

# Desafios na era pós genômica para o desenvolvimento de testes laboratoriais para o diagnóstico da hanseníase

## Challenges in the post genomic era for the development of tests for leprosy diagnosis

Mariane Martins de Araújo Stefani<sup>1</sup>

### RESUMO

O diagnóstico da hanseníase se baseia em manifestações clínicas e não existe teste laboratorial para diagnosticar casos assintomáticos ou para prever progressão da doença entre indivíduos expostos. Novas análises genômicas comparativas *in silico* e ferramentas de biologia molecular têm sido empregadas para revelar proteínas exclusivas do *Mycobacterium leprae* que apresentem potencial aplicação diagnóstica. A hanseníase tuberculóide paucibacilar (PB) apresenta baixo nível de anticorpos e forte resposta imune celular (RIC) tipo Th1/interferon gamma (IFN- $\gamma$ ). A doença lepromatosa multibacilar (MB) apresenta sorologia positiva e fraca RIC. Portanto, testes laboratoriais para diagnosticar hanseníase PB e MB devem contemplar testes de RIC e sorologia. Proteínas recombinantes do *Mycobacterium leprae* sorologicamente reativas podem ser incorporadas ao antígeno PGLI para melhorar o diagnóstico sorológico de pacientes MB. Proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos do *Mycobacterium leprae* têm sido testados em ensaios de RIC/IFN- $\gamma$  para diagnosticar casos PB. Sorologia anti-PGLI modificada incorporando novos antígenos do *Mycobacterium leprae* e ensaios baseados na RIC/produção de IFN- $\gamma$  devem permitir a detecção precoce de casos MB e PB em países endêmicos.

**Palavras-chaves:** Diagnóstico. Hanseníase. Abordagem pós-genômica.

### ABSTRACT

Leprosy diagnosis is based mainly on clinical manifestations and no laboratory test is available to diagnose asymptomatic disease or to predict disease progression among exposed individuals. Novel comparative genomic *in silico* analyses and molecular biology tools have discovered unique *Mycobacterium leprae* proteins with potential diagnostic application. Tuberculoid paucibacillary leprosy (PB) shows low antibodies titers and strong Th1 type/ IFN- $\gamma$  specific cell mediated immunity (CMI), while lepromatous multibacillary patients (MB) show high antibody titers and low CMI. Therefore, laboratory tests for PB and MB leprosy diagnosis will require CMI and antibody based assays. Serologically reactive recombinant *Mycobacterium leprae* proteins were identified and may be used in conjunction with PGL-I to improve MB patient diagnosis. *Mycobacterium leprae* recombinant proteins and synthetic peptides have been tested for CMI-interferon gamma based assays for PB diagnosis. Modified PGL-I serology incorporating new *Mycobacterium leprae* antigens and CMI tests based on IFN- $\gamma$  production may permit the detection of leprosy PB and MB forms in endemic countries.

**Key-words:** Diagnosis. Leprosy. Post genomic approach. .

A Hanseníase, uma das mais antigas doenças humanas, ainda é um importante problema de saúde pública para muitos países endêmicos, como o Brasil. O agente causador da hanseníase, o *Mycobacterium leprae* foi o primeiro patógeno bacteriano a ser identificado como causa de uma doença infecciosa humana há mais de 130 anos. Entretanto, até a conclusão da sequência completa do seu genoma publicada em 2001, o *Mycobacterium leprae* permaneceu como um enigma principalmente devido à

impossibilidade de ser cultivado *in vitro*<sup>9</sup>. Uma característica exclusiva do *Mycobacterium leprae* é o seu tropismo para células de Schwann, que representa a base de graves neuropatias que podem levar a perda senso-motora, responsável pela maioria das deformidades e incapacidades físicas associadas à hanseníase<sup>29</sup>.

O esforço da Organização Mundial da Saúde para eliminar a hanseníase até o ano 2000 foi baseado em importantes avanços na terapia antimicobacteriana na década de 80. Apesar do grande declínio na prevalência observado na maioria dos países endêmicos na última década, a detecção de casos novos permanece alta<sup>34</sup>. Como a doença não foi eliminada, o desenvolvimento de testes diagnósticos aplicáveis em situação de campo, é considerado uma prioridade iminente em pesquisa. Neste contexto, o consórcio *IDEAL* (Iniciativa para Ensaios Diagnósticos e Epidemiológicos para Hanseníase), estabelecido em 2004, representa uma força tarefa internacional que reúne pesquisadores de países endêmicos e não endêmicos com o

1. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO.

Financiamento: UNICEF/UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (grant A20509); ALM- American Leprosy Missions; The Heiser Foundation for TB and Leprosy; New York Community Trust, EUA.

**Endereço para correspondência:** Dra. Mariane Martins de Araújo Stefani. IPTSP/UFG. Rua Delenda Rezende Mello s/n Setor Universitário, 74605-050, Goiânia, GO.

