



UFG

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
E SAÚDE PÚBLICA**

EMERITH MAYRA HUNGRIA PINTO

**Reatividade sorológica a proteínas recombinantes do
Mycobacterium leprae em diferentes grupos
populacionais de distintas regiões endêmicas do Brasil**

**Goiânia
2013**

Termo de Ciência e de Autorização para Disponibilizar as Teses e Dissertações Eletrônicas (TEDE) na Biblioteca Digital da UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás-UFG a disponibilizar gratuitamente através da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações – BDTD/UFG, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ **Dissertação** ☐ **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor(a):	Emerith Mayra Hungria Pinto				
CPF:	024624531-05	E-mail:	emerith0706@hotmail.com		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? ☒ Sim ☐ Não					
Vínculo Empregatício do autor					
Agência de fomento:	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico			Sigla:	CNPq
País:	Brasil	UF:	Goiás	CNPJ:	
Título:	Reatividade Sorológica a Proteínas Recombinantes do <i>Mycobacterium leprae</i> em Diferentes Grupos Populacionais de Distintas Regiões Endêmicas do Brasil				
Palavras-chave:	Hanseníase, Sorologia e Proteínas Recombinantes				
Título em outra língua:	Seroreactivity to new <i>Mycobacterium leprae</i> protein antigens in different leprosy endemic regions in Brazil				
Palavras-chave em outra língua:	Leprosy, Serology and Recombinant Proteins				
Área de concentração:	Imunologia				
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	27/02/2013				
Programa de Pós-Graduação:	Medicina Tropical e Saúde Pública				
Orientador(a):	Mariane Martins de Araújo Stefani				
CPF:	260.258.841-53	E-mail:	mstefani@iptsp.ufg.br		

3. Informações de acesso ao documento:

Liberção para disponibilização?¹ ☒ total ☐ parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

☐ Capítulos. Especifique:

☐ Outras restrições:

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação. O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Emerith Mayra Hungria Pinto

Assinatura do(a) autor(a)

Data: 13 / 03 / 2013

¹ Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.

EMERITH MAYRA HUNGRIA PINTO

**Reatividade sorológica a proteínas recombinantes
do *Mycobacterium leprae* em diferentes grupos
populacionais de distintas regiões endêmicas do Brasil**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Medicina
Tropical e Saúde Pública da Universidade
Federal de Goiás para obtenção do
Título de Mestre em Medicina Tropical e
Saúde Pública.

Orientadora: Prof^a Dra. Mariane Martins
de Araújo Stefani

Financiamento: DECIT/ CNPq, Heiser Foundation for TB and Leprosy, NY,USA,
American Leprosy Missions.

**Goiânia
2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
GPT/BC/UFG

P659r Pinto, Emerith Mayra Hungria.
Reatividade sorológica a proteínas recombinantes do
Mycobacterium leprae em diferentes grupos populacionais de
distintas regiões endêmicas do Brasil [manuscrito] / Emerith
Mayra Hungria Pinto. – 2013.
104 f. : il.

Orientadora: Prof^a Prof^a. Dr^a. Mariane Martins de Araújo
Stefani.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás,
Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2013.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.

Anexos.

1. *Mycobacterium leprae* (Hanseníase) – Brasil. 2. Sorologia.
3. Proteínas recombinantes. I. Título.

CDU:616-002.73

**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública
da Universidade Federal de Goiás**

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno (a): Emerith Mayra Hungria Pinto

Orientador (a): Mariane Martins de Araújo Stefani

Membros:

1. Prof^a. Dr^a Gisner Alves de Souza Pereira – Unievangélica/Anápolis/GO

2. Prof^a Dr^a Miriam Cristina Leandro Dorta – IPTSP/UFG

3. Prof^a. Dr^a Mariane Martins de Araújo Stefani - Orientadora

Data: 27/02/2013

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou como era antes.”

Marthín Luther King

AGRADECIMENTOS

A Deus, por seu amor e misericórdia derramados sobre minha vida todos os dias.

Meus pais: Divino e Sirlene. Essa caminhada só foi possível com o apoio de vocês. Obrigada por toda ajuda financeira, pelas palavras de apoio, confiança e pelo amor e carinho. Vocês são o que tenho de melhor!

Ao meu irmão Eduardo, pela ajuda, compreensão e carinho. Você é muito especial para mim!

Ao meu noivo José Luís, por sua paciência e presença constante ao meu lado. Obrigada por escutar meus desabafos, minhas angústias e por me incentivar sempre.

Profª Gisner, você me apresentou a Imunologia e fiquei apaixonada por esse mundo novo. Sua dedicação, determinação e inteligência foram grandes incentivadoras. Você foi peça chave para que eu realizasse esse mestrado. Obrigada pela confiança!

Minha orientadora Profª Drª Mariane Stefani, obrigada por aceitar me orientar, por sua confiança, pelo exemplo de disciplina, seriedade e competência e, sobretudo pela disposição em me ensinar. Cresci muito graças a essa experiência! Obrigada pela oportunidade!

Aos colegas do Laboratório de Imunologia da Aids e Hanseníase: Aline, Regiane, Ludimila, Rodrigo, Danielle, Mônica, Yanna, Keila, Maurício Barcelos e Ana Lúcia, obrigada pelas trocas de experiência, pelo companheirismo, cumplicidade, pela disposição em ajudar e ensinar, pelas conversas sobre imunologia, hanseníase e sobre a vida. Obrigada pela amizade!

Aos colegas de outros laboratórios obrigada pelo convívio e troca de experiências.

As minhas primas: Dalila e Priscila. Quando me mudei para Goiânia a presença de vocês foi essencial. Obrigada pela amizade e carinho!

Ao meu Tio Thiago e meu primo Rhilkey: depois de tanto tempo de convivência, acho que não sou mais sobrinha ou prima, me tornei irmã. Obrigada por tudo!

A toda minha família pelo incentivo!

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública pelos ensinamentos prestados.

A banca de Qualificação: Dr^a Samira Bühner-Sékula, Miriam Leandro Dorta e Isabela Wastowski pela contribuição científica.

Aos funcionários do IPTSP/UFG pela competência e disponibilidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudo.

Ao Prof^o Marcos Virmond, coordenador do Projeto DECIT-CNPq e ao grupo de pesquisa em hanseníase do Instituto Lauro de Souza Lima, em especial a Vânia Nieto Brito de Souza pela coleta das amostras e apoio nas demais fases de execução deste estudo.

Ao DECIT-CNPq, Heiser Foundation for TB and Leprosy e American leprosy Missions pela viabilização deste estudo.

E a todos que contribuíram de alguma maneira nesta caminhada.

Meu sincero obrigada!

