

Comparação entre microssatélites e o gene *Ml MntH* como alvos para a identificação do *Mycobacterium leprae* por PCR na hanseníase *

Comparison between microsatellites and *Ml MntH* gene as targets to identify *Mycobacterium leprae* by PCR in leprosy

Andrezza Furquim da Cruz¹

Renata Bazan Furini²

Ana Maria Ferreira Roselino³

Resumo: FUNDAMENTOS: PCR tem sido frequentemente utilizada no diagnóstico molecular da hanseníase.

OBJETIVOS: comparar os resultados da PCR com 4 pares de *primers* específicos para *Mycobacterium leprae*, bem como os resultados da PCR à classificação operacional, segundo a OMS, de multibacilar (MB) e paucibacilar (PB) da hanseníase.

MÉTODO: Vinte e oito amostras de DNA, extraído de biópsias congeladas de pele e de *imprint* de biópsias em papel de filtro de 23 pacientes (14 MB e 9 PB), foram utilizadas na PCR com *primers* que amplificam 131pb, 151pb e 168pb de regiões de microssatélites, e um fragmento de 336pb do gene *Ml MntH* (ML2098) do bacilo.

RESULTADOS: O bacilo pôde ser detectado em 22 (78,6%) das 28 amostras. Nove (45%) das 20 amostras de biópsia e 6 (75%) das 8 amostras de *imprints* foram positivas para TTC. Sete (35,5%) amostras de biópsias e 5 (62,5%) *imprints* foram positivos para AGT, e 11 (55%) biópsias e 4 (50%) *imprints* foram positivos para AT. Oito (38%) amostras de biópsias e 5 (62,5%) *imprints* foram positivos para o gene *Ml MntH*. Dentre o grupo MB, os microssatélites detectaram o bacilo em 78,5% das amostras, e o gene *Ml MntH*, em 57,1% das amostras, independentemente do material clínico. No grupo PB, 55,5% das amostras foram positivas para os microssatélites, enquanto que 22,2% o foram para o gene *Ml MntH*.

CONCLUSÕES: Estes resultados mostram que, tanto as regiões específicas de microssatélites quanto o gene *Ml MntH*, podem representar ferramentas úteis na detecção do *Ml MntH* por PCR em amostras de biópsias e *imprint* de biópsias. Palavras-chave: Hanseníase; *Mycobacterium leprae*; Reação em cadeia da polimerase; Repetições de microssatélites

Abstract: BACKGROUND: The Polymerase Chain Reaction (PCR) technique has been frequently used in the molecular diagnosis of leprosy.

OBJECTIVES: To compare the results of PCR with four pairs of *Mycobacterium leprae* specific primers as well as to compare these results to multibacillary (MB) and paucibacillary (PB) leprosy according to the WHO operational classification.

METHOD: 28 DNA samples, collected from the frozen skin biopsies and biopsy imprints on filter paper of 23 patients (14 MB and PB 9), were examined for PCR using primers which amplify 131, 151 and 168bp of specific microsatellite regions and a 336 fragment of the *Ml MntH* (ML2098) gene.

RESULTS: *M. leprae* bacillus could be detected in 22 (78.6%) of the 28 samples. 9 (45%) of the 20 biopsy samples and 6 (75%) of the 8 imprints were positive to TTC. 7 (35.5%) skin biopsy specimens and 5 (62.5%) imprints were positive to AGT, and 11 (55%) biopsies and 4 (50%) were positive to AGT. 11 (55%) skin biopsies and 4 (50%) imprints were positive to AT. 8(38%) skin biopsies and 5 (62.5%) imprints were positive to the *Ml MntH* gene. In the MB group, the microsatellites detected the bacillus in 78.5% of the samples, and the *Ml MntH* gene in 57.1% of the samples, independent of the clinical material. In the PB group 55.5% of samples were positive to the microsatellite primers, while 22.2% were positive to the *Ml MntH* gene.

CONCLUSIONS: These results show that both the specific regions of microsatellites, as well as the *Ml MntH* gene fragment can be useful tools for detecting the *M. leprae* DNA by PCR in frozen skin biopsy samples and filter paper biopsy imprints.

Keywords: Leprosy; *Mycobacterium leprae*; Microsatellite repeats, polymerase chain Reaction

Recebido em 10.04.2010.