Fone: 55 62 3209-6111; Fax: 55 62 3251-1839

e-mails: mstefani@iptsp.ufg.br; mariane.stefani@pq.cnpq.br

objetivo de desenvolver testes laboratoriais para o diagnóstico precoce da hanseníase (infecção) e identificar marcadores moleculares para o melhor entendimento da epidemiologia e transmissão da hanseníase com o objetivo final de conceber intervenções para prevenir a hanseníase<sup>3</sup>. Nosso grupo de pesquisa é parte do Consórcio IDEAL e como tal, tem trabalhado na iniciativa de diagnóstico da hanseníase.

O diagnóstico da hanseníase é baseado principalmente em manifestações clínicas e a escassez de sintomas no início da doença pode contribuir para erros no diagnóstico ou para o sub-diagnóstico. O diagnóstico precoce e a introdução do tratamento específico são importantes para reduzir fontes de transmissão e para prevenir doença grave com incapacidade e deficiência física. Antes da decodificação do genoma do *Mycobacterium leprae* a disponibilidade de novos antígenos era limitada principalmente devido ao fato do bacilo não ser cultivável em cultura axênica.

Comparações do genoma e do proteoma do *Mycobacterium tuberculosis* e do *Mycobacterium leprae* revelaram que o último sofreu redução evolutiva apresentando um genoma de 3.3 Mb comparado com 4.4 Mb do *Mycobacterium tuberculosis*<sup>8,9</sup>. O genoma do *Mycobacterium leprae* contém 1.133 pseudogenes e menos de 50% codifica genes funcionais, enquanto 90% do genoma do *Mycobacterium tuberculosis* é funcional. Observações detalhadas do genoma do *Mycobacterium leprae* indicam a existência de 1.614 fases de leitura aberta, potencialmente codificantes de proteínas funcionais, comparado com 3.993 para o *Mycobacterium tuberculosis*. A redução do genoma do *Mycobacterium leprae* resultou na eliminação de várias vias metabólicas importantes, justificando o seu habitat intracelular e a sua incapacidade de cultivo *in vitro*<sup>9</sup>.

Análises genômica e proteômica comparativas indicaram que entre os 1.614 genes/proteínas do *Mycobacterium leprae*, 1.429 são comuns ao *Mycobacterium tuberculosis* restando 165 proteínas, que parecem ser *Mycobacterium leprae*-específicas e potencialmente mais adequadas para o diagnóstico laboratorial da hanseníase. Informações recentes sobre genomas de micobactérias e ferramentas de biologia molecular trouxeram renovado interesse em novas abordagens para o diagnóstico baseadas em análises genômicas comparativas por bioinformática visando identificar proteínas exclusivas do *Mycobacterium leprae* que tenham potencial aplicação diagnóstica<sup>20-22</sup>. Esses antígenos podem fornecer ferramentas aprimoradas para o diagnóstico laboratorial que permitam auxiliar os métodos clínicos clássicos.

As características imunológicas das formas espectrais da hanseníase incluem pacientes tuberculóides paucibacilares (PB) que apresentam baixos títulos de anticorpos para o *Mycobacterium leprae* e forte resposta imune celular específica (RIC) do tipo Th1 caracterizada por produção de interferon gama (IFN- $\gamma$ ). As formas lepromatosas multibacilares (MB) apresentam altos títulos de anticorpos e RIC específica baixa ou ausente<sup>29</sup>. Portanto, testes laboratoriais para o diagnóstico da hanseníase PB e MB devem requerer tanto os ensaios baseados em anticorpos, como ensaios de células T. Recentemente vários

antígenos inéditos de *Mycobacterium leprae* têm sido testados como reagentes diagnósticos para hanseníase<sup>1 2 11 12 14 15 16 17 28 31</sup>.

### Testes laboratoriais para o diagnóstico da hanseníase

O estado da arte dos testes laboratoriais para hanseníase inclui a baciloscopia, que se baseia na detecção de bacilos álcool-ácido resistentes, em esfregaços de linfa e em biópsias de lesões de pele. O resultado é fornecido como índice baciloscópico (IB) porém este teste não apresenta especificidade e sensibilidade especialmente para formas PB. O exame histopatológico de lesão de pele pode auxiliar o diagnóstico clínico, especialmente quando são evidenciados agressão neural e bacilos. Entretanto, ambos os testes não fazem parte da rotina nos serviços de saúde pública e não são incluídos nos programas de controle de hanseníase em países endêmicos. Atualmente não existe nenhum teste laboratorial sensível e específico para o diagnóstico da infecção assintomática pelo *Mycobacterium leprae* ou para prever a progressão para hanseníase entre indivíduos expostos.