SUMÁRIO

Agradecimentos.....	iii
Sumário.....	v
Tabelas, Figuras e Anexos.....	vii
Lista de abreviaturas.....	viii
Resumo.....	xii
Abstract.....	xiii
1.INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Hanseníase.....	1
1.2 Epidemiologia.....	2
1.3 <i>Mycobacterium leprae</i>	3
1.4 Genoma do <i>M. leprae</i>	5
1.5 Imunologia da Hanseníase.....	6
1.6 Formas Clínicas da Hanseníase.....	11
1.7 Reações Hansênicas.....	13
1.8 Fontes de infecção e transmissão do <i>M. leprae</i>	16
1.9 Diagnóstico da Hanseníase.....	18
1.9.1 Diagnóstico Clínico.....	18
1.9.2 Diagnóstico laboratorial.....	18
1.9.2.1 Baciloscopia e Exame Histopatológico.....	18
1.9.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase para DNA de <i>M. leprae</i>	19
1.9.2.3 Testes Sorológicos.....	20
2.JUSTIFICATIVA.....	30
3. OBJETIVOS.....	32

4. MÉTODOS.....	33
4.1 Área geográfica e Grupos de estudo.....	33
4.1.1 Rondonópolis/Mato Grosso.....	33
4.1.2 Vila do Prata em Igarapé-Açu/ Pará.....	35
4.2 Critérios de Inclusão/ exclusão.....	37
4.3 Produção das proteínas recombinantes do <i>M.leprae</i>	37
4.4 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para detecção de IgG para as proteínas recombinantes.....	38
4.5 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para detecção de IgM para o PGL-I	39
4.6 Aspectos éticos.....	40
4.7 Análises estatísticas.....	40
5. RESULTADOS.....	41
5.1 Características gerais dos grupos de estudo.....	41
5.2 Reatividade sorológica as proteínas recombinantes do <i>M. leprae</i> entre os participantes de Rondonópolis/MT.....	42
5.3 Reatividade sorológica as proteínas recombinantes do <i>M. leprae</i> entre os participantes da Vila do Prata/PA.....	47
6.DISSCUSSÃO.....	50
7.CONCLUSÃO.....	60
8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
9. ANEXOS.....	75

TABELAS, FIGURAS E ANEXOS

Figura 1. Coeficiente geral de detecção de hanseníase por municípios de Mato Grosso	34
Figura 2. Coeficiente geral de detecção de hanseníase por municípios do Pará	36
Tabela 1. Composição e características principais dos grupos de estudo	42
Figura 3. Reatividade sorológica as proteínas recombinantes do <i>M. leprae</i> (92f, 46f, LID-1, ML0405 e ML1213) e PGL-I entre os participantes de Rondonópolis/MT	43
Figura 4. Sororeatividade para as proteínas recombinantes do <i>M. leprae</i> (92f, 46f, LID-1, ML0405 e ML1213) e PGL-I em indivíduos previamente tratados com MDT de Rondonópolis/MT	46
Figura 5. Reatividade sorológica as proteínas recombinantes do <i>M. leprae</i> (92f, 46f, LID-1, ML0405 e ML1213) e PGL-I entre os participantes da Vila do Prata/PA	47
Figura 6. Sororeatividade para as proteínas recombinantes do <i>M. leprae</i> (92f, 46f, LID-1, ML0405 e ML1213) e PGL-I em indivíduos previamente tratados com MDT da Vila do Prata/PA	49
Anexo 1. Parecer do Comitê de Ética	75
Anexo 2. Artigo	76

LISTA DE ABREVIATURAS

A/G/C/T	Bases nitrogenadas adenina, guanina, citosina e timina
ASC	Proteína associada a apoptose contendo domínios CARD
BB	Hanseníase Borderline
BL	Hanseníase Borderline Lepromatosa
BLAST	“Basic Local Alignment Search Tool”
BSA	Soro albumina bovina
BT	Hanseníase Borderline Tuberculóide
CARD	Domínio de recrutamento e ativação de caspases
CD	“Cluster of differentiation”
CMI	Imunidade mediada por células
CR	Receptor para proteínas do complemento
CTLA-4	Antígeno associado a linfócito citotóxico-4
CXCL10	Quimiocina (motivo C-X-C) ligante dez
DAHW	Associação Alemã de Assistência aos Hansenianos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
DPP	“Dual-path platform”
CS	Controle saudável
ELISA	“Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”
ENH	Eritema nodoso hansênico

FDA	“Food and Drug Administration/USA”
FSC- GM	Fator estimulador de colônia- granulócitos e macrófagos
FSC-G	Fator estimulador de colônia- granulócitos
CD	Contato Domiciliar
HLA	“Human leukocyte antigen”
IB	Índice baciloscópico
IDEAL	“Initiative for Diagnostic and Epidemiological Assays for Leprosy”
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
IDRI	“ Infectious Disease Research Institute/USA”
IFN γ	Interferon Gama
Ig	Imunoglobulina
IGRAs	“Interferon-Gamma Release Assays”
IL	Interleucina
INDEL	Inserções/Deleções
IPTSP	Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
LAM	Lipoarabinomanana
LF	“Lateral flow”
LIAH	Laboratório de Imunologia da AIDS e da Hanseníase
LID-1	“Leprosy IDRI Diagnostic Antigen”
LL	Hanseníase Lepromatosa
LM	Lipomanana
MAPIA	“Multiantigen Print Immunoassay”

MB	Multibacilar
MCP-1	Proteína quimioatraente de monócitos-1
MDP	Dipeptídeo muramil
MDT	Multidrogaterapia
MIP-1	Proteína inflamatória de macrófagos -1
NF-kB	Fator nuclear kB
NGS	Soro normal de cabra
NK	Célula natural killer
NLR	Receptor NOD-like
NOD2	“Nucleotide binding oligomerization domain 2”
OMS	Organização Mundial de Saúde
PB	Paucibacilar
PBS	Solução Tampão Salina Fosfatada
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDIM	Tiocerol dimicocerosatos
PGL-I	Glicolípídeo fenólico- I
PGLs	Glicolípídeos fenólicos
PNUD	Programa das Nações Unidas para Desenvolvimento
PRRs	Receptores de reconhecimento padrão
RIC	Resposta imune celular
RIP2	Receptor para Tirosina Quinase 2
RR	Reação Reversa

RT1	Reação hansênica tipo 1
RT2	Reação Tipo 2
SNPs	“Single Nucleotide Polymorphisms”
TB	Tuberculose
TCLE	Termo de Consentimento Livre Esclarecido
TGF- β	Fator de crescimento transformador- β
Th	Célula T auxiliar
TLR	Receptor Toll-like
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
TT	Hanseníase Tuberculóide
UBS	Unidade Básica de Saúde
UFG	Universidade Federal de Goiás
VNTR	“Variable Number Tandem Repeat”
WBA	“Whole blood assay”

RESUMO

Introdução: O desenvolvimento de testes laboratoriais para o diagnóstico/classificação das diferentes formas clínicas da hanseníase é tema prioritário em pesquisa. O sequenciamento completo do genoma do *Mycobacterium leprae*, avanços em técnicas de clonagem e expressão gênica e novas ferramentas de bioinformática promoveram a produção e a disponibilidade de novas proteínas recombinantes para avaliação imunológica.