Aprovado pelo Conselho Consultivo e aceito para publicação em 24.09.10.

* Trabalho realizado no Laboratório Multiusuário de Biologia Molecular, Divisão de Dermatologia, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo (FMRP - USP) - São Paulo (SP), Brasil.

Conflito de interesse: Nenhum / *Conflict of interest: None*

Suporte financeiro / *Financial funding*: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência (FAEPA) - Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP)

¹ Biomédica - Mestre em Bioengenharia - Doutora em Ciências Médicas (bolsista Capes), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo (FMRP - USP) - São Paulo (SP), Brasil.

² MD - Especialista em Dermatologia - Mestrado em Clínica Médica - Médica-assistente do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP) - São Paulo (SP), Brasil.

³ MD, PhD - Especialista em Dermatologia e em Hansenologia - Professora- associada, chefe da Divisão de Dermatologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo (FMRP-USP) - São Paulo (SP), Brasil.

INTRODUÇÃO

Mycobacterium leprae é um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) intracelular obrigatório, patógeno da hanseníase, doença que afeta principalmente os nervos periféricos e a pele. Embora a hanseníase seja controlada efetivamente pela multidrogaterapia (MDT), ainda se têm detectado casos novos em regiões do mundo onde permanece endêmica.¹ Devido ao fato de o bacilo não ser cultivado em meios artificiais, a sua identificação nas amostras clínicas tem sido problemática.² Assim, a PCR mostra-se uma técnica sensível e específica para a identificação de *M. leprae*, assumindo grande importância no diagnóstico da hanseníase, principalmente na forma paucibacilar (PB) e nos contactantes.^{3,4} Sequências alvo para a amplificação do DNA de *M. leprae*, como os genes que codificam as proteínas de 65, 36 e 18kDa, e sequências repetitivas têm sido as mais utilizadas para o diagnóstico etiológico da hanseníase e, muitas vezes, têm se mostrado mais sensíveis e específicas do que o exame bacilosκόpio rotineiramente utilizado.³

Neste estudo, 4 pares de *primers* específicos para a identificação de *M. leprae*, sendo 3 específicos para regiões de microssatélites do bacilo, e um específico para uma sequência interna do gene transportador de íons *MI MntH*, foram utilizados em amostras de pacientes com hanseníase.⁴ Deste modo, pretendemos determinar os resultados da PCR com os 4 pares de *primers* para a identificação do bacilo em amostras de biópsias de pele e *imprint* de biópsias, assim como comparar os resultados da PCR à classificação operacional, segundo a OMS, de multibacilar (MB) e paucibacilar (PB) da hanseníase.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras:

Foram utilizadas 28 amostras de 23 pacientes com hanseníase, seguidos no Ambulatório de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP (HC-FMRP-USP), de 2002 a 2009. Dessas, 20 amostras de biópsia de pele foram realizadas com *punch* 4 mm e congeladas a -80°C, e 8 amostras de *imprint* da porção dérmica da biópsia foram coletadas em papel de filtro no mesmo momento da realização das biópsias de pele, e estocadas a 4°C. Dentre os 23 pacientes, 14 pertenciam ao grupo multibacilar (MB), com baciloscopias positivas em amostras de linfa de orelhas, joelhos e cotovelos, e na biópsia de pele (11 amostras de biópsias de pele e 6 *imprints*), e 9, ao grupo PB (9 biópsias e 2 *imprints*), com baciloscopias negativas. Exceto duas amostras de *imprint* de biópsia, que foram coletadas no início da MDT para a hanseníase, as demais amostras foram obtidas de pacientes virgens de tratamento. O estudo foi previamente aprova-

do pelo Comitê de Ética do HC-FMRP-USP, processo nº 2609/2006. As amostras coletadas anteriormente a 2006 pertencem ao Banco de Amostras do Laboratório Multiusuário de Biologia Molecular do Departamento de Clínica Médica, FMRP-USP, aprovado pelo CEP sob o registro nº 3605/2006.

