDa e RLEP) e confirmados posteriormente pela técnica de seqüenciamento. Dos 4 animais (F64, F68, M74, M90), que foram positivos para a técnica de PCR convencional com os *primers* para a seqüência repetitiva RLEP, 2 apresentaram positividade pelo Real Time PCR (F68 e M90) em mais de uma amostra de tecido.

Este é o único estudo que utilizou estes pares de *primers* para a técnica de Real Time PCR em tatus selvagens. Atualmente, a técnica de Real Time PCR é relatada como a mais sensível na detecção do *M. leprae* (Martinez et al., 2006).

De acordo com Binford et al. (1977), e Kirchheimer (1977a; 1977b), na hanseníase disseminada em tatus, pulmão, rim, língua, cérebro, intestino e útero podem estar

envolvidos, entretanto, segundo Truman (2007, comunicação pessoal), não é comum observar o envolvimento destes órgãos em infecção natural de tatus selvagens.

Através dos estudos em tatus infectados experimentalmente, Binford et al. (1977a), mostraram que os órgãos mais acometidos em ordem decrescente são: linfonodos (100%), pele de abdômen (92,0%), pata (86,0%), baço (84,5%), orelhas (84,5%), e fígado (82,5%).

Santos et al. (1993), demonstraram que os *primers* ML-1 e ML-2 são específicos para *M. leprae* quando testados com outras micobactérias. Também os *primers* que codificam o antígeno 18 kDa tem demonstrado serem específicos do *M. leprae* quando testados com outros DNAs eucarióticos como os da espécie humana, do macaco sooty mangabey e de tatus selvagens (Williams et al., 1990). Sendo estes pares de *primers* efetivos para detecção de *M. leprae* em amostras de tecidos.

A positividade na técnica da PCR encontrada no presente estudo foi de 4 animais em 65, o que pode ser considerada baixa em relação aos estudos precedentes. Alguns tópicos serão discutidos no sentido de avaliar a existência de causas desta baixa positividade obtida pela técnica de PCR.

O modo de estocagem do material coletado pode interferir nos resultados da PCR. Deps et al. (2002a); Deps (2003a), estudaram tatus selvagens utilizando os *primers* que amplificam a sequência repetitiva RLEP, em amostras de tecidos congelados a -4°C . Anteriormente, Job et al. (1991), utilizaram os *primers* para o antígeno 18 kDa, e as amostras estavam fixadas em formalina a 10%. Apesar da alta positividade obtida por estes autores, segundo Fiallo et al. (1992), o melhor método de conservação e fixação de tecidos infectados pelo *M. leprae* para pesquisa de DNA é através da utilização de etanol 70%, com perda mínima na especificidade e sensibilidade, quando comparados com outros métodos.

No presente estudo, as amostras utilizadas estavam congeladas a -4°C , podendo ter sido submetidas a variações de temperatura durante o transporte até os EUA, o que pode ter sido prejudicial para a realização da técnica e talvez responsável por

alguns resultados falso-negativos. Mas mesmo que as amostras foram descongeladas e houve perda de material genético, a técnica da PCR demonstrou que os *primers* funcionaram.

Donoughue et al. (2001), relataram que apesar do DNA ser degradado rapidamente, o DNA residual pode ser detectado facilmente pela PCR utilizando *primers* que codificam as sequências repetitivas (RLEP).

Outra possível razão para o fato deste estudo ter encontrado poucas amostras positivas seria a inibição da polimerase por impurezas. O DNA pode ficar preso em agregados insolúveis e ocorrer a perda de DNA durante métodos de reprecipitação, diluição e degradação do tecido devido ao descongelamento das amostras durante o transporte (Donougue et al., 2001; Santos et al., 1993; Woods; Cole, 1989). Estes eventos podem ter ocorrido uma vez que as amostras foram processadas nos EUA, mesmo tendo sido o transporte feito por via aérea expressa.

O outro ponto da discussão é a possibilidade de ter ocorrido resultados falso-positivos nas técnicas de Biologia Molecular no presente estudo.

Resultados falso-positivos podem ocorrer durante a execução da técnica de PCR, através da contaminação das amostras. No presente estudo, dois tatus foram positivos para as 3 técnicas: de PCR, Real Time PCR e seqüenciamento. Como apresentaram positividade em vários tecidos, poderiam representar uma situação de contaminação durante a necropsia. Entretanto, considera-se que contaminação das amostras é um evento pouco possível neste estudo, uma vez que, foram utilizados lâminas descartáveis para a coleta de cada víscera e não ocorreu contato com material de pacientes com hanseníase durante a coleta ou armazenamento das amostras. Durante a execução da técnica de PCR nos EUA, foram rigorosamente obedecidas as normas de segurança do Laboratório de Biologia Molecular do NHDP (Baton Rouge – EUA).

Também, não considera-se que estes resultados positivos sejam devidos a infecção por outras micobactérias como *M. gordonae*, *M. fortuitum* e *M. avium*, já que a especificidade da técnica de PCR é alta para o *M. leprae*. Estas micobactérias

podem ser encontradas nos pulmões e nas fezes dos tatus (Dhople et al. 1992; Santos et al., 1993; Hartskeerl et al., 1989; Truman; Sanches, 1993).

A técnica da PCR é considerada de alta especificidade e sensibilidade para o *M.leprae*. No presente estudo, apesar dos poucos sinais clínicos apresentados pelos tatus, a presença do *M.leprae* foi detectada pela técnica da PCR em 4 animais. Mesmo em pacientes com hanseníase da forma PB, a presença de *M.leprae* não é detectada pelos métodos convencionais de baciloscopia e histopatologia, mas pode ser detectada pelo PCR. Santos et al. (1993; 1995), estudaram amostras de pacientes PB, e mostraram que 80% dos pacientes que apresentavam um índice bacilar negativo tiveram resultados de PCR positivos.

No presente estudo não foi realizado a técnica de PCR em amostras de sangue dos tatus, devido o aumento do orçamento do projeto e a preferência de outros tecidos para realização da técnica da PCR. Entretanto, Deps et al. (2002b), obtiveram 12% de positividade através da técnica de PCR no sangue total, sendo os resultados positivos, obtidos na leitura visual da eletroforese em gel de agarose, confirmados pela hibridização.

9.4 Aspectos epidemiológicos

A hanseníase em tatus é considerada de transmissão zoonótica e o risco para seres humanos pode estar dependente de uma variedade de fatores do hospedeiro e a susceptibilidade do indivíduo após entrar em contato com o tatu infectado (Truman et al., 1990).

Mesmo após anos de pesquisa, as origens, variações e risco aos seres humanos da hanseníase nos tatus permanecem não esclarecidos. Além do homem, os tatus são os outros únicos hospedeiros naturais do *M. leprae*. Entretanto, segundo alguns autores há uma relação direta entre a exposição dos seres humanos aos tatus e hanseníase (Thomas et al., 1987; Walsh et al., 1986; Lumpkin et al., 1983; West et al., 1988; Deps et al., 2002a).

Todos os animais positivos neste estudo eram provenientes de Alegre, onde a prevalência da hanseníase em humanos é de 1,22/10.000 no ano de 2006 (RELATÓRIO DA SESA/ES, 2007). No estudo de Deps (2003a), a maioria dos tatus capturados era proveniente da RMGV, onde a prevalência da hanseníase é de 3,98 casos por 10.000 habitantes em 2006 (RELATÓRIO DA SESA/ES, 2007).

Assim, no presente estudo, a freqüência da infecção nos tatus não coincide com a alta prevalência da hanseníase no estado do Espírito Santo, que foi de 3,69 casos por 10.000 habitantes em 2006 (RELATÓRIO DA SESA/ES, 2007).

Nos EUA, a hanseníase em seres humanos ainda existe em alguns estados onde são encontrados tatus naturalmente infectados, parecendo existir uma correlação evidente entre a prevalência da hanseníase em humanos e nos tatus. (Truman, 2005).

Entretanto, mesmo que a hanseníase esteja sendo eliminada em várias regiões do Planeta, existem algumas perguntas ainda sem resposta como:

São conhecidas todas as fontes de infecção do *M. leprae*?

Quais são as formas de penetração dos bacilos no corpo humano e como eles produzem a doença?

Sabe-se que a aquisição do *M. leprae* por um indivíduo pode ser de múltiplas formas, inclusive contato com solo ou água contaminados (Matsuoka et al., 1999). Estudos epidemiológicos e imunológicos sugerem fortemente a presença de fontes não-humanas de *M. leprae*, em áreas endêmicas de hanseníase, fontes estas ainda não bem estabelecidas, que teriam importância na transmissão da doença ao homem (Dharmendra, 1985; Van Beers et al., 1994).

Casos de indivíduos que desenvolveram hanseníase sem contato com pacientes MB conhecidos, intrigam quando os mesmos referem contato com tatus (Taylor et al., 1965; Enna et al., 1978; Joseph et al., 1985).

Segundo Fine, (1992) "nós estamos ainda abismadamente ignorantes da história natural do bacilo de hanseníase".

A origem da infecção do *M. leprae* nos tatus tem algumas explicações controversas. Os tatus poderiam ter adquirido o *M. leprae* através do solo, água, seres humanos doentes, ou através de seu alimento natural, os artrópodes e anelídios. Segundo Truman (2005), nos EUA os tatus adquirem a infecção por meios naturais e sustentam a transmissão da doença em sua comunidade.