Objetivo: O objetivo deste estudo foi avaliar reatividade sorológica a proteínas recombinantes do *M. leprae* em pacientes com hanseníase e controles de duas áreas hiperendêmicas para hanseníase do Brasil: Rondonópolis/MT e Vila do Prata/Igarapé-Açu/PA.

Materiais e Métodos: A presença de anticorpos IgG para as proteínas recombinantes do *M. leprae* (92f, 46f, LID-1, ML0405 e ML1213; 2 µg/ml) e IgM para o trissacarídeo sintético do PGL-I (NT-P-BSA; 0.01 µg/ml) foi avaliada por ELISA. Os grupos de estudo incluíram (n=847): pacientes recém diagnosticados com hanseníase (paucibacilar- PB e multibacilar- MB) virgens de tratamento, contatos domiciliares de MB (CD), controles saudáveis de área endêmica (CS) e casos antigos de hanseníase MB que concluíram a multidrogaterapia (MDT) (pós MDT).

Resultados: Entre os participantes de Rondonópolis/MT (n=764), a soropositividade de pacientes MB (n=58) foi de 59% para 92f, 81% para 46f, 89% para LID-1, 84% para ML0405; 83% apresentaram IgM para PGL-I. Dentre 10 pacientes MB soronegativos para PGL-I, 5 reagiram com LID-1 e 4 reconheceram 92f, 46f e ML0405. Entre os pacientes PB (n=93) as taxas de sororeatividade para as proteínas recombinantes variaram de 5-16% e 8% apresentaram sorologia anti- PGL-I positiva. Nos CD (n=192) e CS (n=282) as taxas de reatividade variaram de 3-7%. No grupo pós MDT as taxas de positividade variaram de 17-45%. Na Vila do Prata a taxa de positividade para as proteínas recombinantes nos CD (n=36) variou de 3-8% e 11% dos CD apresentaram anticorpos anti-PGL-I. Entre os indivíduos pós MDT (n=47) as taxas de reatividades variaram de 33-50%.

Conclusões: Taxas de positividade acima de 80% foram detectadas para proteínas recombinantes do *M. leprae*- 46f, ML0405 e LID-1 em pacientes com hanseníase MB com diferentes características genéticas/ étnicas de distintas regiões geográficas. Estes resultados indicam que o desenvolvimento de um teste sorológico para hanseníase que associe proteínas recombinantes e PGL-I tem o potencial de detectar a grande maioria dos pacientes MB provenientes de diferentes regiões hiperendêmicas. O uso deste teste pelo sistema de saúde pública poderá contribuir para o diagnóstico e tratamento precoces da hanseníase MB que são cruciais para o controle/eliminação da doença no Brasil.

Palavras chave: hanseníase, sorologia, proteínas recombinantes

ABSTRACT

Introduction: The development of laboratory tests applicable for the diagnosis/classification of the different clinical forms of leprosy is considered a research priority. The completion of *Mycobacterium leprae* genome together with new gene cloning/expression techniques and new bioinformatic tools have promoted the production and availability of new *M. leprae* recombinant proteins for immunologic assessment. **Goal:** This study assessed the serologic reactivity to *M. leprae* recombinant proteins among leprosy patients and controls from two hiperendemic regions in Brazil: “Rondonópolis/MT” and “Vila do Prata/Igarapé-Açu/PA” (former leprosy colony).

Material and Methods: IgG antibodies to *M. leprae* recombinant proteins (92f, 46f, LID-1, ML0405 e ML1213; 2 µg/ml) and IgM antibodies for the PGL-I synthetic trissacaride (NT-P-BSA; 0.01 µg/ml) were detected by ELISA. The following study groups were included (n=847): newly diagnosed untreated leprosy patients (paucibacillary- PB and multibacillary- MB), household contacts of MB patients (HHC), healthy endemic controls (EC) and former MB that concluded leprosy multidrug therapy (MDT) (post MDT).

Results: Among participants from Rondonópolis/MT (n=764), the seropositivity of MB patients (n=58) was 59% for 92f, 81% for 46f, 89% for LID-1, 84% for ML0405; 83% were anti-PGL-I positives. Among 10 anti PGL-I negative MB patients, 5 recognized LID-1 e 4 had IgG antibodies to 92f, 46f and ML0405. Among PB leprosy patients (n=93) seropositivity rates to *M. leprae* recombinant proteins ranged from 5-16%; 8% were anti PGL-I positives. In the HHC (n=192) and in the EC groups (n=282) low reactivity rates were detected ranging from 3-7%. For the post MDT group, positivity rates ranged from 17-45%. Among participants from “Vila do Prata” 3-8% of HHC were seropositives for recombinant proteins; 11% were anti- PGL-I positives. In the post MDT group from “Vila do Prata” (n=47) 33-50% were seropositives for recombinant proteins.

Conclusion: High positivity rates to *M. leprae*- 46f, ML0405 e LID-1 were detected among MB leprosy patients with different genetic/ethnic profiles from distinct geographical regions. These results indicate that the development of a serologic test for leprosy employing both *M. leprae* recombinant proteins and PGL-I can potentially detect the majority of MB patients from different hiperendemic regions. The use of this diagnostic tool by the public health system can contribute for the early diagnosis and treatment of MB disease which are crucial for the control/elimination of leprosy in Brazil.

Key words: Leprosy, serology, recombinant proteins.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Hanseníase

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica que tem como agente etiológico o *Mycobacterium leprae*, um bacilo gram positivo, intracelular obrigatório que acomete mais frequentemente macrófagos de pele e células de Schwann de nervos periféricos (Scollard et al. 2006).

O comprometimento dos nervos periféricos é a principal característica da hanseníase, conferindo grande potencial para provocar incapacidades e deformidades físicas (Ridley & Jopling 1966). Esta característica está associada ao estigma, preconceito e exclusão social contra portadores da doença. O termo lepra ainda é utilizado em muitos países, mas no Brasil foi substituído por hanseníase devido ao seu caráter estigmatizante, através da Lei Nº 9.010, de 29 de março de 1995 (Brasil. Lei 9.010, 1995).

A hanseníase é uma doença com período de incubação geralmente longo, podendo variar em média de dois a dez anos. Acredita-se que bacilos provenientes das vias aéreas superiores de pacientes bacilíferos sem tratamento representem a forma mais importante de transmissão da doença (Shepard 1960). Estima-se que 95% da população global seja resistente a infecção pelo *M. leprae*, embora não existam técnicas para o diagnóstico de infecção subclínica (Scollard et al. 2006). A hanseníase é uma doença associada a pobreza e se mantém endêmica apenas em países em desenvolvimento. Estudo realizado em 165 municípios do Ceará mostrou que baixo nível de escolaridade, desigualdade na distribuição de renda, má nutrição e urbanização não planejada estão associadas a hanseníase (Kerr-Pontes et al. 2004). O Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) é baseado em dados como expectativa de vida, escolaridade e renda média, seu cálculo é realizado anualmente pelo Programa das Nações Unidas para Desenvolvimento (PNUD) e sua escala varia de 0- 1, sendo um o melhor índice. O índice é usado como