### Sorologia

Na área de sorodiagnóstico, a detecção de anticorpos IgM ao glicolípido fenólico I (PGL-I), um antígeno imunodominante do *Mycobacterium leprae*, representa o teste melhor padronizado e o mais avaliado na hanseníase. Vários formatos foram desenvolvidos para a detecção de anticorpos anti PGL-I: ELISA, aglutinação de partículas, *dipstick* e teste rápido de fluxo lateral. A sorologia anti PGL-I é altamente específica e a presença de anticorpos séricos se correlaciona com o IB dos pacientes MB. Entretanto, a sorologia anti PGL-I tem limitado valor diagnóstico para hanseníase PB, pois esta categoria de pacientes tem IB baixo ou ausente e é caracterizada por RIC, ao invés de resposta imune humoral. Além disso, em áreas endêmicas, uma proporção significativa de indivíduos saudáveis pode ter sorologia anti PGL-I positiva<sup>25</sup>. O consenso atual é de que os testes anti PGL-I deveriam ser usados juntamente com parâmetros clínicos para auxiliar a classificação de hanseníase MB e PB e para orientar decisões terapêuticas, fornecendo melhor especificidade que a simples contagem do número de lesões<sup>6,7</sup>.

Marcadores imunológicos e moleculares de progressão de doença foram investigados por nosso grupo de pesquisa numa coorte multicêntrica brasileira de pacientes com hanseníase paucibacilar lesão única, que são considerados a forma diagnóstica mais precoce da hanseníase. Neste estudo, em torno de 30% dos pacientes apresentou sorologia anti PGL-I positiva, corroborando baixa sensibilidade desta sorologia para hanseníase PB<sup>23-33</sup>. Como parte das atividades do IDEAL, nosso grupo e o grupo do Hospital de Anandaban (Nepal), recentemente compararam o desempenho de dois testes rápidos para PGL-I: O ML flow (KIT, Amsterdam, Holanda) que detecta anticorpos da classe IgM anti dissacarídeo natural-octil-BSA do PGL-I (ND-O-BSA) e o teste ML-ICA (Universidade de Yonsei, Coreia do Sul) que além de IgM, detecta anticorpos das classes IgG e IgA anti PGL-I que é empregado nas formas ND-O-BSA, trissacarídeo natural-fenil-BSA (NT-P-BSA) e dissacarídeo natural-octil-albumina sérica

humana (NDO-HAS). Sangue total e soro de casos de hanseníase MB e PB recém diagnosticados e sem tratamento, de contactantes intradomiciliares de MB e de controles saudáveis de área endêmica foram testados. No Brasil a positividade do ML Flow no soro foi mais alta que no sangue total, e entre pacientes PB, MB e contactantes domiciliares de pacientes MB a soropositividade do ML-Flow foi mais elevada que do ML-ICA<sup>18</sup>. Os resultados obtidos na população brasileira indicam que adicionalmente à detecção de IgM, a detecção de anticorpos das classes IgG e IgA em testes rápidos anti PGL-I, não elevou a sensibilidade nem influenciou o desempenho do teste para pacientes com hanseníase PB e MB. A análise comparativa dos resultados obtidos no Brasil e Nepal está em andamento.

Recentemente vários estudos baseados em sequências genômicas têm buscado identificar novas proteínas específicas ou peptídeos do *Mycobacterium leprae*, potencialmente adequados para o sorodiagnóstico da hanseníase. Em princípio, busca-se identificar antígenos do *Mycobacterium leprae* que possam ser associados ao antígeno PGL-I para aumentar sua especificidade e especialmente sua sensibilidade para hanseníase PB, representando uma ferramenta diagnóstica aprimorada para os programas de controle da hanseníase. Diferentes estudos avaliaram a imunoreatividade a várias proteínas recombinantes do *Mycobacterium leprae* em pacientes com hanseníase e controles. Foram testadas as proteínas recombinantes ML0308, ML1553, ML2177, ML2498, ML0410, ML1053, ML1055 e ML1056 em pacientes da Coreia do Sul e em controles saudáveis endêmicos e a proteína ML0308 apresentou a melhor reatividade<sup>2</sup>. Um painel de proteínas incluindo uma proteína de fusão ML0050-ML0049, ML0091, ML0317, ML0405, ML2028, ML0568, ML1213, ML2055, ML2655, ML0097, ML1812, ML2331 e ML2496 foi testado em soros de pacientes MB das Filipinas, pacientes com tuberculose (TB) e controles endêmicos. ML 0405 e ML 2331 foram as proteínas mais reativas<sup>28</sup>. ML0678, ML0757, ML2177, ML2244, ML2498 demonstraram ser fortes epítomos de células B quando testadas em TB, contactantes e pacientes com hanseníase do Mali e de Bangladesh<sup>1</sup>.