As repercussões desta descoberta em relação ao meio ambiente, caso venha ser divulgada à população geral, poderão trazer uma diminuição do consumo e conseqüente diminuição da caça e manipulação dos tatus pelos moradores de zonas rurais do interior do estado do Espírito Santo e do Brasil.

Acredita-se que estudos em transmissão e reservatórios devam ser realizados para verificar a importância dos tatus como reservatório e fonte de infecção de *M. leprae* para os seres humanos e o meio ambiente. Os estudos com genotipagem deveriam ser realizados para verificar as origens do *M. leprae* nos tatus e se estes teriam importância no desenvolvimento de doença nos humanos. A análise populacional ampla abrangendo tatus de todo Brasil deveria ser realizada, utilizando uma metodologia semelhante a este trabalho, já que as chances de identificação do *M. leprae* aumentam quando se utilizam técnicas mais sensíveis e com boa especificidade, como o PCR dos tecidos, utilizando os *primers* que amplificam seqüências repetitivas.

A maioria dos animais do presente estudo não apresentaram infecção pelo *M. leprae*. Entretanto, as pesquisas realizadas por Dets (2002b; 2003a), e os resultados positivos obtidos no presente estudo, sugerem o conhecimento sobre a infecção pelo *M. leprae* na população de tatus do estado do Espírito Santo.

A diferença dos resultados encontrados neste estudo em relação aos encontrados por Dets (2003a), demonstra uma discrepância para a qual no momento não possuímos uma explicação, mas os achados dos 4 tatus positivos para a técnica da PCR e de 2 tatus confirmados para a técnica do sequenciamento confirmam a

presença de tatus infectados.

Ainda, nos EUA a única espécie de tatus existente é a espécie *D. novemcinctus*, mas no estado do Espírito Santo existem outras espécies que deveriam ser investigadas. Job, (2000) relatou que tatus de sete bandas (*Dasypus hybridus*) e tatus de oito bandas (*Dasypus sabanicola*) podem desenvolver a hanseníase.

A descoberta do *M. leprae* em tatus selvagens não só levantou muitos questionamentos sobre transmissão da hanseníase, mas identificou um possível risco em saúde pública (Truman et al., 1986b).

10 CONCLUSÕES

- A técnica de PCR para a pesquisa de DNA de *M. leprae*, detectou positividade em 4 (6%) tatus dos 65 tatus testados;
- Os *primers* ML1/ML2, que amplificam a sequência repetitiva RLEP, foram os mais sensíveis para detecção de *M. leprae* nos tatus pela técnica da PCR;
- As alterações morfológicas consideradas na literatura como sugestivas de hanseníase em tatus foram freqüentes, mas na maioria das vezes sem a presença do *M. leprae* detectado na técnica da PCR;
- A técnica de Real Time PCR, demonstrou ser de grande valia no estudo de hanseníase em tecidos de tatus;
- Pela técnica de sequenciamento, houve confirmação em dois tatus das seqüências repetitivas (RLEP) cópias 4 e 6;
- Estes resultados sugerem fortemente a existência de infecção natural nos tatus da espécie *Dasypus novemcinctus* do estado do Espírito Santo.

11 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Mais estudos precisam ser realizados para se estabelecer a relação entre a hanseníase nos seres humanos e a infecção nos tatus selvagens no estado do Espírito Santo e no Brasil;
- Mais pesquisas precisam ser realizadas para tentar explicar a discrepância entre os resultados encontrados neste estado anteriormente e o presente estudo, haja visto que os tatus de ambas as pesquisas foram coletados em regiões similares;
- Estudos utilizando técnicas de genotipagem seriam úteis para correlacionar a hanseníase em tatus e seres humanos.

12 REFERÊNCIAS

Anderson JM, Benirschke K. The armadillo, *Dasypus novemcinctus*, in experimental biology. Lab Animal Care. 1966, 16: 202-216.

Andersson JO, Andersson SG. Insights into the evolutionary process of genome degradation. Curr Opin Genet Dev. 1999; 9(6): 664-71.

Antunes JMAP, Dets PD, Demoner L C, Carneiro MB, Martins IVF. Relato de ocorrência de endoparasitas em tatus selvagens da espécie *Dasypus novemcinctus* (XENARTHRA, DASYPODIDAE) do estado do Espírito Santo In: III Jornada Científica UVV, Anais da III jornada Científica UVV. Vitória. 2005. v.3.

Antunes JMAP, Demoner LC, Martins IVF, Zanini MS, Dets PD, Pujol-Luz JR. Record of *Dasypus novemcinctus* (Mammalia: Xenarthra) parasited by *Tunga terasma* (Siphonaptera: Tungidae) in Alegre, State of Espírito Santo, Brazil. Rev Br Parasitol Vet. 2006; 15:206-207.

Antunes JMAP, Sanchez CZ, Martins IVF, Demoner LC, Dets PD. First report of *Sacrocystis* spp. in wild nine-banded armadillos (*Dasypus novemcinctus*) from the state of Espírito Santo, Brazil. In: XLII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Rev Soc Br Med Trop. Campos do Jordão. 2007; 40: 179.

Arruda OS, Arruda MSP, Souza LCD. Aspectos biológicos do tatu *Dasypus novemcinctus*. Salusvita. 1988; 7: 137-141.

Bagagli E, Sano A, Coelho KL, Alquati S, Miyagi M, Camargo ZP, Gomes G, Franco M, Montenegro MR. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) captured in endemic area of paracoccidioidomycosis. Am J Trop Med Hyg. 1998; 58: 505-12.

Binford CH, Storrs EE, Walsh GP. Disseminated infection in the nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*) resulting from inoculation with *M. leprae*. Int J Lepr Other Micobact Dis. 1976; 44: 80-85

Binford CH, Meyers WM, Walsh GP, Storrs EE, Brown HL. Naturally acquired leprosy-like disease in the nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*): Histopathologic and microbiologic studies of tissues. *J Reticuloend Soc.* 1977; 22: 377-388.

Bona SH, Fonseca APM, Silva ACL, Costa RJ. Bacilos álcool-ácido resistentes no *Culex fatigans*. *An Bras Dermatol.* 1985; 60: 163-170.

Boom R, Sol CJA, Salimans M, Jansen CL, Wertheim-Van Dillen PME, Van Der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol.* 1990; 28: 495-503.

Brennan PJ, Barrow WW. Evidence for species-specific lipid antigens in *Mycobacterium leprae*. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1980; 48: 382-387.

Brennan PJ, Nikaido H. The envelop of mycobacteria. *Annu Rev Biochem.* 1995; 64: 29-63.

Brett SJ, Payne SN, Gigg J, Burgess P, Gigg R. Use of synthetic glycoconjugates containing the *Mycobacterium leprae* specific and immunodominant epitope of phenolic glycolipid I in the serology of leprosy. *Clin Exp Immunol.* 1986; 64: 476-483.

Britton WJ, Lockwood DNJ. Leprosy. *The Lancet.* 2004; 363: 1209-1219.

Bruce S, Schroeder TL, Kenneth E, Howard R, Williams T, Wolf JE. Armadillo exposure and Hansen's disease: an epidemiologic survey in southern Texas. *J Am Acad Dermatol.* 2000; 43: 223-228.

Bryceson ADM. Leprosy. In: Champion RH, Burton JL, Ebling FLG. *Textbook of Dermatology*. 5th Edition. Blackwell Scientific Publications. 1992. p.1065-1083.

Buchanan TM, Dissanayake S, Young DB, Miller RA, Acedo JR, Harnisch JP, Khanolkar SR, Estrada-Parra S. Evaluation of the significance of antibodies to

PGL-I of *Mycobacterium leprae* in leprosy patients and their contacts. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1983; 51: 658-659.

Bührer-Sékula S, Smits HL, Gussenhoven GC, Inger CWV, Klatser PR. A simple dipstick assay for the detection of antibodies to phenolic glycolipid-I of *Mycobacterium leprae*. *Am J Trop Med Hyg.* 1998; 58: 133-136.

Bührer-Sékula S, Jansen P, Hatta M, Oskan L, Faber WR, Klatser PR. Specificity of PGL-I semi-synthetic antigens in leprosy serology. In: 16th International Leprosy Congress, Salvador. 2002; p.246.

Bührer-Sékula S, Smits HL, Gussenhoven GC, Leeuwen JV, Amador RS, Fujiwara RA T, Klatser PR, Oskan L. Simple And Fast Lateral Flow Test For Classification of Leprosy Patients and Identification of Contacts With High Risk of Developing Leprosy. *J Clin Microbiol.* 2003; 41:1991-1995.

Bührer-Sékula S, Visschedijk J, Grossi MA, Dhakal KP, Namadi AU, Klatser PR, Oskan L. The ML flow test as a point of care test for leprosy control programmes: potential effects on classification of leprosy patients. 2007; 78(1): 70-9.

Cellona RV, Walsh GP, Fajardo TT, Abalos RM, Cruz EC, Villahermosa LG, Felicio-Balagon MV, Steenberg GJ, Douglas J. Cross-Sectional assessment of ELISA reactivity in leprosy patients, contacts, and normal population using the semisynthetic antigen natural disaccharide octyl bovine serum albumin (ND-O-BSA) in Cebu, The Philippines. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1993; 61: 192-198.