uma referência da qualidade de vida e desenvolvimento sem se prender apenas a índices econômicos. O país com mais alto IDH em 2011 foi a Noruega, que alcançou a marca de 0.943, o Brasil ocupa a posição 84º com um IDH de 0.718. O pior IDH entre os países avaliados é o da República Democrática do Congo, com índice de 0.286 e os cinco países com pior IDH são Chade, Moçambique, Burundi, Níger e República Democrática do Congo (PNUD 2011). Destes países podemos ressaltar que o Brasil, República Democrática do Congo e Moçambique não atingiram a meta de eliminação da hanseníase estipulada pela OMS (WHO 2010). A Noruega foi endêmica para hanseníase em meados do século 19 (36.8 casos novos/100.000 habitantes), entretanto entre 1870 -1920 houve um significativo declínio nas taxas de incidência e raros casos foram registrados a partir de 1920 (0.3 casos novos/100.000 habitantes). Em 1873 quando o *M. leprae* foi identificado como o agente etiológico da hanseníase, o isolamento de indivíduos doentes foi proposto como uma maneira de diminuir a transmissão. Entretanto, o isolamento não é considerado o único responsável pelo declínio das taxas de transmissão na Noruega e fatores como melhores condições de alimentação e crescimento da renda per capita são associados ao controle da hanseníase neste país. Importante salientar que nesta época não havia tratamento antimicrobiano efetivo para hanseníase (Meima et al. 2002).

1.2. Epidemiologia

Na década de 1990 a Organização Mundial de Saúde (OMS) estabeleceu como meta a eliminação da hanseníase como problema de saúde pública no mundo até o ano 2005. A eliminação foi definida como a redução da taxa global de prevalência abaixo de um caso a cada 10.000 habitantes (WHO 1991). Com a introdução da multidrogaterapia (MDT), a partir da década de 1980 (WHO 1982), a prevalência global de hanseníase reduziu em mais de 80% nos últimos 30 anos. Em 1985 foram registrados 5.400.000 pessoas com hanseníase no mundo, uma prevalência de 10 casos a cada 10.000 habitantes, em 2005 houve um significativo declínio nas taxas de prevalência, sendo registrados 211.845 casos, com taxa de prevalência global menor que um caso/10.000 habitantes (WHO 1988; WHO 2005).

O boletim anual da OMS informou que prevalência global de hanseníase

registrada no ano de 2010 foi de 228.474 casos (0.39 casos/10.000 habitantes). Esses dados mostram que a meta de prevalência global de menos de um caso de hanseníase para cada 10 mil habitantes foi atingida. Porém alguns países (Brasil, República Democrática do Congo, Madagascar, Moçambique, Nepal e Tanzânia) ainda não atingiram a meta de eliminação estipulada pela OMS (WHO 2010). A alta prevalência nestes países demonstra transmissão ativa do *M. leprae* apesar da estratégia de eliminação baseada na MDT (Fine 2006). No Brasil no ano de 2010 foram registrados 34.894 casos novos de hanseníase (WHO 2011) e no estado de Goiás o coeficiente de prevalência foi de 3,3 casos/10 mil habitantes, correspondendo à média endemidade (Ministério da Saúde/Sistema Nacional de Vigilância em Saúde/Relatório de Situação Goiás 2011).

A estratégia atual da OMS é reduzir o número de casos novos diagnosticados com grau de incapacidade dois para taxas $\geq 35\%$ em todo mundo até o final de 2015. O grau de incapacidade é determinado a partir da avaliação neurológica dos olhos, mãos e pés e tem seu resultado expresso em valores que variam de 0 (zero) a II (dois). No grau zero, o paciente não apresenta perda de sensibilidade ou deformidades físicas. O grau um é caracterizado pela presença de regiões anestésicas, sensibilidade corneana diminuída e ausência de deformidades físicas. O grau dois é caracterizado pela presença de mão em garra, pé caído, reabsorção óssea e alterações como lagofalmo e/ou ectrópio nos olhos (Ministério da Saúde 2002). Espera-se que esta meta global, estimule atividades que reduzam atrasos no diagnóstico e favoreça a administração imediata da MDT (WHO 2009).

1.3. *Mycobacterium leprae*

O *M. leprae* foi descrito pela primeira vez pelo médico norueguês Gerhard Armauer Hansen em 1873, em nódulos de pacientes lepromatosos, representando a primeira associação convincente de um microorganismo com uma doença humana (Lowy & Ridley 1954).

O *M. leprae* é um bacilo não cultivável em meios de cultura axênicos (artificiais) e seu crescimento é restrito a modelos animais, incluindo tatus e camundongos. Em 1960 Shepard obteve crescimento de *M. leprae* derivado da mucosa nasal de pacientes lepromatosos em coxim plantar de camundongos

(Shepard 1960). O tatu de nove bandas (*Dasypus novemcinctus*) é naturalmente susceptível a infecção pelo *M. leprae*, estes animais adquirem uma infecção progressiva e sistêmica com disseminação para pele, linfonodos, fígado e baço. Nos Estados Unidos tatus encontrados em Louisiana, Texas e Mississippi se apresentavam naturalmente infectados pelo *M. leprae* (Walsh et al. 1981; Walsh et al. 1986; Truman 2005).

A transmissão experimental em macacos das espécies Rhesus, Mangabey e African Green representam bons modelos animais para hanseníase, mas estes primatas não fornecem grandes quantidades de antígenos (Wolf et al. 1985).

A taxa de duplicação do *M. leprae* é extremamente lenta quando comparada a de outras bactérias, apresentando um ciclo replicativo de 12,5 dias em média. A temperatura ótima para seu crescimento é de 27°C a 30°C, que é concordante com a observação clínica de crescimento preferencial em locais mais frios do corpo como pele, mucosa nasal e nervos periféricos (Jacobson & Krahenbuhl 1999).

O *M. leprae* é um bastonete reto ou levemente curvo, álcool- ácido resistente. Nos esfregaços de pele e nos cortes histopatológicos os bacilos podem ser vistos isolados ou em grupamentos. Em decorrência da infecção pelo *M. leprae* ocorre redução na produção de mielina pelas células de Schwann infectadas e destruição por reações imuno-mediadas, gerando dano neural e perda de sensibilidade (Ridley & Jopling 1966).

As células de Schwann fornecem um ambiente favorável a sobrevivência do *M. leprae*, devido a uma menor resposta do sistema imune nestas células e pelo fato das células de Schwann não possuírem capacidade de produzir moléculas antimicrobianas capazes de limitar o crescimento do bacilo. Além disso, a barreira entre o sangue e os nervos limita a ação de drogas antimicrobianas (Rambukkana 2001).

A parede celular do *M. leprae* é constituída de uma camada de peptidoglicano associado por ligações covalentes a arabinogalactana. Os ácidos micólicos, lipídeos característicos do seu envelope celular, estão ligados a resíduos terminais de arabinose da arabinogalactana. Sua camada mais externa é composta por moléculas como o tiocerol dimicocerosatos (PDIMs), fosfatidil-inusitol, manosídeos, lipomanana (LM), lipoarabinomananas (LAM) e

grandes quantidades de glicolipídeos fenólicos (PGLs) (Scollard et al. 2006). O *M. leprae* possui três tipos de PGLs (PGL-I, -II, -III), sendo que o PGL-I confere especificidade imunológica ao *M. leprae* e é altamente antigênico. Os outros dois PGLs são produtos autolíticos do PGL-I (Spencer & Brennan 2011).