Extração do DNA de biópsias de pele e de *imprints* de biópsias:

Para a extração do DNA, a amostra de pele foi digerida com 1,0 mL de buffer de digestão 1x [0,1M tris pH 8,0; 0,1M EDTA; 1% SDS; 20 mg/mL de proteinase K (PK)], a 55°C, com agitação, *overnight*. No dia seguinte, a PK foi inativada a 95°C por 10 minutos e uma mistura 1:1 de fenol-clorofórmio foi adicionada ao lisado com um volume final de 1,0mL, invertendo-se o tubo gentilmente. Centrifugou-se a 14.000 rpm por 2 minutos em temperatura ambiente e transferiu-se o sobrenadante para um tubo novo. Foram adicionados então 500µL de clorofórmio, o tubo invertido gentilmente e a amostra centrifugada a 14.000 rpm por 2 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido cuidadosamente para um tubo novo para evitar a aspiração da fase branca de separação (proteínas) e adicionado 1,0mL de etanol absoluto gelado; o tubo foi invertido gentilmente e levado a -20°C por 1h. Após este período, o material foi centrifugado a 14.000 rpm por 30 minutos, 4°C, e o sobrenadante descartado por inversão em papel de filtro. O sedimento foi lavado em 500µL de etanol 70% gelado e a amostra novamente centrifugada a 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o DNA, secado por centrifugação a vácuo por aproximadamente 15 minutos. Após esse período o DNA foi redissolvido em 50µL de água deionizada esterilizada (H₂Odd).

As amostras de *imprint* foram recortadas assepticamente do papel de filtro, embebidas em 50µL de H₂Odd, e incubadas a 95°C em banho seco por 15 minutos sob agitação. O sobrenadante obtido foi utilizado diretamente na PCR.

PCR:

As sequências dos *primers* utilizadas neste estudo estão relacionadas na tabela 1. A solução de reagentes para a PCR incluiu: 0,25mM de dNTP, 1U de Taq DNA polimerase (Invitrogen™), 2,0mM de MgCl₂, tampão de PCR 1x, 40µM de cada *primer* (Invitrogen™), e 0,5 µg da amostra de DNA, perfazendo um volume final de 25µL.

Para a identificação do bacilo *M. leprae*:

Para identificar o bacilo *M. leprae* nas amostras clínicas dos pacientes, foram utilizados três pares de *primers* específicos, que codificam regiões dos microssatélites TTC, AGT e AT (Young et al., 2004)⁴, e

TABELA 1: Localização genômica dos microssatélites e do gene *mntH*, e respectivos primers utilizados na PCR para a identificação do bacilo *M. leprae* nas amostras de biópsia de pele e *imprint* de biópsia de pacientes com hanseníase

Motif de repetição	Localização no genoma	Genes Adjacentes	Primer	Sequência	Fragmento (pb)
TTC	2785432-2785494	ML2345 (2786390-2786807) (pseudo) ^a	TTC-F2 TTC-R2	CGTTGGGTTTCGATCGAATCGA GCACGCCGACGGGAATAAGT	131
AGT	2583816-2583839	ML2173 (2584381-2584584) (pseudo)	AGT-F2 AGT-R2	ATCAACGCTGCGGTTTCGCAG ATATGCATGCCGGTGGTGTGCT	151
AT	948935-948964	ML0798 (948302-946524) (hip) ^b	AT-F1 AT-R1	CAATATGCGGGTTGGCGCTTCTG CCGTCTGGCTCGATGGCTGGATTC	168
MI <i>MntH</i>	ML2098	--	<i>mntH1</i> <i>mntH2</i>	CGGCTTCACGTCCAGTTTCTTC TAAGTGCCCTCGATGTAAGCGG	336

um par de *primers* que amplifica uma sequência interna do gene transportador de manganês *MI MntH* do bacilo.⁴ O ciclo utilizado para os microssatélites foi de “Hot-Start” PCR. Após a desnaturação inicial do DNA a 95°C por 10 min, a reação prosseguiu com 43 ciclos constituídos por: desnaturação a 95°C por 10s, anelamento a 58°C por 30s, extensão a 72°C por 30s, seguida por extensão final a 72°C por 2 min.