Nosso grupo de pesquisa em colaboração com o IDRI (Instituto de Pesquisa para Doenças Infecciosas, Seattle, EUA) testou a sororeatividade de ML0091, ML0405TR (sem região transmembrana), ML1633, ML2055, ML2331, ML2346, ML1556 em pacientes brasileiros com hanseníase PB e MB, pacientes com tuberculose, contactantes intradomiciliares de MB e controles endêmicos saudáveis. Esses antígenos também foram testados em soros de pacientes com hanseníase e de controles das Filipinas. ML2331, ML0405TR, ML2055 e ML0091 foram os antígenos mais reativos nos pacientes do Brasil<sup>11</sup>. Em geral, os pacientes com hanseníase MB apresentaram maior sororeatividade, que foi baixa em pacientes PB. Diferentes padrões sorológicos foram observados entre os pacientes do Brasil e das Filipinas, sugerindo que diferenças no HLA, ou que diferenças antigênicas em cepas do *Mycobacterium leprae*, podem influenciar a imunogenicidade dos antígenos testados. Entretanto, independentemente da origem dos pacientes, as proteínas ML0405 e ML2331 foram as mais sororeativas. LID-1, uma nova proteína de fusão de ML0405 e ML2331 construída pelo IDRI, manteve a imunoreatividade

das proteínas originais sugerindo sua potencial aplicação diagnóstica<sup>11</sup>. Para melhor avaliar o potencial diagnóstico das novas proteínas do *Mycobacterium leprae* será necessário testá-las em estudos multicêntricos preferencialmente envolvendo vários países.

A tecnologia dos *microarranjos* representa uma outra estratégia para identificar novos antígenos com valor diagnóstico. Arranjos com proteínas isoladas da parede celular ou da membrana do *Mycobacterium leprae* ou com as proteínas recombinantes (ML0008, ML0957, ML1419, ML1157, ML1877, ML1829, ML0126, ML0396, ML1915, ML005) identificaram diferentes padrões de resposta imune humoral entre pacientes tuberculoides e lepromatosos<sup>19</sup>.

Em geral, os resultados dos estudos sorológicos pós-genômicos com várias proteínas recombinantes do *Mycobacterium leprae* refletem o espectro da hanseníase: altos títulos de anticorpos no pólo lepromatoso e baixos níveis no pólo tuberculóide. Além disso, novas proteínas recombinantes foram identificadas e estas, associadas ao antígeno PGL-I podem melhorar o diagnóstico sorológico de pacientes PB e MB. Novas proteínas de fusão incluindo os antígenos mais imunogênicos do *Mycobacterium leprae* como o antígeno LID-1, introduzem a possibilidade de geração de antígenos quiméricos que possam oferecer maior sensibilidade para a detecção de pacientes MB e possivelmente PB. Em parceria com o IDRI, nosso grupo tem trabalhado para avaliar a imunoreatividade e especificidade de novos antígenos que possam ser incorporados ao antígeno PGL-I, visando à obtenção de um teste de maior soropositividade entre pacientes MB e PB. O desenvolvimento de um novo teste sorológico, sobretudo no formato de teste rápido é considerado uma prioridade em pesquisa<sup>2 11 28</sup>.

### Ensaios baseados em resposta imune celular

As infecções micobacterianas como tuberculose e hanseníase são caracterizadas por resposta imune celular (RIC) e a hipersensibilidade do tipo tardia é considerada, uma manifestação da RIC. Desde a descrição do teste cutâneo de Mitsuda em 1919, várias tentativas foram feitas para se desenvolver testes cutâneos para hanseníase<sup>5</sup>. Atualmente a RIC para o *Mycobacterium leprae* tem sido avaliada por testes *in vitro* com células T, baseados na produção de IFN- $\gamma$ . O desenvolvimento de um teste diagnóstico baseado em RIC, que seja simples, aplicável em situações de campo e que possa ser utilizado em larga escala por programas de controle e de intervenção, poderá contribuir para o controle da hanseníase em países endêmicos.

Visto que os pacientes PB desenvolvem forte RIC ao *Mycobacterium leprae* e baixa produção de anticorpos, um teste laboratorial para o diagnóstico de doença PB deverá se basear na detecção da imunidade celular. Vários antígenos e peptídeos imunogênicos do *Mycobacterium leprae* foram descritos, entretanto, a reatividade cruzada de células T com *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* (bacilo Calmette-Guerin-BCG) ou com outras micobactérias ambientais não patogênicas, restringiu a aplicação diagnóstica dos mesmos, especialmente em países com alta incidência de tuberculose e com vacinação de rotina com BCG, como o Brasil<sup>4 16 32</sup>.



Em princípio, todas as 1.614 proteínas codificadas pelo genoma do *Mycobacterium leprae* deveriam ser avaliadas quanto a sua possível aplicação diagnóstica. Para evitar essa extensa testagem, a seleção de antígenos com potencial diagnóstico tem sido baseada em análises genômicas comparativas *in silico* empregando-se ferramentas de bioinformática, usando as diversas bases de dados públicas de genomas micobacterianos atualmente disponíveis. Esta abordagem visa identificar genes/proteínas exclusivas do *Mycobacterium leprae* que sejam seletivamente reconhecidas por pacientes com hanseníase, reduzindo assim as chances de reatividade cruzada. A seleção de antígenos também tem sido orientada por programas de bioinformática para prever nas proteínas do *Mycobacterium leprae*, epítomos promíscuos imunodominantes para células T que sejam capazes de se ligar a diferentes alelos de HLA classe II, favorecendo assim seu reconhecimento por populações geneticamente diferentes<sup>21</sup>.