Estudos sugerem que o PGL-I se liga especificamente ao domínio G da cadeia $\alpha 2$ da laminina das células de Schwann, sugerindo o envolvimento do PGL-I nas interações do bacilo com os nervos periféricos (Rambukkana et al. 1997; Rambukkana 2000). Outra molécula essencial para a interação entre o bacilo e a célula de Schwann é a α -dystroglicana que funciona como receptor para laminina dentro da membrana celular (Rambukkana et al. 1998). O PGL-I também está envolvido na proteção do *M. leprae* dos mecanismos antimicrobianos do macrófago por meio da inativação de espécies reativas do oxigênio (Neill & Klebanoff 1988).

1.4. Genoma do *M. leprae*

Em 2001 o grupo de pesquisa do Doutor Steward Cole publicou a sequência do genoma completo do *M. leprae*. Este genoma contém 3.268.203 pares de base e um conteúdo de G+C (Guanina + Citosina) de 57,8% (Cole et al. 2001). Estes valores são muito menores do que os encontrados no genoma do *Mycobacterium tuberculosis*, que possui 4.411.532 pares de base e 65,6% de G+C (Cole et al. 1998). Somente 49,5% do genoma do *M. leprae* possui genes codificadores de proteínas, 27% do genoma são pseudogenes e os 23,5% restantes correspondem a seqüências regulatórias ou remanescentes de genes mutados. A distribuição dos pseudogenes é aleatória e quando estes são excluídos, restam 1.604 genes potencialmente ativos, sendo que 1.439 são comuns ao *M. tuberculosis*. Dos 165 genes sem ortólogos no *M. tuberculosis*, somente 29 possuem funções definidas (Cole et al. 2001).

Considerando-se a existência de um ancestral comum para as micobactérias, uma extensa diminuição de tamanho do genoma e rearranjos devem ter ocorrido durante a evolução do *M. leprae*. A análise comparativa dos proteomas do *M. tuberculosis* e *M. leprae* detectou 391 proteínas solúveis, em comparação com 1.800 no *M. tuberculosis*, confirmando que os pseudogenes são inertes. Durante o processo evolutivo o bacilo de hansen parece ter perdido mais de 2.000 genes (Cole et al. 1998; Cole et al. 2001).

Vários microbiologistas tentaram obter o crescimento do *M. leprae* em cultura axênica e somente após a decodificação do genoma foi possível entender que a perda maciça de genes reduziu sua capacidade metabólica de maneira que ele se tornou um bacilo intracelular obrigatório e altamente especializado. Comparativamente o metabolismo lipídico do *M. leprae* é bem menor do que o do *M. tuberculosis* (Cole et al. 2001).

A análise da diversidade genética e filogeografia de cepas do *M. leprae* de diversas regiões do globo foi feita em 2009 pelo grupo do Dr. Stewart Cole. Foram genotipadas 175 cepas de *M. leprae*, provenientes de 21 regiões geográficas representando os cinco continentes do globo. Foram analisadas em diferentes cepas do *M. leprae* a distribuição de polimorfismos de base única (Single Nucleotide Polymorphisms – SNPs). Os SNPs são alterações da sequência de DNA que ocorrem quando um único nucleotídeo (A, T, C, ou G) na sequência do genoma é trocado. A análise demonstrou uma variabilidade genética e filogenética extremamente baixa entre as diferentes cepas do *M. leprae*, as quais são pertencentes a um dos quatro padrões de SNPs (Monot et al. 2009).

Este estudo mostrou também uma correlação entre a origem geográfica do isolado e o perfil de SNPs encontrados. Os resultados mostram 4 padrões de SNPs de acordo com a região geográfica. O padrão de SNP tipo 1 ocorre predominantemente na Ásia, região do pacífico e leste da África. O padrão de SNP tipo 2 foi detectado na Etiópia, Malawi, Nepal e norte da Índia. O padrão de SNP tipo 3 aparece na Europa, norte da África e América. O Padrão de SNP tipo 4 ocorre no Caribe e na África Oriental.

Conclusões sobre a análise filogeográfica dos isolados sugeriram que a disseminação do bacilo provavelmente ocorreu por meio de soldados de Alexandre, o Grande (Século IV a.C) que invadiram a África e depois voltaram para a Europa e Oriente Médio, assim como pelo tráfico de escravos e migração dos povos. A rota comercial entre Europa e Ásia conhecida como rota da seda apresentou papel na disseminação da doença da Europa para o Extremo Oriente (Monot et al. 2009).

1.5. Imunologia da Hanseníase

Em humanos o perfil da resposta imune frente a infecção pelo *M. leprae* determina o curso da doença e o desenvolvimento das diferentes formas clínicas. Tendo em vista que a principal forma de transmissão do bacilo ocorre pelas vias respiratórias, as células dendríticas da mucosa nasal do hospedeiro devem representar as primeiras células do sistema imune que reconhecem o bacilo por meio dos receptores de reconhecimento padrão (PRR) (Demangel & Britton 2000).

Dentre os PRR que participam do reconhecimento do *M. leprae* temos os receptores das proteínas do complemento CR1 (CD35) e principalmente CR3 (CD11b/CD18) que se ligam ao PGL-I (glicolípido fenólico I ou fenoglicolípido) promovendo a fagocitose do *M. leprae* (Tabouret et al. 2010).

Os receptores Toll-like (TLR) são cruciais para o reconhecimento de microorganismos por macrófagos e células dendríticas durante a resposta imune inata (Hart & Tapping 2012). Até o momento já foram identificados dez TLRs em humanos, nomeados de TLR 1-10. Os heterodímeros de TLR2-TLR1 e os homodímeros TLR2 e TLR4 são essenciais para o reconhecimento de micobactérias (Scollard et al. 2006). Esses receptores estimulam a produção de peptídeos e proteínas antimicrobianas, citocinas como IL-1 β , IL-6, TNF- α e quimiocinas que coletivamente induzem a uma resposta inflamatória local, além de aumentar a fagocitose e morte mediada por macrófagos ativados (Pasare & Medzhitov 2004).

O heterodímero (TLR2-TLR1) foi mais fortemente expresso em lesões da forma tuberculóide quando comparado com lesões da forma lepromatosa (Montoya & Modlin 2010). Dois SNPs no TLR4 foram associados com efeito protetor para hanseníase. E polimorfismos no TLR9 que reconhece CpG DNA também foi associado a resistência a infecção. Os polimorfismos genéticos através de deleções ou inserções em TLR2 foram associados com maior risco de desenvolver reação reversa (Hart & Tapping 2012).