Para a amplificação do gene *MI MntH*, foi por nós desenhado um par de *primers* específicos para a sequência de 336pb do gene *MI MntH* do bacilo *M. leprae*. Saliencia-se que este par de *primers* não amplifica sequências gênicas do tecido ou do sangue humano, pois são específicos, segundo consulta ao GenBank AL583924.1; gi 13093618. Com auxílio dos programas Oligo Explorer, Oligo Analyser 1.1.0 (Copyright^(C) 2000-2002, Teemu Kuulasmaa) e Gene Runner 3.05 (Hastings Software, Inc. Copyright^(C), 1994), os *primers forward MntH1* (5'-3') CGGCTTCACGTCCAGTTTCTTC e *reverse MntH2* (5'-3') TAAGTGCCCTCGATGTAAGCGG foram desenhados a partir da sequência completa do gene *MI MntH* (1281 pb), obtida no Genbank (NC_002677). A temperatura de anelamento utilizada foi de 60°C (94°C por 5 min, 30 ciclos de 94°C por 30s, 60°C por 45s, 72°C por 1 min, seguidos por 7 min a 94°C).

Para o controle da especificidade da reação, utilizou-se amostra de cultura de *Mycobacterium tuberculosis*. Para o controle negativo, o DNA foi excluído da reação.

Análise Estatística:

A comparação dos resultados das PCRs para os 4 pares de *primers* entre os grupos foi feita pelo teste

Kappa. Esta análise comparativa foi feita on-line com auxílio do software Kappa Calculator, Universidade da Columbia, USA (Disponível em: <http://people.dbbi.columbia.edu/homepages/chuangj/kappa/calculator.htm>).

RESULTADOS

Os resultados da PCR realizada com DNA extraído das amostras de biópsia e de *imprint* de biópsias com os *primers* para microssatélites e gene *MI MntH* estão mostrados nas figuras 1, 2 e 3.

O bacilo *M. leprae* pôde ser detectado em 22 (78,6%) das 28 amostras testadas, sendo que 21 (75%) puderam ser detectadas por todos ou algum dos 3 microssatélites, e 13 (46,42%) pelos *primers* que amplificam o gene *MI MntH* do bacilo *M. leprae*, independentemente do material biológico ou grupo pertencente. Das 20 amostras de biópsia de pele, 9 (45%) foram positivas para o microssatélite TTC (8 pertencentes ao grupo MB e 1, ao grupo PB), 7 (35%) para o microssatélite AGT (5 amostras do grupo MB e 2, do grupo PB), e 11 (55%) para o microssatélite AT (6 amostras do grupo MB e 5, do grupo PB). No que diz respeito às amostras de *imprint* de biópsias, das 8 amostras processadas, 6 (75%) foram positivas para o microssatélite TTC, 5 (62,5%), para AGT e 4 (50%), para AT. Todas as amostras positivas pertenciam ao grupo MB (Tabela 2).

Em relação aos *primers* que amplificam o fragmento do gene *MI MntH*, das 20 amostras de biópsias, 10 (50%) tiveram a PCR positiva para o gene, sendo que 3 pertenciam ao grupo PB. Cinco (62,5%) das 8 amostras de *imprint* de biópsias foram positivas para o gene *MI MntH*. Nenhuma amostra de *imprint* de

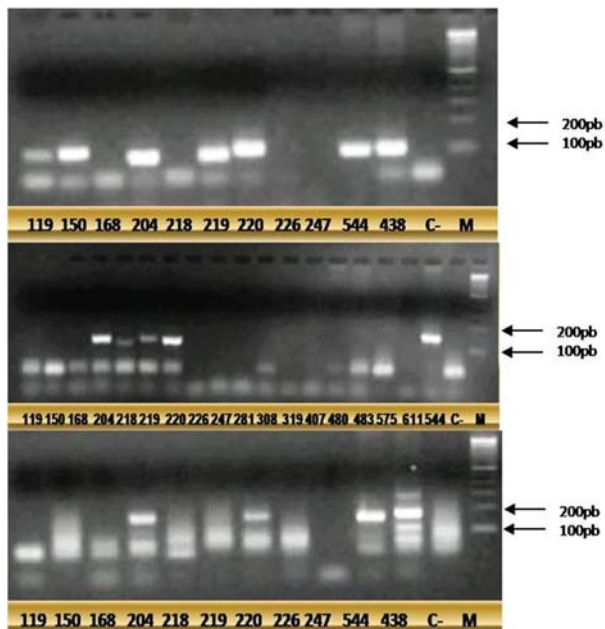


FIGURA 1: Eletroforese em gel de agarose 2,0% para identificação do bacilo *M. leprae* em amostras de pele com os pares de *primers* para os microssatélites TTC, AGT e AT. A amplificação resultou em fragmentos de 131, 151 e 168pb, respectivamente. M: marcador molecular 100pb. A diferença entre os tamanhos das bandas amplificadas se dá pela diferença no anelamento do microssatélite em questão. M: marcador molecular 100pb