Chanteau S, Cartel JL, Roux J, Plichart R, Bach MA. Seroepidemiological study on 724 household contacts of leprosy patients in French Polynesia using disaccharide-octyl-BSA as antigen. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1988; 55: 626-632.

Chehl S, Job CK, Hastings RC. Transmission of leprosy in nude mice. *Am J Trop Med Hyg.* 1985; 34: 1161-1166.

Chemouilli P, Woods S, Sais G, Cole ST. Detection of *Mycobacterium leprae* in nerve lesions by the polymerase chain reaction. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1996; 64: 1-5.

Cho SN, Kim SH, Celloma RV, Chan GP, Fajardo TT, Walsh GP, Kim JD. Prevalence of IgM antibodies to phenolic glycolipid I among household contacts and controls in Korea and the Philippines. *Lepr Rev.* 1992; 63: 12-20.

Cho SN, Cellona RV, Villahermosa LG, et al. Detection of phenolic glycolipid I of *Mycobacterium leprae* in sera from leprosy patients before and after start of multidrug therapy. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001; 8: 138-142.

Clark-Curtiss JE, Docherty MA. A species-specific sequence in *Mycobacterium leprae* DNA. *J Infect Dis.* 1989; 159: 7-15.

Clements B, Scollard DM. Leprosy. In G L Mandell and R. Fekety (ed), *Atlas of infectious diseases. Current Medicine*, Philadelphia, Pa, 1996.

Coelho AAM, Gontijo Filho PP, Fonseca LS, Silva MG, Costa HC. Micobactérias isoladas de tatus *Dasypus novemcinctus* inoculados com *Mycobacterium leprae*. *Hansen Int.* 1988; 13: 4246.

Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature.* 2001a; 409: 1007-1011.

Cole ST, Supply P, Honoré N. Repetitive sequences in *Mycobacterium leprae* and their impact on genome plasticity. *Lepr Rev.* 2001b; 72: 449-461.

Convit J, Aranzazu N, Pinardi ME. Leprosy in the armadillo. Clinical and pathological aspects. PAHO Scientific Publication. 1978; 366: 41-46.

Daffe M, McNeil M, Brennan PJ. Major structural features of the cell wall arabinogalactans of *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, and *Nocardia* spp. *Carbohydr Res*. 1993; 249: 383:398.

De Wit MYL, Faber WR, Krieg SR, Douglas JT, Lucas SB, Montreewasuwat N, Pattyn SR, Hussain R, Ponnighaus JM, Hartskeerl RA, Klatser PR. Application of a polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae* in skin tissues. *J Clin Microbiol*. 1991; 29: 906-910.

De Wit MYL, Douglas JT, McFadden J, Klatser PR. Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium leprae* in nasal swab specimens. *J Clin Microbiol*. 1993; 31: 502-506.

Deps PD. Como o *Mycobacterium leprae* é transmitido? *Hans Int*. 2001; 21: 31-36.

Deps PD, Faria LV, Silva DA, Ventura CG, Gonçalves V, Zandonade E. Epidemiological assessment of the leprosy transmission and armadillo's meat consumption. In: 16th International Leprosy Congress, Book of Abstract. Salvador 2002a. p.193.

Deps PD, Santos AR, Tomimori-Yamashita J. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA by PCR in blood sample from nine-banded armadillo: preliminary results (letter). *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 2002b; 70: 34-35.

Deps PD. Pesquisa de *M. leprae* em tatus da espécie *Dasypus novemcinctus* do estado do Espírito Santo. (Tese de Doutorado). São Paulo, Universidade Federal de São Paulo, 2003a.

Deps PD et al. Epidemiological features of the leprosy transmission in relation to armadillo exposure. *Hansen Int*. 2003b; 28: 138-144.

Deps PD, Camargo PZ, Santos AR, Tomimori-Yamashita J. Pesquisa de *Mycobacterium leprae* em tatus selvagens utilizando o teste de fluxo lateral-ML

Flow. In: XL Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Rev Soc Br Med Trop. 2004. p56.

Deps PD, Antunes JMAP, Tomimori-Yamashita J. Detection of *Mycobacterium leprae* infection in wild nine-banded armadillos (*Dasypus novemcinctus*) using the rapid ML Flow test. Rev Soc Br Med Trop. 2007; 40: 86-87.

Dharmendra. Epidemiology of leprosy in relation to control (WHO Technical Report Series nº716 of 1985). Indian J Lepr. 1985; 57: 699-715.

Donham KJ, Leininger JR. Spontaneous leprosy-like disease in a chimpanzee. J Infect Dis. 1977; 136: 132-136.

Donoghue HD, Holton J, Spilgeman M. PCR primers that can detect low levels of *Mycobacterium leprae* DNA. J Med Microbiol. 2001; 50: 177-182.

Dhople AM, Storrs EE, Lamoureux LC. Isolation of cultivable mycobacteria from feces and lungs of armadillos infected with *Mycobacterium leprae*. Int J Lepr Other Mycobact Dis. 1992; 60: 244-249.

Douglas JT, Celloma RV, Abalos RM, Madarang MG, Fajardo T. Serological reactivity and early detection of leprosy among contacts of lepromatous patients in Cebu. The Philippines. Int J Lepr Other Mycobact Dis. 1987; 55: 718-721.

Dungal N. Is leprosy transmitted by insect? Lepr Rev. 1960; 31: 25-34.

Dungal N. Is leprosy transmitted by arthropods? Lepr Rev. 1961; 32: 28-35.

Drapper P, Kandler O, Darbre A. Peptidoglycan and arabinogalactan of *Mycobacterium leprae*. J Gen Microbiol. 1987; 133: 1187-1194.

Eggelte TA, van Rens MM, de Wit MYL, Klatser PR. Use of synthetic antigens in the serodiagnosis of leprosy infection in armadillos. Quaderni di cooperazione sanitaria – Health cooperation papers. 1988; 7: 65-72.

Eisenach KD, Cave MD, Bates JH, Crawford JT. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis*. 1990; 161: 977-981.

Enna CD, Jacobson RR, Trautman Jr, Stutdivant M. Leprosy in the United States (1967-1976). *Public Health Rep*. 1978; 93: 468-473.

Fernandes G, Deps PD, Tomimori Yamashita J, Camargo ZP. IgM and IgG antibody response to *Paracoccidioides brasiliensis* in naturally infected wild armadillos (*Dasypus novemcinctus*). *Med Mycol*. 2004; 42(4): 363-368.

Fiallo P, Williams DL, Chan GP, Gillis TP. Effects of fixation on polymerase chain reaction detection of *Mycobacterium leprae*. *J Clin Microbiol*. 1992; 30: 3095-3098.

Filice GA, Greenberg RN, Fraser DW. Lack of observed association between armadillo contact and leprosy in humans. *Am J Trop Med Hyg*. 1977; 26: 137-139.

Fine PEM. Reflections on the Elimination of Leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1992; 60: 71-80.

Fine PEM. Leprosy: what is being "eliminated"? *Bulletin of the World Health Organization*. 2007; 85(1): 1-84.

Fournier-Chambrillon C, Vogel I, Fournier P, Thoisy B, Vie JC. Immobilization of free ranging nine-banded and great long-nosed armadillos with three anesthetic combinations. *JWD*. 2000; 36(1): 131-140.

Folse DS, Smith JH. Leprosy in wild armadillos *Dasypus novemcinctus* on the Texas Gulf coast USA anatomic pathology. *J Reticuloendothel Soc*. 1983; 34: 341-358.

Freiberger HG, Fudenberg H. An appetite for armadillo. *Hospital Practice*. 1981; 16: 137.

Fujiwara T, Hunter SW, Cho S-N, Aspinall GO, Brennan PJ. Chemical synthesis and serology of disaccharides and trisaccharides of phenolic glycolipid antigens from the leprosy bacillus and preparation of disaccharide protein conjugate for serodiagnosis of leprosy. *Infect Immun*. 1984; 43: 245-252.

Fujiwara T, Aspinall GO, Hunter SW, Brennan PJ. Chemical synthesis of the trisaccharide unit of the species-specific phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae*. *Carbohydr Res*. 1987; 163: 41-52.

Garbino JA, Virmond M, Almeida JA. A técnica de estudo de condução nervosa no tatu. *Hansen Int*. 1996; 21: 5-9.

Gillis PT, Williams DL. Polymerase chain reaction and leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1991; 59: 311-316.

Gormus BJ, Ohashi DK, Ohsawa S, Walsh GP, Meyers WM, Brennan PJ, Trygg C. Serologic responses to *Mycobacterium leprae*-specific phenolic glycolipid-I antigen in sooty mangabey monkeys with experimental leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1988; 56: 537-545.

Goulart IMB, Cardoso AM, Santos MS, Gonçalves MA, Pereira JE, Goulart LR. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin lesions of leprosy patients by PCR may be affected by amplicon size. *Arch Dermatol Res*. 2007; 299(5-6): 267-271.