As células de Schwann expressam em sua superfície os receptores TLR1 e TLR2. A ativação destas células via TLR2 pela proteína de 19 kDa do *M. leprae* induziu a apoptose, sendo este efeito reduzido pelo bloqueio com anticorpos anti-TLR2. O papel das citocinas TNF- α , IL-6 e IL-8 na apoptose

mediada por TLR2 ainda não está claro. A apoptose gera injúria nervosa e perda de sensibilidade, contudo é uma via que aumenta a liberação de antígenos intracelulares que podem ser fagocitados por macrófagos e células dendríticas e assim ativar a resposta imune adaptativa (Oliveira et al. 2003).

Os Receptores “Scavenger” de macrófagos (CD36) podem se ligar a moléculas de fosfolípido oxidado da parede celular do *M. leprae*, facilitando a fagocitose do bacilo (Mosser & Edwards 2008). Lesões tuberculóides expressam IL-15, enquanto lesões lepromatosas expressam IL-10. Macrófagos estimulados por IL-10 realizam fagocitose excessiva de bacilos via receptores scavenger e receptores de manose, mas apresentam atividade microbiana limitada, dessa forma o bacilo se acumula dentro do macrófago. Já macrófagos estimulados por IL-15 apresentam uma atividade fagocítica menor, entretanto apresentam vias antimicrobianas dependentes da vitamina D e conseguem eliminar os bacilos fagocitados (Montoya et al. 2009).

Dentre os PRRs para patógenos intracelulares, temos o receptor NOD2 (nucleotide binding oligomerization domain 2), um receptor citoplasmático pertencente da família de receptores NOD-like (NLR). Foram identificados 22 receptores NLR em humanos e 33 em camundongos, envolvidos na detecção de patógenos no citoplasma e ativação de cascatas inflamatórias (Pedra et al. 2009). Como o *M. leprae* tem replicação intracelular foi proposto que esses receptores desempenhem papel no reconhecimento do bacilo. O receptor NOD2 reconhece peptideoglicano, incluindo o derivado de micobactérias como o *M. leprae* pela ligação a dipeptídeos muramil (MDP) presentes no peptideoglicano. O MDP é capaz de ativar o inflamassoma, um complexo multiproteico composto por NLRs, proteína adaptadora ASC (proteína associada a apoptose contendo domínios CARD- domínios de recrutamento e ativação de caspases) e a molécula central do complexo: a caspase -1. Após ativação do complexo ocorre a clivagem de pró-citocinas pela caspase-1 e secreção das formas ativas de IL-1 β , IL-18 e IL-33 (Chen & Pedra 2010; Modlin 2010). A relevância de NOD2 na patogênese da hanseníase foi demonstrada em um estudo de associação de genoma completo (Genomewide Association Study) realizado com 706 pacientes com hanseníase e 1225 controles saudáveis recrutados no leste da China (Zhang et al. 2009). Este estudo identificou uma associação significativa entre a manifestação de hanseníase

multibacilar e SNPs nos genes CCDC122, C13orf31, NOD2, TNFSF15, HLA-DR e RIPK2 e uma tendência para uma associação com um SNP no gene LRRK2. Este estudo sugere que os SNPs em NOD2 e RIP2 estão entre os mais relevantes na suscetibilidade a desenvolver hanseníase multibacilar.

A célula dentrítica deve ser a primeira célula da imunidade inata a encontrar o bacilo. Após o reconhecimento e fagocitose do *M. leprae* pode ocorrer a liberação de citocinas e quimiocinas que regulam a inflamação e modulam a resposta imune adaptativa para o tipo Th1 ou Th2 (Scollard et al. 2006). A polarização da resposta imune para o tipo Th1 é eficaz para destruição do bacilo e confere resistência a doença, a qual se apresenta de forma mais localizada. Já a polarização da resposta imune para o tipo Th2 não é eficaz para destruir os bacilos, pois induz produção de anticorpos que são ineficazes contra bacilos intracelulares, conferindo susceptibilidade a hanseníase que tende a se apresentar de forma disseminada (Arnold & Flad 1990; Britton 1993).

No pólo tuberculóide da hanseníase, a resposta predominante é do perfil Th1 com produção das citocinas próinflamatórias, como IFN- γ , TNF- α , IL-12, IL18, IL-23 e IL-2, que são responsáveis pela manutenção da resposta imune celular com intensa atividade fagocítica e destruição dos bacilos (Barnes et al. 1992; Murphy et al. 2003). Entretanto, a resposta imune celular gerada pode ser maléfica para as células adjacentes infectadas ou não. A lesão neural e a perda de sensibilidade são conseqüências imunopatológicas de resposta do tipo Th1 (Yamamura et al. 1992).

O IFN- γ é bem conhecido por suas atividades microbicidas, aumentando a produção de intermediários reativos do oxigênio e nitrogênio por macrófagos, estimulando-os a eliminar os microorganismos fagocitados. A atenuação de uma resposta Th1, pela interferência na produção ou ação do IFN- γ afeta a capacidade de eliminação de microorganismos intracelulares (Boehm et al. 1997). A expressão de IFN- γ apresentou maiores níveis em lesões TT quando comparadas às lesões LL (Cooper et al. 1989; Yamamura 1991; Moubasher et al. 1998; Stefani et al. 2003).

A IL-12 foi inicialmente descrita com fator estimulador de células natural killer (NK), devido a sua capacidade de ativar as células NK, aumentando a

função citotóxica destas células e estimulando-as a liberar IFN- γ . A IL-12 dirige a diferenciação dos linfócitos T CD4⁺ para o perfil Th1, consequentemente iniciando a imunidade mediada por células (CMI) (Scott 1993; Spellberg & Edward 2001).

O TNF- α é uma citocina próinflamatória, que ativa o fator nuclear κ B (NF- κ B), que é importante na patogênese de infecções por micobactérias. O nível desta citocina é maior no soro de pacientes com a forma tuberculóide do que em pacientes lepromatosos. Esta citocina participa da imunidade protetora na hanseníase contribuindo para a formação do granuloma, mas por outro lado, seus efeitos podem resultar em imunopatologia, tais como dano aos nervos periféricos e necrose tecidual (Barnes et al. 1992; Khanolkar-Young et al. 1995; Roach et al. 2002).

Na forma lepromatosa ocorre o desenvolvimento de imunidade do tipo humoral (Th2), com vigorosa produção de anticorpos (Yamamura et al. 1991). A subpopulação de linfócitos Th2 produz principalmente IL-4, IL-13 e IL-5 que estimulam a proliferação de linfócitos B e sua diferenciação em plasmócitos. Os antígenos PGL-I e lipoarabinomanana (LAM) apresentam função supressora na ativação dos macrófagos, favorecendo a polarização para resposta do tipo Th2 com a produção de citocinas supressoras como fator de crescimento transformador- β (TGF- β), IL-10 e IL-4 (Foss 1999).