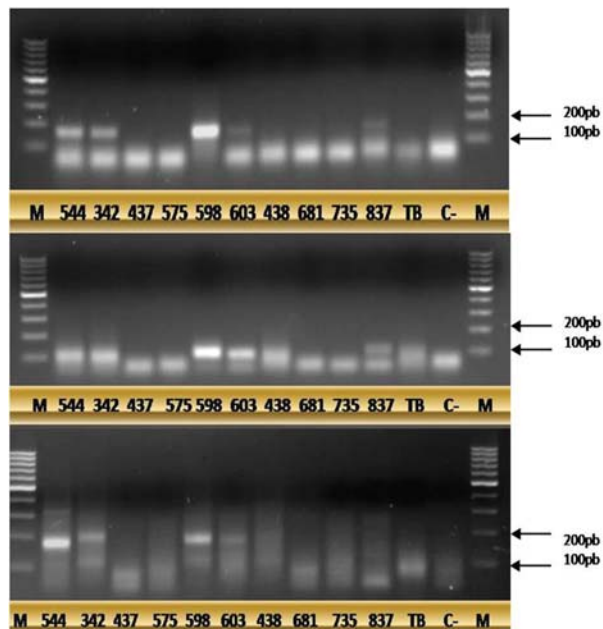


FIGURA 2: Eletroforese em gel de agarose 2,0% para identificação do bacilo *M. leprae* em amostras de *imprints* de biópsias com os pares de *primers* para os microssatélites TTC, AGT e AT. A amplificação resultou em fragmentos de 131, 151 e 168pb, respectivamente. A diferença entre os tamanhos das bandas amplificadas se dá pela diferença no anelamento do microssatélite em questão. M: marcador molecular 100pb

biópsia do grupo PB foi positiva na pesquisa do gene *MntH* (Tabela 3).

A análise comparativa das PCRs com os *primers* que amplificam os microssatélites e o gene *Ml MntH* foi concordante em 14 (50%) amostras testadas (K=0,428, P<0,001; IC_{95%} = 0,277 ≤ K ≤ 0,529).

No que diz respeito ao grupo MB, o desempenho dos *primers* AGT e *MntH* foi semelhante tanto nas amostras de biópsia de pele quanto nas de *imprint* de biópsia. A melhor detecção para o grupo MB nas biópsias e *imprint* de biópsia foi com a utilização dos *primers* que amplificam o microssatélite TTC (72,7% e 100%, respectivamente). A PCR com os *primers* que amplificam o gene *Ml MntH* foi positiva em 45,4% das amostras de biópsia, e em 5 (83,3%) das 6 amostras de *imprints* testadas. O teste foi razoavelmente concordante para todos

os pares de *primers* testados nas biópsias de pele (36,4%) (K=0,290; P = 0,019; IC_{95%} = 0,049 ≤ K ≤ 0,531) e em 66,7% para as amostras de *imprint* (K=0,411; P = 0,014; IC_{95%} = 0,084 ≤ K ≤ 0,737).

Já no grupo PB, o melhor desempenho resultou para os *primers* que amplificam o microssatélite AT (44%). A PCR com o par de *primers* que amplificam o gene *Ml MntH* foi positiva em 2 (22%) amostras, igualando-se à sensibilidade do *primer* AGT. A comparação dos resultados da PCR com os *primers* que amplificam as regiões de microssatélites e os *primers* que amplificam o gene *Ml MntH* foi razoavelmente concordante (22%), de acordo com a classificação de Landis e Koch (1997) (K=0,16; P=0,238; IC_{95%} = -0,106 ≤ K ≤ 0,437).