A produção de IFN- $\gamma$  tem sido considerada como um marcador de RIC específica de memória ou efetora. Dois ensaios comercialmente disponíveis baseados em IFN- $\gamma$  usando antígenos específicos do *Mycobacterium tuberculosis* foram desenvolvidos para o diagnóstico desta infecção<sup>13</sup>. Espera-se que ensaios com células T de formato similar possam ser desenvolvidos para contribuir para o diagnóstico e pesquisa da hanseníase<sup>12 16</sup>. Baseado na resposta de IFN- $\gamma$ , novas proteínas e peptídeos do *Mycobacterium leprae* têm sido testados para o diagnóstico laboratorial da hanseníase PB. Antígenos candidatos para um teste baseado em RIC têm sido testados na forma de proteínas recombinantes, peptídeos sintéticos individuais do tipo 15 mer, 9 mer e combinação de peptídeos sintéticos 20 mer sobrepostos<sup>12 16 17 31</sup>.

A avaliação da imunogenicidade baseada em produção de IFN- $\gamma$  em ensaios de 24hs com sangue total heparinizado, diluído ou não-diluído, e células mononucleares periféricas (CMPs) geralmente usa como controles o meio de cultura, fitohemaglutinina, antígeno da parede celular do *Mycobacterium leprae* e PPD. Em geral, os testes de triagem têm sido conduzidos nos seguintes grupos de estudos: hanseníase PB e MB (comumente virgens de tratamento), contactantes intradomiciliares de MB, controles saudáveis endêmicos e não-endêmicos e pacientes com tuberculose. A produção de IFN- $\gamma$  a proteínas recombinantes e peptídeos tem sido estimada no plasma ou sobrenadante de cultura de CMPs. Embora o IFN- $\gamma$  venha sendo amplamente usado como um indicador indireto de imunidade celular protetora, a identificação de outros marcadores indiretos de imunidade protetora é importante área de investigação e uma das atuais atividades de pesquisa do nosso grupo e do Consórcio IDEAL.

A lista de proteínas recombinantes do *Mycobacterium leprae* avaliadas por diferentes grupos quanto à capacidade de induzir RIC/IFN- $\gamma$  na hanseníase está se expandindo. RIC para 17 proteínas recombinantes, entre as quais a ML1989, ML1990, ML2283, ML2567, ML0576 foi avaliada em pacientes com hanseníase PB e MB, contactantes, pacientes com tuberculose e controles saudáveis do Rio de Janeiro<sup>14</sup>. ML2244c, ML1553, ML2177, ML2498,

ML0410, ML1053, ML1829, ML0410, ML1057, ML1056 e ML0308 foram reativas em pacientes com hanseníase e controles recrutados no Mali e em Bangladesh e em controles não-endêmicos de Paris<sup>2</sup>. ML2177, ML2498, ML0410 e ML1053 foram identificadas como estimuladores de RIC ao *Mycobacterium leprae* em pacientes com hanseníase recrutados na Coreia do Sul<sup>1</sup>.

A RIC para as proteínas recombinantes do *Mycobacterium leprae* ML0091, ML0276, ML0398, ML0541, ML0543, ML0840, ML0953, ML1011, ML1213, ML1623, ML2044, ML46f, ML56f (f=proteínas de fusão) foram avaliadas por nosso grupo, em parceria com o IDRI, em pacientes com hanseníase PB e MB, TB, contactantes, controles de área endêmica e não-endêmica. ML0276, ML1623, ML0840, ML2044 e ML46f foram identificadas como os melhores antígenos capazes de induzir RIC em pacientes PB e contactantes de MB<sup>12</sup>. Neste estudo algumas proteínas do *Mycobacterium leprae*, com alta homologia com proteínas do *Mycobacterium tuberculosis*, apresentaram RIC específica, sem reação cruzada, em pacientes com hanseníase. Por outro lado, proteínas sem nenhum homólogo no genoma/proteoma do *Mycobacterium tuberculosis* ou de outras micobactérias, foram reconhecidas por pacientes com tuberculose e hanseníase, por contactantes intradomiciliares e por controles endêmicos. Nossos resultados sugerem a necessidade de validação da previsão dos denominados *antígenos exclusivos do Mycobacterium leprae* identificados por análises genômicas comparativas *in silico* por estudos de campo conduzidos em regiões endêmicas e não-endêmicas.