Várias subpopulações de linfócitos T CD4⁺ tem sido descritas, entre elas as células T regulatórias (Sakaguchi et al. 1995), que são caracterizadas fenotipicamente pela expressão de CD25 (cadeia α do receptor para IL-2) e pelo fator de transcrição Foxp3 (Sakaguchi & Powrie 2007). As células T regulatórias são responsáveis pela imunomodulação e homeostasia, evitando respostas exacerbadas e dano tecidual ao hospedeiro. Estas células são capazes de produzir citocinas imunossupressoras, como IL-10 e TGF- β e induzem supressão mediada por contato célula-célula por meio da molécula CTLA-4 (antígeno associado a linfócito citotóxico- 4) (Maloy & Powrie 2001).

Na hanseníase um maior número de células T regulatórias foi observado na circulação sangüínea de pacientes do que nos controles saudáveis. E em relação às formas clínicas da hanseníase, uma maior porcentagem desta população celular é encontrada nos pacientes com

hanseníase tuberculóide em comparação com os pacientes do pólo lepromatoso da doença. Nos pacientes do pólo tuberculóide as células T regulatórias poderiam regular a resposta imune frente ao patógeno. Já no pólo lepromatoso a pequena expressão das células T regulatórias favorece a progressão da doença e uma resposta imune humoral exacerbada (Attia et al. 2010).

Outro estudo avaliou a presença de células T regulatórias em lesões de pele de pacientes com hanseníase (Massone et al. 2010). Em pacientes TT e BT, as células Foxp3 positivas foram encontradas dentro e no contorno do granuloma. Já nos pacientes BL e LL essas células estavam espalhadas difusamente no infiltrado de macrófagos. Não houve diferença estatisticamente significativa na expressão de Foxp3 nas lesões de pele das diferentes formas clínicas (TT, BT, BL e LL), mas houve uma tendência ($p= 0.042$) de aumento na coloração FoxP3 em biópsias de pacientes com reação hansênica tipo I em comparação a pacientes com reação hansênica tipo II e em pacientes sem reação. Desta forma, os autores sugerem que as células T regulatórias desempenhem papel patogênico na hanseníase, limitando a habilidade do sistema imune responder de forma efetiva ao *M. leprae*.

Um recente estudo avaliou em paralelo a expressão de células T regulatórias na circulação e em lesões de pacientes com hanseníase, contatos domiciliares e controles saudáveis (Palermo et al. 2012). Uma maior proporção de células T regulatórias e IL-10 foram encontradas na circulação de pacientes lepromatosos. Já a produção de IFN- γ e resposta linfoproliferativa foram maiores entre os pacientes com hanseníase tuberculóide. Resultados similares foram obtidos nas lesões de pele, com duas vezes mais células T regulatórias, IL-10 e CTLA-4 nas lesões de pacientes lepromatosos.

1.6. Formas Clínicas da Hanseníase

A hanseníase é uma doença espectral, onde a resposta imune do hospedeiro determina o desenvolvimento das diferentes formas clínicas (Ridley & Jopling 1966). Geralmente se manifesta através de lesões de pele com alteração de sensibilidade. As lesões geralmente se apresentam como manchas eritematosas ou hipocrômicas, infiltrações, nódulos, tubérculos ou placas (Jopling 1971). As alterações de sensibilidade (tátil, térmica e dolorosa)

podem ser causadas pela ação do bacilo nos nervos ou pela resposta do sistema imune frente ao bacilo (Ridley & Jopling 1966; Sehgal et al. 1977). A neurite pode levar a perda da força muscular, com posterior paralisia, o que pode originar incapacidades e deformidades físicas permanentes (Ministério da Saúde 2001a).

Em 1966 Ridley e Jopling propuseram um método para classificação da hanseníase em formas polares e intermediárias. Esta classificação é utilizada para fins científicos e é baseada em critérios clínicos, baciloscópico, histopatológico e imunológico. De acordo com estes critérios a hanseníase pode ser classificada em formas polares: tuberculóide (TT) e lepromatosa (LL) e em formas intermediárias: borderline-tuberculóide (BT), borderline (BB) e borderline-lepromatosa (BL). As formas polares TT e LL são consideradas imunologicamente estáveis (Ridley & Jopling 1966). Hanseníase Tuberculóide (TT): apresenta maior resistência ao bacilo devido ao desenvolvimento de forte resposta imune celular específica (RIC) e fraca produção de anticorpos. Os pacientes geralmente apresentam poucas lesões de pele com sensibilidade reduzida, na forma de placas ou manchas bem delimitadas. Na hanseníase TT pode ocorrer perda de pêlos e anidrose. A baciloscopia é negativa e no exame histopatológico de lesões de pele observa-se a formação de granulomas bem delimitados com presença de células epitelióides, células gigantes multinucleadas (Langhans) no centro da lesão circundadas por um halo denso de linfócitos (Ridley & Jopling 1966).

A hanseníase lepromatosa (LL) é caracterizada por alta produção de anticorpos e resposta imune celular específica fraca ou ausente e corresponde ao pólo de baixa resistência ao *M. leprae*. As lesões apresentam limites imprecisos e são do tipo pápulas, nódulos, placas ou tubérculos, podendo apresentar ulcerações e infiltrações difusas, sendo mais acentuadas na face e nos membros. O exame histopatológico evidencia um infiltrado celular composto de histiócitos multivacuolados com citoplasma contendo grande quantidade de lipídeos, o que confere a essas células aspecto espumoso, sendo conhecidas como células de Virchow. Nos pacientes LL a baciloscopia é fortemente positiva, portanto estes pacientes não tratados representam um importante foco infeccioso e reservatório do bacilo (Ridley & Jopling 1966).

As formas intermediárias da hanseníase mesclam características dos

pólos estáveis da doença (TT e LL), apresentando grande instabilidade imunológica. A hanseníase borderline-tuberculóide (BT) apresenta lesões de pele bem delimitadas e um maior número de lesões e de troncos nervosos acometidos que na forma TT. O histopatológico revela granuloma formado por células epitelióides, células de Langhans e observa-se um halo de linfócitos. A baciloscopia geralmente é negativa ou apresenta raros bacilos (Ridley & Jopling 1966).

A hanseníase borderline (BB) é também conhecida como forma dimorfa e caracteriza-se por poucas lesões de pele com limites externos imprecisos, ou ainda múltiplas lesões bem definidas, “porosas”, conhecidas como lesões em “renda” ou “queijo suíço” (Ridley & Jopling 1966). A baciloscopia geralmente é positiva. Ao exame histopatológico observa-se a presença de bacilos e células epitelióides. As células gigantes e os linfócitos em geral são escassos e pode-se observar edema intra e inter celular. A hanseníase borderline-lepromatosa (BL) é caracterizada por lesões numerosas e disseminadas, que apresentam bordas mal definidas. A baciloscopia é positiva e no histopatológico são visualizados macrófagos não diferenciados e grande quantidade de bacilos (Ridley & Jopling 1966).