Grosskinsky CM, Jacobs Jr WR, Clark-Curtiss JE, Bloom BR. Genetic relationships among *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, and candidate leprosy vaccine strains determined by DNA hybridization: identification of an *M. leprae*-specific repetitive sequence. *Infect Immun*. 1989; 57(5): 1535-1541.

Gupta CM, Tutakne MA, Tiwari VD, Chakrabarty N. Inoculation leprosy subsequent to a dog bite. a case report. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1984; 56: 919-920.

Gutteriez C, Brisse MC, Brosch S, Fabre R, Omais MM, Marmiesse B, Supply P, Vicent V. Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. *PloS Pathol.* 2005; 1 (1); 1-5.

Hackel C, Houard S, Portaels F, van Elsen A, Herzog A, Bollen A. Species identification of *Mycobacterium leprae* by the polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes.* 1990; 4: 205-210.

Hartskeerl RA, De Wit MYL, Klatser PR. Polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae*. *J Gen Microbiol.* 1989; 135: 2357-2364.

Harboe M. Radioimmunoassay and other serologic tests and their application in epidemiological work (Symposium of the Epidemiology of Leprosy, Geilo, Norway, 1981). *Lepr Rev.* 1981: 275S-288S.

Hatta M, van Beers SM, Madjib B, Djumadi A, de Wit MY, Klatser PR. Distribution and persistence of *Mycobacterium leprae* nasal carriage among a population in which leprosy is endemic in Indonesia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1995; 89: 381-385.

Hunter SW, Brennan PJ. A novel phenolic glycolipid from *M. leprae* possibly involved in immunogenicity and pathogenicity. *J Bacteriology.* 1981; 147: 728-35.

Hunter SW, Fujiwara T, Brennan PJ. Structure and antigenicity of the major specific glycolipid antigen of *Mycobacterium leprae*. *J Biol Chem.* 1982; 257: 15072-15078.

Job CK, Kirchheimer WF, Sanchez RM. Variable lepromin response to *Mycobacterium leprae* in resistant armadillos. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1983; 51: 347-353.

Job CK, Harris EB, Allen JL, Hastings RC. A possible mode of transmission of armadillo leprosy in the wild and a simple method to conduct a random survey of it's prevalence. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1985a; 53: 723.

Job CK, Sanchez RM, Hastings R.C. Manifestations of experimental leprosy in the armadillo. *Am J Trop Med Hyg.* 1985b; 34: 151-161.

Job CK, Harris, Alen JL, Hastings RC. Torns in armadillo ears and noses and their role in the transmission of leprosy. *Arch Pathol Lab Med.* 1986; 110: 1025-8.

Job CK, Drain V, Williams DL, Gillis TP, Truman RW, Sanchez RM, Deming AT, Hastings RC. Comparison of polymerase chain reaction technique with other methods for detection of *Mycobacterium leprae* in tissues of wild nine-banded armadillos. *Lepr Rev.* 1991; 62: 362-373.

Job CK, Drain V, Truman R, Deming AT, Sanchez RM, Hastings RC. The pathogenesis of leprosy in the nine-banded armadillo and the significance of IgM antibodies to PGL-I. *Indian J Lepr.* 1992; 64: 137-151.

Job CK, 2000. Developments in experimental leprosy. *Indian J Lepr.* 72(1): 145-154.

Joseph BZ, Yoder LJ, Jacobson RR. Hansens disease in native-born citizens of the United States. *Public Health Rep.* 1985; 100: 666-671.

Kampirapap K, Singtham N, Klatser P, Wiriyawipart S. DNA amplification for the detection of leprosy and assessment of efficacy of leprosy chemotherapy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1998; 66: 16-21.

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*. *Experimental Dermatology.* 2003; 28: 429-424.

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

Kazda J, Ganapati R, Revankar C, Buchanan TM, Young DB, Irgens L. Isolation of environment-derived *Mycobacterium leprae* from soil in Bombay. *Lepr Rev.* 1986; 57: 201-208.

Kerr-Pontes LR, Barreto ML, Evangelista CM, Rodrigues LC, Heukelbach J, Feldmeier H. Socioeconomic, environmental, and behavioral risk factors for leprosy in North-east Brazil: results of a case-control study. *Int J Epidemiol.* 2006; 35(4): 994-1000.

Kirchheimer WF, Storrs EE. Attempts to establish the armadillo (*Dasypus novemcinctus*) as a model for the study of leprosy. I. Report of lepromatoid leprosy in an experimentally infected armadillo. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1971; 39: 693-702.

Kirchheimer WF. Carville Hospital researchers find no sign of mycobacteriosis in 141 feral armadillos studied. *Pub Hlth Repts.* 1976; 91: 481.

Kirchheimer WF. The armadillo as a leprosy model and leprosy armadillos in the wild. *Leprosy Scientific Memoranda.* 1977a; L-884.

Kirchheimer WF. Occurrence of *Mycobacterium leprae* in nature. *Leprosy in India.* 1977b; 49:44.

Kirchheimer WF, Sanchez RM. Intraspecies differences of resistance against leprosy in nine-banded armadillos. *Lepr India.* 1981; 53:525-530.

Klatser PR. Serology of leprosy. *Trop Geograph Med.* 1994; 46: 59-62.

Klingmuller V. "Ergebnisse der Lepraforschung seit 1930". Berlin. 1938.

Kogan SC, Doherty M, Gitschier J. An improved for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences. Application to hemophilia A. *New Engl J Med.* 1987; 317: 985-990.

Kolk AHJ, Schuitema ARJ, Kuijper S, van Leeuwen J, Hermans PWM, van Embden JDA, Hartskeerl RA. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by using polymerase chain reaction and a nonradioactive detection system. *J Clin Microbiol.* 1992; 30: 2567-2575.

Kox LFF, Rhienthong D, Medo A, Udomsantisuk N, Ellis K, van Leeuwen J, van Heusden S, Kuijper S, Kolk AHJ. A more reliable PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *J Clin Microbiol.* 1994; 32: 672-678.

Kyu SL, Oh KY, Ryoo YW, Min HS. Detection of *Mycobacterium leprae* in tissue and blood by polymerase chain reaction. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1994: 139-140.

Kwok S, Higushi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature.* 1989; 339: 237-238.

Lainson R, Shaw JJ, Fraha H, Miles MA, Draper CC. Chagas's disease in the Amazon basin: *Trypanosoma cruzi* infections in silvatic mammals, triatomine bugs and man in the state of Pará, north Brazil. *Trans Royal Trop Med Hyg.* 1979, 73: 193-204.

Lane JE, Walsh Ds, Meyers WM, Klassen-Fischer MK, Kent DE, Cohen DJ. Borderline tuberculoid leprosy in a woman from the state of Georgia with armadillo exposure. *J Am Acad Dermatol.* 2006; 55(4): 714-716.

Lavania M, Katoch K, Sachan P, Dubey A, Kapoor S, Kashyap M, Chauhan DS, Singh HB, Sharma VD, Jadhav RS, Katoch VM. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA from soil samples by PCR targeting RLEP sequences. *J Commun Dis.* 2006; 38(3): 269-73.

Lechat MF. The source of infection: an unsolved issue (Symposium paper). Indian J Lepr. 2000; 72: 169-173.

Lee KS, Youl OK, Wok RY, Suh MH. Detection of *Mycobacterium leprae* in tissue and blood by polymerase chain reaction (Letter). Int J Lepr Other Mycobact Dis. 1994; 62: 139-140.

Lindsay DS, McKown R, Upton SJ, McAllister CT, Tolvio-Kinnucan MA, Veatch JK, Blagburn BL. Prevalence and identity of *Sarcocystis* infections in armadillos (*Dasypus novemcinctus*). J Parasitol. 1996; 82: 518-520.

Linnaeus C. Systema naturae per regnatria naturae, secundum classes, ordines, genera, species cum characteribus, differiintus, synamynis, loris. 12 ed. Stockholm, Laurentii Salvii, 1766. p.532.

Lockwood DNJ, Suneetha S. Leprosy: too complex a disease for a simple elimination paradigm. Bull.W.H.O. 2005; 83: 230:235.

Lobel LWM. Lepra bubalorum (reprinted and condensed). Int J Lepr Other Mycobact Dis. 1936; 4: 79-96.

Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. Gene. 1990; 93: 125-128.

Lopes, RJ. Hanseníase surgiu na África, sugere DNA. Folha de São Paulo, São Paulo, p.14, 13 maio. 2005.

Loughry WJ, McDonough CM. Spatial patterns in a population of nine-banded armadillos (*Dasypus novemcinctus*). Amer Mid Natural. 1998; 140: 161-169.

Lumpkin LR 3rd, Cox GF, Wolf JE. Leprosy in five armadillo's handlers. J Am Acad Dermatol. 1983; 9: 899-901.

Lumpkin LR 3rd, Cox GF, Wolf JE Jr. Leprosy in armadillos handlers. *J Am Acad Dermatol*. 1984; 10: 1073.

Machicao N, La Placa E. Lepra-like granulomas in frogs. *Lab Invest*. 1954; 3: 219-227.

Marchoux E. Un cas d'inoculation du bacille de Hansen en pays non lépreux. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1934; 2:1-7.