Além de proteínas recombinantes, vários peptídeos sintéticos derivados de proteínas específicas e imunogênicas do *Mycobacterium leprae* também foram testados em pacientes com hanseníase e controles<sup>16 17 31</sup>. A estratégia de uso de peptídeos se baseia no achado de que proteínas recombinantes induzem níveis mais altos de IFN- $\gamma$ , mas aumentam as chances de reatividade cruzada, mesmo em seqüências com baixa homologia<sup>14</sup>. Além disso, RIC mais específicas foram observadas quando peptídeos derivados das proteínas mais imunogênicas do *Mycobacterium leprae* foram testadas<sup>17 31</sup>. Como parte das atividades do IDEAL, testamos a produção de IFN- $\gamma$  a proteínas recombinantes do *Mycobacterium leprae* e vários peptídeos selecionados usando sangue total e CMPs. Além do Brasil, o mesmo protocolo foi testado na Etiópia, Bangladesh, Paquistão e Nepal. Neste estudo, respostas específicas de células T em pacientes com hanseníase e contactantes de pacientes MB foram observadas para peptídeos derivados de ML2283 e ML0126, indicando potencial como reagente para diagnóstico<sup>16</sup>.

Em geral, os estudos baseados em RIC em hanseníase mostram que a estimulação de células em sangue total ou de CMPs com antígenos selecionados induz maior produção de IFN- $\gamma$  em contactantes intradomiciliares de MB e em pacientes com hanseníase tuberculóide PB. Os valores mais baixos são observados entre controles saudáveis não-endêmicos e em pacientes com hanseníase multibacilar e resultados variáveis são vistos em pacientes com TB e em controles saudáveis, o que pode indicar exposição prévia ao *Mycobacterium leprae* em área endêmica<sup>12 16 17 31</sup>. A alta produção de IFN- $\gamma$  entre contactantes de

MB, pode indicar imunidade protetora após exposição ou infecção subclínica. Estudos de coorte são necessários para esclarecer o real significado da RIC entre os contactantes intradomiciliares de pacientes com hanseníase MB.

Em conclusão, os estudos baseados em RIC na hanseníase têm indicado vários antígenos candidatos, proteínas recombinantes e peptídeos, com potencial aplicação diagnóstica para teste baseado na produção de IFN- $\gamma$ . Embora o número de proteínas recombinantes do *Mycobacterium leprae* testadas esteja aumentando, há uma longa lista de candidatos a ser avaliada, antes de se escolher o melhor antígeno e a sua melhor apresentação para um teste baseado em RIC para o diagnóstico da hanseníase PB. Tanto CMPs como sangue total têm sido utilizados com sucesso, entretanto um teste simples de 24 hs com sangue total parece um formato preferível, mais barato e de fácil execução em situações de campo nos países endêmicos.

### PCR para *Mycobacterium leprae*

A descoberta de seqüências espécie-específicas no genoma do *Mycobacterium leprae* introduziu os testes baseados em DNA e RNA como a reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção sensível e específica de bacilos. Vários antígenos/regiões-alvo têm sido usados para amplificação e a sensibilidade da reação de PCR para *Mycobacterium leprae* em pacientes para hanseníase PB tem aumentado, mas ainda está abaixo de 80%. Nosso estudo em casos de hanseníase paucibacilar com lesão única mostrou uma positividade de 43% para *Mycobacterium leprae* DNA-PCR em biópsias de pele. Além disso, a positividade para *Mycobacterium leprae* DNA por PCR foi associada com maior frequência a reação de tipo 1<sup>30</sup>. Mesmo a “relativa” baixa sensibilidade do ML-PCR em pacientes PB, deve ser considerada como um avanço, quando comparada com as baixas taxas de detecção do bacilo em tecidos e com a incapacidade em cultivá-lo *in vitro*.

PCR em tempo-real TaqMan foi demonstrada ser mais sensível que a PCR em tempo real convencional para detectar DNA do *Mycobacterium leprae* em amostras clínicas sem bacilos detectáveis por coloração histológica convencional<sup>24</sup>. PCR baseada em transcrito reverso do RNA ribossomal do *Mycobacterium leprae* foi proposta para o diagnóstico de hanseníase e para a determinação da viabilidade do bacilo<sup>27</sup>. Apesar da quantidade de informação nova sobre *Mycobacterium leprae*-PCR, esta metodologia permanece como uma ferramenta de pesquisa e não para o diagnóstico. Até o momento, *Mycobacterium leprae*-PCR não teve impacto na rotina diagnóstica uma vez que representa uma técnica que depende de equipamento especializado, tem custo relativamente alto e ainda apresenta sensibilidade relativamente limitada para os casos PB.

### Considerações finais

O uso de ensaios para detectar a produção de RIC/IFN- $\gamma$  a proteínas recombinantes ou peptídeos do *Mycobacterium leprae* juntamente com uma versão modificada da sorologia anti PGL-I, deve permitir a detecção da maioria das formas de hanseníase PB e

MB. Testes baseados em RIC poderão detectar infecção subclínica e permitir o tratamento de formas precoces da doença. Neste contexto, o desenvolvimento de teste simples e rápido para uso em campo, tal como teste de aglutinação que possa ser testado em uma gota de sangue ou de saliva poderá contribuir para o diagnóstico e controle da hanseníase. Um teste sensível, específico e simples para o executor em situações de campo, que seja estável à temperatura ambiente, com longo período de validade e baixo custo, pode promover um impacto significativo nos programas de controle da hanseníase em países endêmicos<sup>10 26</sup>. Novos antígenos do *Mycobacterium leprae* revelados na era pós genômica poderão fornecer testes diagnósticos que permitam detecção da infecção recente ou testes com potencial valor prognóstico ou testes adequados para classificação da hanseníase<sup>10</sup>. Além da possibilidade de identificar infecção subclínica, novos testes laboratoriais podem auxiliar no entendimento dos padrões de transmissão e de vigilância em nível populacional.