TABELA 2: Resultado da PCR para pesquisa dos microssatélites do bacilo *M. leprae* em biópsias de pele e *imprint* de biópsia segundo os grupos multi e paucibacilar da hanseníase

Grupos	Multibacilar			Paucibacilar			Multibacilar			Paucibacilar		
	BIÓPSIA	IMPRINT	IMPRINT	BIÓPSIA	IMPRINT	IMPRINT	BIÓPSIA	IMPRINT	IMPRINT	BIÓPSIA	IMPRINT	IMPRINT
PCR	TTC(%)	AGT(%)	AT(%)	TTC(%)	AGT(%)	AT(%)	TTC(%)	AGT(%)	AT(%)	TTC(%)	AGT(%)	AT(%)
Positiva	8(72,7)	5(45,4)	7(63,6)	6(100)	5(83,3)	4(66,7)	1(11,1)	2(22,2)	4(44,4)	0(0)	0(0)	0(0)
Negativa	3(27,3)	6(54,6)	4(36,4)	0(0)	1(16,7)	2(33,3)	8(88,9)	7(77,8)	5(55,6)	2(100)	2(100)	2(100)
TOTAL	11	11	11	6	6	6	9	9	9	2	2	2

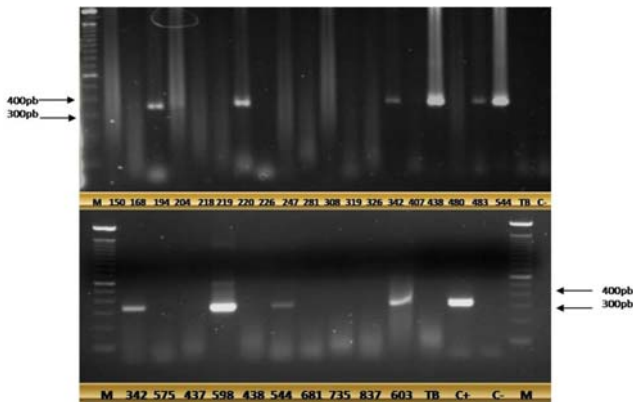


FIGURA 3: Eletroforese em gel de agarose 2,0% para identificação do gene *MtH* em amostras de biópsia e *imprint* de biópsia. A amplificação resultou em fragmento de 336pb. A amostra 544 foi usada como controle positivo nesta reação. C-: reação com exclusão de DNA; C+: plasmídeo pBADp16LC, contendo o gene *mntH*; TB: cultura de *M. tuberculosis*; M: marcador molecular 100pb

DISCUSSÃO

Até o momento, nenhum teste específico e sensível está disponível para o diagnóstico da hanseníase assintomática ou para prever a progressão para a hanseníase entre os indivíduos expostos.⁵ Assim, a necessidade de se encontrar ferramentas moleculares não só para a diferenciação entre as micobactérias, mas também para a identificação do bacilo *M. leprae* faz-se urgente em vista dos altos níveis de detecção de casos novos da doença.¹

Neste sentido, o objetivo do presente estudo foi avaliar o método da PCR para detecção do bacilo *M. leprae* em amostras clínicas de biópsia de pele e *imprints* de biópsias. Os resultados da PCR, utilizando *primers* específicos para os microssatélites TTC e AT em amostras do grupo MB, apresentaram melhor desempenho, quando comparados ao gene *MtH*, o qual, por sua vez, apresentou desempenho similar aos *primers* AGT neste grupo. Apesar de a concordância estatística entre as PCRs do grupo MB não ter tido diferença significativa, 9 das 11 amostras de biópsias de pele foram positivas para 1 ou 3 microssatélites,

enquanto o par de *primers* que amplificam o gene *MtH* foi capaz de detectar a presença do bacilo em 5 das 11 amostras testadas, sendo que uma delas não fora identificada pelo *primer* TTC. Diferentemente do que ocorrera nas amostras de biópsias, o par de *primers* do gene *MtH* foi capaz de amplificar 5 das 6 amostras de *imprint* de biópsias, as quais foram positivas para o par de *primers* TTC, mostrando desempenho melhor do que o par de *primers* AT, que amplificou somente 4 das amostras testadas.