Martinez AR, Resoagli EH, De Millan SG, Resoagli JP, Ramirez MM, Cicuta ME, De Rott MIO, Sandoval A. Lepra salvaje en *D. novemcinctus* (Linneo 1758). *Arch Argent Dermatol*. 1984; 34: 21-30.

Martinez AN, Britto CFPC, Nery JAC, Sampaio EP, Jardim MR, Sarno EN, Moraes MO. Evaluation of real-time and conventional PCR targeting complex 85 genes for detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin biopsy samples from patients diagnosed with leprosy. *J Clin Microbiol*. 2006; 44: 3154–3159.

McDonough CM, McPhee SA, Loughry WJ. Growth rates of juvenile nine-banded armadillos. *Southwestern Naturalist* . 1998; 43: 462-468.

Matsuoka M, Izumi S, Budlawan T, Nakata N, Saeki K. *Mycobacterium leprae* DNA in daily using water as a possible source of leprosy infection. *Indian J Lepr*. 1999; 71:61-67.

Meima A, Smith WC, van Oortmarssen, Richardus JH, Habbema, JD. The future incidence of leprosy: a scenario analysis. *Bull.W.H.O*. 2004; 82: 373-380.

Meyers WM, Walsh GP, Binford CH, Storrs EE, Brown HL. Indigenous leprosy in nine-banded armadillos. The armadillo as an experimental model in biomedical research. PAHO Scientific Publication. 1978; 366: 67-76.

Meyers WM, Gormus BJ, Walsh GP. Nonhuman Sources of Leprosy. *IntJ Lepr Other Mycobact Dis*. 1993; 60: 477-480.

Meyers WM. Leprosy. In: Guerrant RL, Walker DH, Weller PF. Tropical Infectious Diseases: Principles, Pathogens & Practice. 1st ed. Churchill Livingstone, Philadelphia, 1999. 474-485.

Ministério da Saúde, 2006. Disponível em: <[http:// www.saude.gov.br](http://www.saude.gov.br)> acesso em: 28 dezembro de 2006.

Misra N, Ramesh V, Misra R, Panagadan N, Narayan S, Colston MJ, Nath I. Clinical utility of LSR/A15 gene for Mycobacterium leprae detection in leprosy detection tissues using the polymerase chain reaction. Int J Lepr Other Mycobact Dis. 1995; 63: 35- 41.

Monot M, Honore N, Garnier T, Araoz R, Coppee JY, Lacroix C, Sow S, Spencer JS, Truman RW, Williams DL, Gelber R, Virmond M, Flageul B, Cho SN, Ji B, Paniz-Mondolfi A, Convit J, Young S, Fine PE, Rasolofo V, Brenan PJ, Cole ST. On the origin of leprosy. Science. 2005; 308(5724): 1040-1042.

Naiff RD, Ferreira LCL, Barret TV, Naiff MF, Arias JR. Paracoccidioidomicose enzoótica em tatus (D.Novencinctus) no estado do Pará. Rev Inst Med Trop. São Paulo. 1986; 28: 19-27.

Narayanan E, Manja KS, Bedi BMS, Kirchheimer WF, Balasubrahmanyam M. Arthropod feeding experiments in lepromatous leprosy. Lepr Rev. 1972; 43: 188-193.

Neill MA, Hightower AW, Broome CV. Leprosy in the United States, 1971-1981. J Infec Dis. 1985; 152: 1064-1069.

Ng V, Zanazzi R, Timpl R, Talts J, Salzer JL, Brennan PJ, Rambukkana A. Role of the wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of Mycobacterium leprae. Cell. 2000; 103: 511-529.

Noordeen S.K. Epidemiology of leprosy. In Hastings RC, Opromolla DVA. Leprosy. Churchill Livingstone, 2th ed. 1994. 29-48.

Opromolla DVA, Arruda OS, Fleury RN. Manutenção de tatus em cativeiro e resultados de inoculação do *Mycobacterium leprae*. Hansen Int. 1980; 5: 28-36.

Paige CF, Scholl DT, Truman RW. Prevalence and incidence density of *Mycobacterium leprae* and *Trypanosoma cruzi* infections within a population of wild nine-banded armadillos. Am J Trop Med Hyg. 2002; 67(5): 528-532.

Pattyn SR, Ursi D, Ieven M, Grillone S, Raes V. Detection of *Mycobacterium leprae* by the polymerase chain reaction in nasal swabs of leprosy patients and their contacts. Int J Lepr Other Mycobact Dis. 1993; 61: 389-393.

Pedley JC. The presence of *M. leprae* in human milk. Lepr Rev. 1967; 38: 239-242.

Pereira Júnior HRJ, Jorge W, Bagagli E. Por que tatu. Ciência hoje. 2004; 34(1990): 70-73.

Persing DH. Polymerase chain reaction: trenches to benches. J Clin Microbiol. 1991; 29: 1281-1285.

Plikaytis BB, Gelber RH, Shinnick TM. Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium leprae* using a nested-primer gene amplification assay. J Clin Microbiol. 1990; 28: 1913-1917.

Porritt RJ, Olsen RE. Two simultaneous cases of leprosy developing in tattoos. Lepr Rev. 1948; 20: 106-111.

Ramaprasad P, Fernando A, Madhale S, et al. Transmission and protection in leprosy: indications of the role of mucosal immunity. Lepr Rev. 1997; 68: 301-315.

Rastogi N, Goh KS, Berchel M. Species-specific identification of *Mycobacterium leprae* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene. J Clin Microbiol. 1999; 37: 2016-2019.

Rees RJW. Enhanced susceptibility of thymectomised and irradiated mice infection with *Mycobacterium leprae*. *Nature*. 1966; 211: 657-658.

Rees RJW, McDougall AC. Airborne infection with *Mycobacterium leprae* in mice. *J Med Microbiol*. 1977; 10(1): 63-68.

Rees RJW, Young DB. The microbiology of leprosy. In: *Leprosy*. Hastings RC, Opromolla DVA. 2nd ed. Edinburg:Churchill Livingstone; 1994; 49-86.

Relatório da SESA/ES (Secretaria de Estado da Saúde). Governo do Estado do Espírito Santo. Programa de Controle e Eliminação da Hanseníase. Hanseníase. Dados Epidemiológicos, 2006.

Resoagli EH, Martinez AR, Millan SG, Resoagli JP. Nueva comunicación de mycobacteriosis natural en el armadillo *Dasypus novemcinctus*. XIV Jornadas Argentinas de Leprologia – Resistencia (Chaco), 1981.

Roche PW, Britton WJ, Failbus SS, Ludwig H, Theuvenet WJ, Adiga RB. Heterogeneity of serological responses in paucibacillary leprosy—differential responses to protein and carbohydrate antigens and correlation with clinical parameters. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1990; 58: 319-327.

Roche PW, Britton WJ, Neupane KD, Failbus SS, Cho SN, Theuvenet WJ. The response to chemotherapy of serum *Mycobacterium leprae*-specific antigen in multibacillary leprosy patients. *Am J Trop Med Hyg*. 1991; 44: 702-708.

Rodrigues S, Beraco E, Koizumi F, Alchorne MMA. Tatu e hanseníase. *An Bras Dermatol*. 1993; 68: 340-345.

Roth EE, Greer B, Moore M. Serologic analysis of two related leprotopiral serotypes isolated in Louisiana. *Zoonoses Res*. 1964; 3: 31-38.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HÁ, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985; 230: 1350-1354.

Salem JI, Fonseca OJM. BAAR na água do Lago Aleixo. *Hansen Int*. 1982; 7: 25-35.

Santos AR, De Miranda AB, Sarno EN, Suffys PN, Degrave WM. Use of PCR-mediated amplification of *Mycobacterium leprae* DNA in different types of clinical samples for the diagnosis of leprosy. *J Med Microbiol*. 1993; 39: 298-304.

Santos AR, Goes Filho JT, Nery JAC, Duppre NC, Gallo MEN, Suffys PN, Degrave WM. Evaluation of PCR mediated DNA amplification in non-invasive biological specimens for subclinical detection of *Mycobacterium leprae*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1995; 11: 113-120.

Scholl DA, Truman RW, Hugh-Jones M. Simulation of naturally occurring leprosy transmission in free-living armadillo populations. *J Comput Med*. 1996; 2: 1405-1416.

Scollard DM, Lathrop GW, Truman RW. Infection of distal peripheral nerves by *M. leprae* in infected armadillos; an experimental model of nerve involvement in leprosy. *Int J Lepr Other Mycobacterial Dis*. 1996; 64: 146-151.

Shepard CC. The experimental disease that follows the injection of human bacilli into footpads of mice. *J Exp Med*. 1960; 112: 445-454.

Shepard CC, Mc Rae DH. A method for counting acid fast bacteria. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1968; 36(1): 78-82.

Schollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev*. 2006: 338-381.

Shibata DK, Arnheim N, Martin WJ. Detection of human papilloma virus in paraffin-embedded tissue using the polymerase chain reaction. *J Exp Med*. 1988; 167: 225-230.

Skinsnes OK. Leprosy in wild armadillos (Editorial). *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1976; 44: 376.

Smith JH, Folse DS, Long EG, Christie JD, Crowe DT, Tewes ME, Watson AM, Eberhardt RL, File SK, Kelly MT. Leprosy in wild armadillos (*Dasypus novemcinctus*) of the Texas gulf coast: epidemiology and micobacteriology. *J Reticuloendothel Soc*. 1983; 34: 75-88.