### REFERÊNCIAS

1. Araoz R, Honore N, Banu S, Demangel C, Cissoko Y, Arama C, Uddin MK, Hadi SK, Monot M, Cho SN, Ji B, Brennan PJ, Sow S, Cole ST. Towards an immunodiagnostic test for leprosy. *Microbes and Infection* 8: 2270-2276, 2006.
2. Araoz R, Honore N, Cho S, Kim JP, Cho SN, Monot M, Demangel C, Brennan PJ, Cole ST. Antigen discovery: a postgenomic approach to leprosy diagnosis. *Infection and Immunity* 74: 175-182, 2006.
3. Aseffa A, Brennan P, Dockrell H, Gillis T, Hussain R, Oskam L, Richardus JH. Report on the first meeting of the IDEAL (Initiative for Diagnostic and Epidemiological Assays for Leprosy) consortium held at Armauer Hansen Research Institute, ALERT, Addis Ababa, Ethiopia on 24-27 October 2004. *Leprosy Review* 76: 147-159, 2005.
4. Booth RJ, Williams DL, Moudgil KD, Noonan LC, Grandison PM, McKee JJ, Prestidge RL, Watson JD. Homologs of *Mycobacterium leprae* 18-kilodalton and *Mycobacterium tuberculosis* 19-kilodalton antigens in other mycobacteria. *Infection and Immunity* 61: 1509-1515, 1993.
5. Brennan PJ. Skin test development in leprosy: progress with first-generation skin test antigens, and an approach to the second generation. *Leprosy Review* 71 (suppl): S50-S54, 2000.
6. Buhner-Sekula S, Smits HL, Gussenhoven GC, van Leeuwen J, Amador S, Fujiwara T, Klatser PR, Oskam L. Simple and fast lateral flow test for classification of leprosy patients and identification of contacts with high risk of developing leprosy. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 1991-1995, 2003.
7. Buhner-Sekula S, Visschedijk J, Grossi MA, Dhakal KP, Namadi AU, Klatser PR, Oskam L. The ML flow test as a point of care test for leprosy control programmes: potential effects on classification of leprosy patients. *Leprosy Review* 78:70-79, 2007.
8. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE, Tekaiia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Squares S, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S, Barrell BG. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393(6685): 537-544, 1998.
9. Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, Honore N, Garnier T, Churcher C, Harris D, Mungall K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies RM, Devlin K, Duthoy S, Feltwell T, Fraser A, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Lacroix C, Maclean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Quail MA, Rajandream MA, Rutherford KM, Rutter S, Seeger K, Simon S, Simmonds M, Skelton J, Squares R, Squares S, Stevens K, Taylor K, Whitehead S, Woodward JR, Barrell BG. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature* 409: 1007-1011, 2001.