Atualmente, o diagnóstico da hanseníase é baseado em achados de exame clínico e na detecção do BAAR (baciloscopia) em raspados das lesões hanseníicas e em outros sítios selecionados para a coleta, como lóbulos auriculares, cotovelos e joelhos. Esses resultados são expressos em índice baciloscópico, considerado hoje o método quantitativo de avaliação mais correto, rápido e usual na leitura da baciloscopia da hanseníase (MS/SPS, Brasil). Para se aplicar a técnica da PCR como diagnóstico para hanseníase em termos clínicos, deve-se comparar cuidadosamente os resultados deste teste com os resultados obtidos pela baciloscopia, tanto da linfa quanto da biópsia de pele.⁶

Os *primers* testados para diagnóstico neste trabalho foram anteriormente utilizados para mapeamento epidemiológico do bacilo *M. leprae* em populações da Índia, Indonésia, Filipinas, dentre outros.^{4,7,8} Porém, a utilização desses *primers* não tem sido aplicada rotineiramente devido à dificuldade de se obter amostras do DNA genômico a partir do material clínico.¹

Em contrapartida, o uso de sequências repetitivas como alvos de DNA na PCR proporciona aumento da sensibilidade do teste, uma vez que essas sequências encontram-se em vários sítios do DNA genômico.²

Em resumo, a PCR com *primers* para os microssatélites diagnosticou o bacilo em 18/23 (78,3%) pacientes, enquanto que a PCR com *primers* para o gene *MtH* foi capaz de diagnosticar 10/23 (43%) pacientes. Dentre os pacientes do grupo MB, os microssatélites detectaram o bacilo em 78,5% (11/14) das amostras, e o gene *MtH* em 57,1% (8/14) das amostras, independentemente do material clínico. A

TABELA 3: Resultado da PCR para pesquisa do gene *MtH* do bacilo *M. leprae* em biópsias de pele e *imprint* de biópsia, segundo os grupos multi e paucibacilar da hanseníase

PCR	Grupos			
	Multibacilar		Paucibacilar	
	BIÓPSIA(%)	IMPRINT(%)	BIÓPSIA(%)	IMPRINT(%)
Positiva	5 (45,4)	5 (83,3)	2 (22,2)	0 (0)
Negativa	6(54,6)	1 (16,7)	7 (77,8)	2(100)
TOTAL (n)	11	6	9	2

positividade da PCR para os microssatélites em amostras de biópsia do grupo MB é semelhante àquela relatada para alvos como o gene *pra* ou 16S rRNA, que mostrou valores positivos em torno de 70 a 80%, porém, foi superior (microssatélites) ou igual (gene *MI MntH*) a alguns estudos que utilizam sequências repetitivas *RLEP* como alvo para diagnóstico, os quais mostraram 54 a 74% de positividade nos testes.^{2, 6,9-14}

No grupo PB, 55,5% (5/9) das amostras foram positivas para os microssatélites enquanto que 22,2% (2/9) o foram para o gene *MI MntH*. Estas amostras de biópsia tiveram positividade maior quando comparada à literatura.^{9, 15, 16}

No que diz respeito às amostras de *imprint* de biópsia do grupo MB, a PCR com *primers* para os microssatélites foi capaz de identificar o bacilo em 66,7 a 100% das amostras, porém não resultou posi-

va para duas amostras do grupo PB. Estes dados mostraram-se superiores aos relatos de resultados de PCR em amostras de linfa.^{2, 9, 10, 15, 17}

CONCLUSÕES

Este estudo mostra que os *primers* para sequências de microssatélites são mais efetivos para a amplificação das amostras de DNA de biópsia de pele do que os *primers* para o gene *MI MntH* no grupo MB. Porém, os resultados foram similares no que diz respeito ao grupo PB. Estes achados sugerem que ambos os alvos associados podem tornar-se ferramentas úteis na identificação do bacilo causador da hanseníase em amostras clínicas, como biópsias congeladas e *imprints* de biópsias. □