Smith LL, Dougherty RW. The amazing armadillo: geography of a folk critter. University of Texas Press, Austin. 1984: 1-134.

Souza-Araújo H. Poderá o carrapato transmitir a lepra? *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1941; 36: 577-584.

Storner GL, Belehu A, Nsibambi J, Wardorff J. Bordeline tuberculoid leprosy following BCG vaccination. A case report. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1981; 49: 16-20.

Storrs EE. The nine-banded armadillo: a model for leprosy and other biomedical research. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1971; 39: 703-714.

Talhari S, Neves RG. Introdução, agente etiológico, transmissão, cultura, inoculação, aspectos laboratoriais, patogenia e classificação. In: Talhari S, Neves RG. *Dermatologia Tropical*. Manaus. Gráfica Tropical. 3a ed. 1997. p.1-3.

Talmage RV, Buchanan CD. The armadillo (*Dasypus novemcinctus*). A review of its natural history, ecology, anatomy and reproductive physiology. The Rice Institute Pamphlet. Monograph in Biology. 1954; XLI: 1-135.

Taylor CE, Elliston EP, Gideon H. Asymptomatic infections in leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1965; 33: 716-731.

Thomas DA, Mines JS, Mack TM, Thomas DC, Rea TH. Armadillo exposure among Mexican-born patients with lepromatous leprosy. *J Infect Dis.* 1987; 156: 990-993.

Truman RW, Morales MJ, Shannon EJ, Hastings RC. Evaluation of monitoring antibodies to PGL-I in armadillos experimentally infected with *M. leprae*. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1986a; 54: 556-559.

Truman RW, Shannon EJ, Hugh-Jones ME, Hagstad HV, Wolf A, Hastings RC. Evaluation of the origin of *M. leprae* infections in wild armadillos (*Dasypus novencinctus*). *Am J Trop Med Hyg.* 1986b; 35: 588-593.

Truman RW, Kumaresan JA, McDonough MC, Job CK, Hastings RC. Seasonal and spatial trends in the detectability of leprosy in wild armadillos. *Epidemiol Infect.* 1991; 106: 549-560.

Truman RW, Sanchez RM. Armadillos: Models for leprosy. *Lab Animal.* 1993; 22: 28-32.

Truman RW, Leprosy in wild armadillos, 2005. *Lepr Rev.* 76(3): 198-208.

Van Beers SM, Izumi S, Madjid B, Maeda Y, Day R, Klatser PR. An epidemiological study of leprosy infection by serology and polymerase chain reaction. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1994; 62: 1-9.

Visa VD, Brennan PJ. The genome of *Mycobacterium leprae*: a minimal mycobacterial gene set. *Genome Biol.* 2001; 2: 1023.

Walsh GP, Storrs EE, Burchfield HP, Vidrine MF, Binford CH. Leprosy-like disease occurring naturally in armadillos. *J Reticulendothel Soc.* 1975; 18: 347-351.

Walsh GP. Experimental leprosy in the nine-banded armadillo: the armadillo as an experimental model in biomedical research. PAHO Scientific Publication. 1978; 366: 57-61.

Walsh GP, Meyers WM, Binford CH, Gerome PJ, Wolf RH, Leininger JR. Leprosy - a zoonosis. *Lepr Rev.* 1981; 52: 77-83.

Walsh GP, Meyers WM, Binford CH. Naturally acquired leprosy in the nine-banded armadillo: a decade of experience 1975-1985. *J Leuc Biol.* 1986; 40: 645-656.

Warndorff DK, Glyn JR, Fine PEM, Jamil S, De Wit ML, Munthali MM, Stoker NG, Klatser PR. Polymerase chain reaction of nasal swabs from tuberculosis patients and their contacts. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1996; 64: 404-408.

Weiser RS. Natural leprosy like diseases in armadillos: a boon to leprosy research. *J Reticuloendothel Soc.* 1975; 18: 315-316.

West BC, Todd JR, Lary CH. Leprosy in six isolated residents of northern Louisiana. *Arch Internal Med.* 1988; 148: 1987-1992.

WHO. Leprosy global situation, 2007. *Wkly Epidemiol Rec.* 82: 225-232.

Withchiwechkan J, Karnjan S, Shuntawuttisetee S, Sornprasit C, Kampirapap K, Peerapakorn S. Detection of *Mycobacterium leprae* infection by PCR. *J Clin Microbiol.* 1995; 33: 45-49.

Williams DL, Gillis TP, Booth RJ, Looker D, Watson JD. The use of a specific DNA probe and polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae*. *J Infect Dis.* 1990; 162: 193-200.

Williams DL, Gillis TP, Fiallo P, Job CK, Gelber RH, Hill C, Izumi S. Detection of *Mycobacterium leprae* and the potencial for monitoring antileprosy drug therapy directly from skin biopsies by PCR. *Mol Cell Probes.* 1992; 6: 401-410.

Wilson SM, McNervey R, Ney PM, Godfrey-Faussett PD, Stoker NG, Volter A. Progress toward a simplified polymerase chain reaction and its application to diagnosis of tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 1993; 31: 776-782.

Woods SA, Cole ST. A rapid method for the detection of potential viable *Mycobacterium leprae* in human biopsies: a novel application of PCR. *FEMS Microbiology Letters.* 1989; 65: 305-310.

Woods SA, Cole ST. A family of dispersed repeats in *Mycobacterium leprae*. *Mol Microbiol.* 1990; 4(10): 1745-1751.

Wu Q, Ye G, Li X. Serological activity of natural disaccharide octyl bovine serum albumin (ND-O-BSA) in sera from patients with leprosy, tuberculosis and normal controls. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1988; 56: 50-55.

Yasuyuki S, Masamichi K, Minoru N, Shutaku K, Norisha I, Hiroshi N. Suitability of a skin-smear examination needle for leprosy screening by PCR. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1992; 60: 658-659.

Yoon K-H, Cho S-N, Lee M-K, Abalos RM, Celloma RV, Fajardo Jr TT, Guido LS, Dela Cruz EZ, Walsh GP, Kim J-D. Evaluation of polymerase chain reaction amplification of *Mycobacterium leprae*-specific repetitive sequence in biopsy specimens from patients. *J Clin Microbiol.* 1993; 31: 895-899.

Young BY, Khanolkar SR, Barg LL, Buchanan TM. Generation and characterization of monoclonal antibodies to the phenolic glycolipid of *Mycobacterium leprae*. *Infect Immun.* 1984; 43: 183-188.

Zumarraga MJ, Resoagli EH, Cicuta ME, Martinez AR, Rott MIO, Millan SG, Caimi K, Gioffre A, Alito A, Bigi F, Cataldi AA, Romano MI. PCR- restriction fragment length polymorphism analysis (PRA) of *Mycobacterium leprae* from human lepromas and from a natural case of an armadillo of Corrientes, Argentina. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 2001; 60: 21-25.

13 Anexos

Licença do IBAMA



INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS
GERÊNCIA EXECUTIVA NO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO
LICENÇA PARA CAPTURA / PESQUISA/ TRANSPORTE/RESGATE/ EXPOSIÇÃO/ FILMAGEM

NÚMERO LICENÇA 48/05-NUFAUNA	Nº REGISTRO NO IBAMA	PERÍODO DE VALIDADE 20.09.05 a 20.09.06	Documento IBAMA 02009.000553/00-45
---------------------------------	----------------------	--	---------------------------------------

OBJETO:

☒ CAPTURA E/OU COLETA DE ANIMAIS SILVESTRES/MATERIAL ZOOLOGICO	☐ FAVORECIDO: COMERCIANTE
☒ TRANSPORTE DE ANIMAIS SILVESTRES/MATERIAL ZOOLOGICO	☐ INSTITUIÇÃO CIENTÍFICA
☐ COLETA E TRANSPORTE DE MAT.BOTANICO (PESQUISA CIENTÍFICA)	☒ PESQUISADOR
☐ TRANSPORTE DE PRODUTOS E SUB-PRODUTOS DA FAUNA	☐ CRIAD. CONSERVACIONISTA
☐ EXPOSIÇÃO E/OU CONCURSO DE ANIMAIS SILVESTRES	☐ CRIADOURO COMERCIAL
☐ RESGATE DE FAUNA	☐ CRIAD. DE PASSERIFORMES
	☐ OUTROS

FAVORECIDO: **Patricia Duarte Deps**

ENDEREÇO: **Av. N.º. S.º. dos Navegantes, 1801, sala 707 – Enseada do Suá – Vitória/ES**

RESPONSÁVEL: **Patricia Duarte Deps, Marcos Santos Zanini e João Marcelo Azevedo de Paula Antunes**

MEIO DE TRANSPORTE: **Rodoviário**

TRANSPORTADOR: **FUNASA/UFES**

PROCEDÊNCIA/LOCAL: **Estado do Espírito Santo**

DESTINO: **Núcleo de Doenças Infecciosas do Centro Biomédico da UFES**

QUANTIDADE	NOME CIENTIFICO	NOME COMUM
60	Dasyatis novemcinctus	tatu-galinha

OBSERVAÇÕES: Os animais capturados deverão ser soltos no mesmo local onde foram capturados, após os trabalhos realizados no Núcleo de Doenças Infecciosas do Centro Biomédico da UFES.