10. Corstjens PL, Zuiderwijk M, Tanke HJ, van der Ploeg-van Schip JJ, Ottenhoff TH, Geluk A. A user friendly, highly sensitive assay to detect the IFN- $\gamma$  secretion by T cells. *Clinical Biochemistry* 41: 440-444, 2008.
11. Duthie MS, Goto W, Ireton GC, Reece ST, Cardoso LP, Martelli CM, Stefani MM, Nakatani M, de Jesus RC, Netto EM, Balagon MV, Tan E, Gelber RH, Maeda Y, Makino M, Hof D, Reed SG. Use of protein antigens for early serological diagnosis of leprosy. *Clinical and Vaccine Immunology* 14: 1400-1408, 2007.
12. Duthie MS, Goto W, Ireton GC, Reece ST, Sampaio LH, Grassi AB, Sousa ALM, Martelli CM, Balagon MVE, Tan E, Stefani MM, Reed SG. Antigen-specific T cell responses of leprosy patients. *Clinical and Vaccine Immunology* 15:1659-1665, 2008.
13. Ferrara G, Losi M, D'Amico R, Roversi P, Piro R, Meacci M, Meccugni B, Dori IM, Andreani A, Bergamini BM, Mussini C, Rumpianesi F, Fabbri LM, Richeldi L. Use in routine clinical practice of two commercial blood tests for diagnosis of infection with *Mycobacterium tuberculosis*: a prospective study. *Lancet*. 367: 1328-1334, 2006.
14. Geluk A, Klein MR, Franken KL, van Meijgaarden KE, Wiele B, Pereira KC, Buhner-Sekula S, Klatser PR, Brennan PJ, Spencer JS, Williams DL, Pessolani MC, Sampaio EP, Ottenhoff TH. Postgenomic approach to identify novel *Mycobacterium leprae* antigens with potential to improve immunodiagnosis of infection. *Infection and Immunity* 73: 5636-5644, 2005.
15. Geluk A, Ottenhoff TH. HLA and leprosy in the pre and postgenomic eras. *Human Immunology* 67: 439-445, 2006.
16. Geluk A, Spencer JS, Pessolani MCV, Pereira GMB, Banu S, Honoré N, Reece S, MacDonald M, Ranjit C, Sapkota B, Bobosha K, Zewdie M, Aseffa A, Hussain R, Stefani M, Cho R, Oskam L, Brennan PJ, Dockrell HM. From Genome to Leprosy Diagnostics: from *in silico* predictions to *ex vivo* verification. *Clinical and Vaccine Immunology*. in press.
17. Geluk A, van der Ploeg J, Teles RO, Franken KL, Prins C, Drijfhout JW, Sarno EN, Sampaio EP, Ottenhoff TH. Rational combination of peptides derived from different *Mycobacterium leprae* proteins improves sensitivity for immunodiagnosis of *M. leprae* infection. *Clinical and Vaccine Immunology* 15: 522-533, 2008.
18. Grassi AB, Sampaio LH, Martelli CM, Cho R, Oskam L, Buhner-Sékula S. Comparison Between two Rapid Tests for Anti PGL-I Serology. *Proceedings of the 17<sup>th</sup> International Leprosy Congress*, Hyderad, India. 206, 2008.
19. Groathouse NA, Amin A, Marques MA, Spencer JS, Gelber R, Knudson DL, Belisle JT, Brennan PJ, Slayden RA. Use of protein microarrays to define the humoral immune response in leprosy patients and identification of disease-state-specific antigenic profiles. *Infection and Immunity* 74: 6458-6466, 2006.
20. [http://www.sanger.ac.uk/Projects/M\\_tuberculosis/](http://www.sanger.ac.uk/Projects/M_tuberculosis/). 2007.
21. <http://www.imtech.res.in/raghava/propred>. 2008.
22. <http://genolist.pasteur.fr/Leproma>. Leproma World-Wide Web Server, 2004.
23. Martelli CM, Stefani MM, Gomes MK, Rebello PF, Peninni S, Narahashi K, Maroclo AL, Costa MB, Silva SA, Sacchetim SC, Nery JA, Salles AM, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Andrade AL. Single lesion paucibacillary leprosy: baseline profile of the Brazilian Multicenter Cohort Study. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases* 68: 247-257, 2000.
24. Martinez AN, Britto CF, Nery JA, 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. *Journal of Clinical Microbiology* 44: 3154-3159, 2006.
25. Oskam L, Slim E, Buhner-Sekula S. Serology: recent developments, strengths, limitations and prospects: a state of the art overview. *Leprosy Review* 74: 196-205, 2003.
26. Peeling RW, Smith PG, Bossuyt PM. A guide for diagnostic evaluations. *Nature Reviews Microbiology* 4(supl 12): S2-S6, 2006.
27. 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 Immunology and Medical Microbiology* 48: 319-328, 2006.
28. Reece ST, Ireton G, Mohamath R, Guderian J, Goto W, Gelber R, Groathouse N, Spencer J, Brennan P, Reed SG. ML0405 and ML2331 are antigens of *Mycobacterium leprae* with potential for diagnosis of leprosy. *Clinical and Vaccine Immunology* 13: 333-340, 2006.
29. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. *Clinical Microbiology Reviews* 19: 338-381, 2006.
30. Sousa AL, Stefani MM, Pereira GA, Costa MB, Rebello PF, Gomes MK, Narahashi K, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Martelli CM. *Mycobacterium leprae* DNA associated with type 1 reactions in single lesion paucibacillary leprosy treated with single dose rifampin, ofloxacin, and minocycline. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 77: 829-833, 2007.
31. Spencer JS, Dockrell HM, Kim HJ, Marques MA, Williams DL, Martins MV, Martins ML, Lima MC, Sarno EN, Pereira GM, Matos H, Fonseca LS, Sampaio EP, Ottenhoff TH, Geluk A, Cho SN, Stoker NG, Cole ST, Brennan PJ, Pessolani MC. Identification of specific proteins and peptides in *Mycobacterium leprae* suitable for the selective diagnosis of leprosy. *Journal of Immunology* 175: 7930-7938, 2005.
32. Spencer JS, Marques MA, Lima MC, Junqueira-Kipnis AP, Gregory BC, Truman RW, Brennan PJ. Antigenic specificity of the *Mycobacterium leprae* homologue of ESAT-6. *Infection and Immunity* 70: 1010-1013, 2002.
33. Stefani MM, Martelli CM, Gillis TP, Krahenbuhl JL. *In situ* type 1 cytokine gene expression and mechanisms associated with early leprosy progression. *Journal of Infectious Diseases* 188: 1024-1031, 2003.
34. World Health Organization. Global leprosy situation, 2006. *Weekly Epidemiological Record*. 81: 309-316, 2006.