REFERÊNCIAS

- Groathouse NA, Brown SE, Knudson DL, Brennan PJ, Slayden RA. Isothermal amplification and molecular typing of the obligate intracellular pathogen *Mycobacterium leprae* isolated from tissues of unknown origins. *J Clin Microbiol*. 2006;44:1502-8.
- Kang TJ, Kim SK, Lee SB, Chae GT, Kim JP. Comparison of two different PCR amplification products (the 18-kDa protein gene vs. RLEP repetitive sequence) in the diagnosis of *Mycobacterium leprae*. *Clin Exp Dermatol*. 2003;28:420-4.
- Goulart IM, 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;299:267-271.
- Young SK, Taylor GM, Jain S, Suneetha LM, Suneetha S, Lockwood DN, et al. Microsatellite mapping of *Mycobacterium leprae* populations in infected humans. *J Clin Microbiol*. 2004;42:4931-6.
- Stefani MM, Guerra JG, Sousa AL, Costa MB, Oliveira ML, Martelli CT, et al. Potential plasma markers of Type 1 and Type 2 leprosy reactions: a preliminary report. *BMC Infect Dis*. 2009;9:75.
- Yoon KH, Cho SN, Lee MK, Abalos RM, Cellona RV, Fajardo TT Jr, et al. Evaluation of polymerase chain reaction amplification of *Mycobacterium leprae*-specific repetitive sequence in biopsy specimens from leprosy patients. *J Clin Microbiol*. 1993;31:895-9.
- Matsuoka M, Zhang L, Budiawan T, Saeki K, Izumi S. Genotyping of *Mycobacterium leprae* on the basis of the polymorphism of TTC repeats for analysis of leprosy transmission. *J Clin Microbiol*. 2004;42:741-5.
- Kimura M, Sakamuri RM, Groathouse NA, Rivoire BL, Gingrich D, Krueger-Koplin S, et al. Rapid variable-number tandem-repeat genotyping for *Mycobacterium leprae* clinical specimens. *J Clin Microbiol*. 2009;47:1757-66.
- de Wit MY, Faber WR, Krieg SR, Douglas JT, Lucas SB, Montreewasuwat N, et al. Application of a polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae* in skin tissues. *J Clin Microbiol*. 1991;29:906-10.
- Torres P, Camarena JJ, Gomez JR, Nogueira JM, Gimeno V, Navarro JC, et al. Comparison of PCR mediated amplification of DNA and the classical methods for detection of *Mycobacterium leprae* in different types of clinical samples in leprosy patients and contacts. *Lepr Rev*. 2003;74:18-30.
- Kurabachew M, Wondimu A, Ryon JJ. Reverse transcription-PCR detection of *Mycobacterium leprae* in clinical specimens. *J Clin Microbiol*. 1998;36:1352-6.
- Phetsuksiri B, Rudeeaneksin J, Supapakul P, Wachapong S, Mahotarn K, Brennan PJ. A simplified reverse transcriptase PCR for rapid detection of *Mycobacterium leprae* in skin specimens. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2006;48:319-28.
- Santos AR, Balassiano V, Oliveira ML, Pereira MA, Santos PB, Degraive WM, et al. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA by polymerase chain reaction in the blood of individuals, eight years after completion of anti-leprosy therapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001;96:1129-33.
- Patrocínio LG, Goulart IM, Goulart LR, Patrocínio JA, Ferreira FR, Fleury RN. Detection of *Mycobacterium leprae* in nasal mucosa biopsies by the polymerase chain reaction. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2005;44:311-6.
- Wichitwechkarn J, Karnjan S, Shuntawuttisetee S, Sornprasit C, Kampirapap K, Peerapakorn S. Detection of *Mycobacterium leprae* infection by PCR. *J Clin Microbiol*. 1995;33:45-9.
- Bang PD, Suzuki K, Phoung le T, Chu TM, Ishii N, Khang TH. Evaluation of polymerase chain reaction-based detection of *Mycobacterium leprae* for the diagnosis of leprosy. *J Dermatol*. 2009;36:269-76.
- Chae GT, Lee SB, Kang TJ, Shin HK, Kim JP, Ko YH, et al. Typing of clinical isolates of *Mycobacterium leprae* and their distribution in Korea. *Lepr Rev*. 2002;73:41-6.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA / MAILING ADDRESS:

Ana Maria Roselino
 Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da
 Universidade de São Paulo (FMRP-USP)
 Av. Bandeirantes, 3900
 14049-900 Ribeirão Preto (SP) - Brasil
 E-mail: amfrosel@fmrp.usp.br

Como citar este artigo/How to cite this article: Cruz AF, Furini RB, Roselino AM. Comparação entre microssatélites e o gene *MI MntH* como alvos para a identificação do *Mycobacterium leprae* por PCR na hanseníase. *An Bras Dermatol*. 2011;86(4):651-6.