DATA DA EMISSÃO:
20.09.05

ASSINATURA E CARIMBO / AUTORIDADE EXPEDIDORA:

Tomaz D. de Novaes

VÁLIDA EXCLUSIVAMENTE NO TERRITÓRIO NACIONAL.

Analista Ambiental
Nufauna / Ibama / ES

- SÃO ISENTAS DE COBRANÇA DE TAXA (RECOLHIMENTO DE DUA), INSTITUIÇÕES CIENTÍFICAS, PESQUISADORES E ZOOLOGICOS PÚBLICOS:
ESTA LICENÇA NÃO AUTORIZA:

- 1- CAPTURA/COLETA/TRANSPORTE DE ESPÉCIES AMEAÇADAS DE EXTINÇÃO, SALVO QUANDO CONSTANTE DE PROJETO ESPECÍFICO/APROVADO;
- 2- CAPTURA/COLETA/TRANSPORTE DE MATERIAL BIOLÓGICO NAS ÁREAS DE INFLUÊNCIA DE EMPREENDIMENTOS SUJEITOS AO LICENCIAMENTO AMBIENTAL, CONFORME RESOLUÇÃO DO CONAMA DE N.º 237 de 19/12/97, SALVO QUANDO ESPECÍFICO;
- 3- CAPTURA/COLETA/TRANSPORTE DE FAUNA E FLORA EM UNIDADES DE CONSERVAÇÃO FEDERAIS, ESTADUAIS, DISTRITAIS OU MUNICIPAIS, SALVO QUANDO ACOMPANHADAS DO CONSENTIMENTO DO ÓRGÃO ADMINISTRADOR COMPETENTE;
- 4- CAPTURA/COLETA/TRANSPORTE EM UNIDADES DE CONSERVAÇÃO FEDERAIS, ESTADUAIS, DISTRITAIS OU MUNICIPAIS, SALVO QUANDO ACOMPANHADAS DO CONSENTIMENTO DO ÓRGÃO COMPETENTE LOCAL;
- 5- EXPORTAÇÃO DE ANIMAIS VIVOS OU DE MATERIAL ZOOLOGICO.

VÁLIDA SOMENTE SEM EMENDAS OU RASURAS.

MOD. 09.008. 1ª VIA- INTERESSADO - 2ª VIA - IBAMA / PROCESSO

Autorização do Comitê de Ética em Pesquisa



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo/Universidade Federal de São Paulo

São Paulo, 02 de Março de 2001.
Ref. CEP Nº 107/01

Ilmo.(a) Sr.(a)
Pesquisador(a) PATRÍCIA DUARTE DEPS
Disciplina de Dermatologia
Departamento de Dermatologia da UNIFESP

Prezado(a) Pesquisador(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo analisou e **aprovou** o Projeto de Pesquisa intitulado: **"Pesquisa de *Mycobacterium leprae* em tatus selvagens do Estado do Espírito Santo"**.

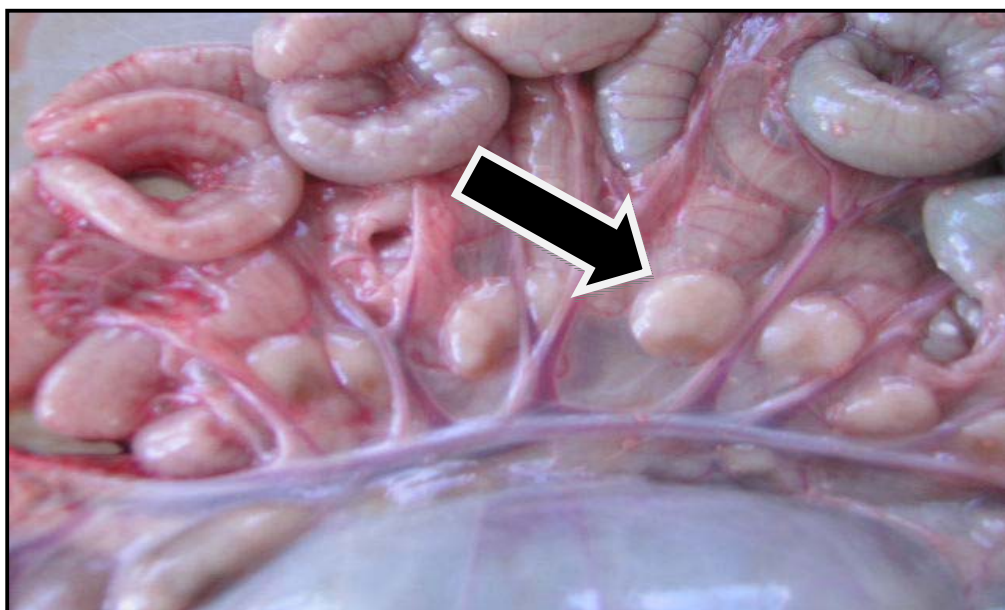
Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

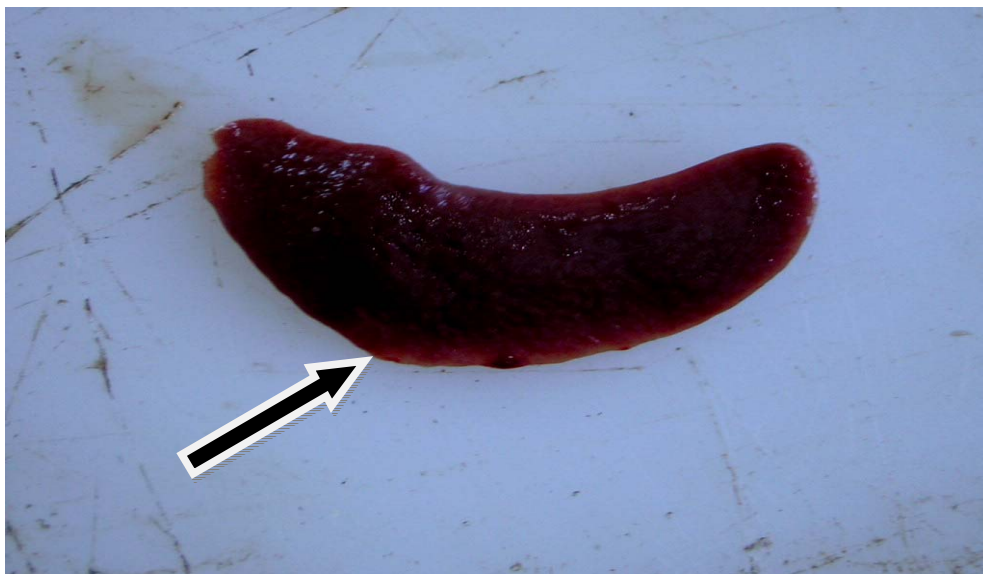
/msc



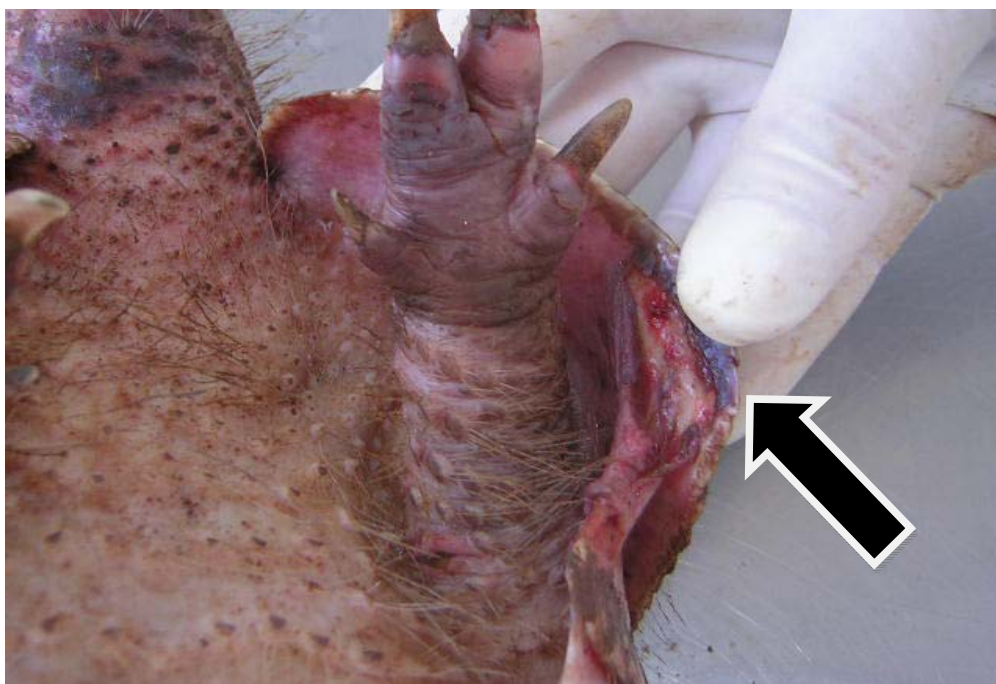
Fotografia 1- Tatu preparado para a necropsia.



Fotografia 2 - Linfonodos mesentéricos aumentados do animal M74 (seta preta), que foi positivo para técnicas da PCR, com os *primers* que amplificam a sequência repetitiva, RLEP.



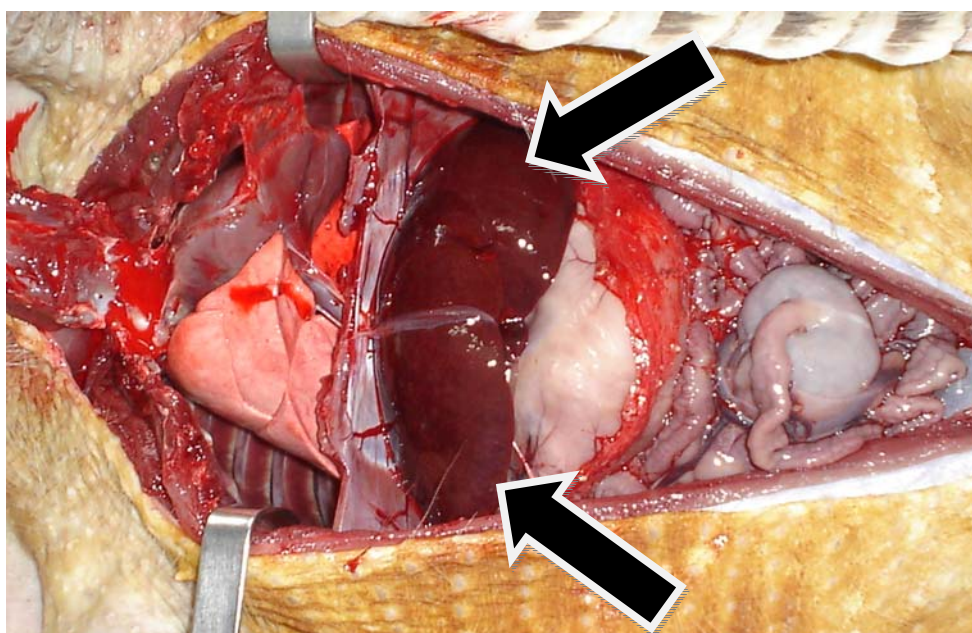
Fotografia 3- Baço do tatu F77, negativo para a técnica da PCR, com bordos irregulares (seta preta).



Fotografia 4- Tatu F71, negativo para a técnica da PCR, com lesões ulceradas na parte ventral (seta preta).



Fotografia 5- Baço do tatu M66, negativo para a técnica da PCR, com presença de pontos brancos (setas pretas).



Fotografia 6- Hepatomegalia (setas pretas) no tatu M72, que foi negativo para a técnica da PCR.

Tabela 4- Resultados gerais dos sinais clínicos e da biologia molecular dos tatus necropsiados

Animal	Peso (Kg)	Linfadenomegalia	Alterações em Fígado/Baço	Lesões externas (carapaça e/ou, parte ventral e/ou, patas e/ou, cabeça e/ou cauda)	Visceromegalias (fígado e baço)	PCR/Real time PCR Sequenciamento
M60	4,3	NR	NR	NR	NR	NR
M61	3,2	Cerv/ing	SA	Sim	Baço	Neg
M62	3,1	Cerv/ing/mes	SA	Sim	Baço	Neg
M63	3,0	Cerv/ing/mes	SA	Sim	Baço	Neg
M64	3,0	Neg	Pontos brancos (Baço)	Não	SA	Neg
M65	3,0	Cerv/ing/mes	Violáceo (Fígado)	Sim	Fígado	Neg
M66	3,1	Cerv/ing/mes	Pontos brancos (Baço)	Não	SA	Neg
M67	2,7	Cerv/ing	SA	Sim	SA	Neg
M68	3,1	Neg	SA	Sim	SA	Neg
M69	4,0	Cerv	Bordos Irregulares (Fígado)	Não	Fígado	Neg
M70	3,9	Ing	SA	Não	SA	Neg
M71	2,8	Cerv/ing	SA	Não	SA	Neg
M72	4,0	Cerv	SA	Não	Fígado e Baço	Neg
M73	2,8	Ing	Hipocorado (Baço)	Não	SA	Neg
M74	3,1	Ing/mes	Hipocorado (Fígado e Baço)	Não	SA	Pos (PCR)
M75	1,1	Mes	Hipocorado (Fígado)	Não	Baço	Neg
M76	3,1	Cerv/ing/mes	SA	Não	Fígado	Neg
M77	2,9	Cerv/ing/mes	Pontos brancos (Baço)	Não	SA	Neg
M78	3,5	Cerv/ing	SA	Não	SA	Neg
M79	3,3	Cerv/ing	SA	Não	Fígado e Baço	Neg
M80	3,2	Cerv/ing/mes	Pontos brancos (Baço)	Não	SA	Neg
M81	3,0	Cerv/ing/mes	SA	Não	Fígado e Baço	Neg
M82	0,4	Cerv/ing	SA	Não	SA	Neg
M83	3,8	Cerv/ing	Pontos brancos (Fígado)	Não	Baço	Neg
M84	0,4	Cerv/ing/mes	SA	Não	Fígado	Neg

M85	3,3	Cer/mes	SA	Não	SA	Neg
M86	3,5	Cerv	SA	Não	SA	Neg
M87	4,0	Cerv/ing	Pontos brancos (Fígado)	Não	Fígado	Neg
M88	3,9	Cerv	SA	Não	SA	Neg
M89	4,0	Cerv/ing	SA	Não	SA	Neg
M90	2,0	Neg	Hipocorado (Fígado) e Pontos Branco (Baço)	Não	Baço	Pos (PCR/Real Time PCR e Seqüenciamento)
F60	4,6	NR	NR	NR	NR	NR
F61	4,0	Neg	NR	Não	NR	Neg
F62	4,7	Neg	SA	Não	SA	Neg
F63	3,7	Cerv/ing	Bordos Irregulares (Baço)	Não	SA	Neg
F64	3,5	Neg	Hipocorados (Fígado e Baço)	Não	SA	Pos (PCR)
F65	3,2	NR	NR	NR	NR	NR
F66	2,8	Neg	SA	Não	SA	Neg
F67	3,0	Cerv	SA	Não	SA	Neg
F68	2,1	Neg	Violáceo (Fígado e Baço)	Não	SA	Pos (PCR/Real Time PCR e Seqüenciamento)
F69	3,4	Neg	Pontos brancos Fígado), Hipocorado (Baço)	Sim	SA	Neg
F70	4,3	Cerv/ing	Hipocorado (Fígado e Baço)	Não	Fígado e Baço	Neg
F71	3,6	Neg	SA	Sim	SA	Neg
F72	3,7	Cerv/ing	Hipocorado (Fígado e Baço)	Não	SA	Neg
F73	3,2	NR	NR	NR	NR	NR
F74	4,5	Neg	Hipocorado (Fígado e Baço)	Não	SA	Neg
F75	4,5	Ing	SA	Não	SA	Neg
F76	0,5	Mes	Hipocorado (Fígado e Baço)	Não	SA	Neg
F77	3,6	Mes	Bordos Irregulares (Baço)	Não	SA	Neg
F78	3,8	Cerv/ing/mes	SA	Não	Fígado e	Neg

						Baço	
F79	3,6	Cerv/ing/mes	SA	Não		SA	Neg
F80	3,3	Mes	SA	Não		SA	Neg
F81	3,9	Cerv/ing/mes	Violáceo (Fígado e Baço)	Não		SA	Neg
F82	3,2	Cerv/ing/mes	SA	Sim		Fígado e Baço	Neg
F83	3,5	Ing	SA	Não		SA	Neg
F84	3,5	Cerv/ing/mes	SA	Não		Fígado	Neg
F85	3,6	Cerv/ing/mes	Bordos irregulares (Baço)	Sim		Baço	Neg
F86	3,3	Cerv/ing/mes	Pontos brancos (Fígado e Baço)	Não		Fígado e Baço	Neg
F87	4,2	Cerv/ing	Pontos brancos (Baço)	Sim		SA	Neg
F88	6,0	Cerv/ing	Bordos Irregulares (Fígado)	Não		SA	Neg
F89	4,5	Cerv/ing	Pontos brancos (Fígado e Baço)	Não		Fígado e Baço	Neg
F90	4,0	Neg	Bordos Irregulares (Baço)	Não		SA	Neg
F91	2,0	Cerv/ing/mes	Hipocorado (Fígado), Pontos brancos (baço)	Sim		Baço	Neg
F92	1,5	Mes	Pontos brancos (Baço)	Sim		SA	Neg
F93	1,9	Cerv/ing/mes	SA	Não		SA	Neg
F94	3,0	Mes	SA	Não		Baço	Neg
F95	4,3	Cerv/ing/mes	SA	Não		Fígado e Baço	Neg
F96	3,0	Cerv/ing/mes	SA	Não		SA	Neg
F97	2,5	Neg	Pontos brancos (Fígado e Baço)	Não		Fígado	Neg

Kg- Kilogramas; Neg- Negativo; Pos- Positivo; NR- Não Realizado; Cerv- Linfonodo cervical; Ing- Linfonodo inguinal; Mes- Linfonodo mesentérico; SA- Sem Alterações; PCR- Técnica da Reação em Cadeia da Polimerase