Em 1991 a OMS propôs uma classificação simplificada com base no número de lesões de pele, para fins operacionais e para definição do tratamento específico. O tratamento da hanseníase compreende regimes de multidrogaterapia (MDT) que incluem uma combinação de drogas bactericidas como a rifampicina e drogas bacteriostáticas como a dapsona e clofazimina que associadas minimizam a seleção de cepas resistentes. Segundo esta classificação os pacientes com hanseníase PB apresentam até 5 lesões de pele e incluem as formas TT e BT. O esquema terapêutico para pacientes PB recomendado pela OMS inclui uma dose mensal supervisionada de rifampicina (600 mg) e doses diárias auto-administradas de dapsona (100 mg) durante 6 meses. Pacientes multibacilares (MB) apresentam mais de 5 lesões de pele e incluem as formas BB, BL e LL. Para pacientes MB o tratamento preconizado pela OMS é de 12 meses, com uma dose mensal supervisionada de rifampicina (600 mg), clofazimina (300 mg) e dapsona (100 mg) e doses diárias auto-administradas de clofazimina (50 mg) e dapsona (100 mg) (WHO 1991).

1.7. Reações Hansênicas

O curso crônico da hanseníase pode ser interrompido por complicações inflamatórias agudas denominadas reações hansênicas. Os quadros reacionais podem ocorrer antes, durante ou após a MDT (Kumar et al. 2004). Não raro o paciente procura atendimento médico e é diagnosticado durante o episódio reacional, já que muitas vezes o quadro reacional leva o paciente à hospitalização.

As reações hansênicas ocorrem em aproximadamente 30% dos pacientes com hanseníase e podem acometer qualquer forma clínica da doença, porém são mais frequentes em pacientes com as formas LL, BL, BB e BT. Durante a reação hansênica pode ocorrer dano neural com subsequente perda de sensibilidade, paralisias e deformidades físicas irreversíveis. Portanto, as reações devem ser rapidamente diagnosticadas e tratadas (Scollard et al. 2006). Existe um grande interesse em se identificar marcadores clínicos e laboratoriais que identifiquem pacientes com risco de desenvolver reação. As reações hansênicas podem ser iniciadas por fatores como: infecções intercorrentes, vacinação, gravidez, puerpério, uso de medicamentos iodados, estresse físico e emocional (Cuevas et al. 2007; Walker & Lockwood 2008).

Existem duas formas principais de reações hansênicas, as quais apresentam diferentes mecanismos imunológicos envolvidos. A reação do tipo I (RT1) ou reação reversa (RR) é caracterizada por um aumento da resposta inflamatória local, tanto nas lesões de pele como nos nervos. A RT1 afeta predominantemente pacientes com as formas intermediárias (borderline), sendo esta classificação considerada fator de risco para o desenvolvimento de reação tipo I (Roche et al. 1991). Entretanto, uma pequena proporção de pacientes com formas polares (TT e LL) podem desenvolver esse tipo de reação (Kumar et al. 2004). A RT1 pode ocorrer em qualquer período, mas frequentemente ocorre durante a MDT ou durante o puerpério (Duncan 1993). Entre fatores de risco para desenvolvimento da reação tipo I estão o gênero feminino e múltiplas lesões no momento do diagnóstico (Walker & Lockwood 2008; Kumar et al. 2004; Stefani et. al 2009). A RT1 resulta de aumento na resposta imune celular aos antígenos do *M. leprae* e geração de resposta inflamatória local com aumento da atividade microbicida do macrófago (Little et

al. 2001). Na RT1 ocorre participação ativa de linfócitos T, com produção de citocinas Th1 (IL-2 e IFN- γ) e citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α . O TNF- α foi considerado uma das principais citocinas iniciadoras do dano neural (Khanolkar-Young et al. 1995; Moraes et al. 1999). O tratamento para RT1 consiste no uso de corticoesteróides orais em doses baixas por semanas ou meses. Geralmente são utilizadas doses diárias de 40 mg de prednisona, após a melhora do quadro reacional a dose deve ser diminuída em 5 mg a cada duas ou quatro semanas (Walker & Lockwood 2006).

A reação do tipo II (RT2) ou eritema nodoso hansênico (ENH) ocorre em pacientes multibacilares (BL e LL) que são caracterizados por imunidade celular fraca ou ausente ao *M. leprae* (Scollard 2006). Os fatores de risco para desenvolvimento da RT2 são: classificação LL, gênero feminino e alto índice baciloscópico (>3) (Kumar et al. 2004). Geralmente a RT2 tem início abrupto, os nódulos eritematosos podem se desenvolver na face, extremidades ou tronco, sem predileção pelas lesões pré-existentes. Os pacientes com RT2 geralmente apresentam febre, dores nas articulações, mal-estar, linfomegalia, edema de mãos e pés, neurites e hepatoesplenomegalia (Smith 2000). O curso natural da reação tipo II é de 1 a 2 semanas, período em que os nódulos regredem com a administração de fármacos específicos, mas alguns pacientes podem apresentar múltiplos episódios recorrentes durante vários meses (Cuevas et al. 2007). A imunopatogênese do ENH compreende uma reação inflamatória sistêmica relacionada à deposição de imunocomplexos, gerando infiltração de neutrófilos e ativação do sistema complemento (Ridley & Ridley 1983; Kahawita & Lockwood 2008; Mastrangelo et al. 2008). Contudo, alguns estudos sugerem que ocorra ativação transitória da imunidade mediada por células, fato demonstrado pelas altas concentrações das citocinas IFN- γ (Sreenivasan et al. 1998), TNF- α (Sarno et al. 1991), IL-2, IL-6 (Moraes et al. 1999) e queda nos níveis das citocinas IL-10 e IL-4 (Nath et al. 2000). O tratamento da RT2 é realizado com corticoesteróides e talidomida, que controlam o episódio inflamatório e a dor (Walker & Lockwood 2006). O uso da talidomida na hanseníase obedece a rigorosos critérios de prescrição, principalmente em mulheres em idade reprodutiva e também em homens devido a sua ação teratogênica. Metabólitos da talidomida foram detectados no

sêmens e homens que fazem uso da talidomida devem fazer sexo protegido por preservativo (Franks et al. 2004; WHO 1998). Em 1998 o FDA (Food and Drug Administration) aprovou o uso da talidomida para o tratamento da RT2, devido aos efeitos antiinflamatórios deste fármaco (Walker et al. 2007). A talidomida inibe a liberação de citocinas próinflamatórias por modular a sinalização via NF κ B e MAPK p38 (Hernandez et al. 2011).

O fenômeno de Lúcio foi descrito em 1852 por Rafael Lúcio e Ignácio Alvarado, dois médicos mexicanos, que deram o nome de “Hanseníase Manchada” ou “Hanseníase Lazarina”. Em 1948, Lapatí e Zamora identificaram a vasculite como lesão básica presente no histopatológico (Cuevas et al. 2007). O fenômeno de Lúcio é uma reação tipo II, com apresentação clínica peculiar. Apresenta-se como hanseníase lepromatosa não nodular, infiltrada, com múltiplos infartos hemorrágicos na pele, as lesões isquêmicas começam como máculas que rapidamente se tornam úlceras com bordas irregulares (Kaur et al. 2005). Ocorre em pacientes lepromatosos não tratados ou em pacientes que apresentam recidivas, entretanto apenas casos esporádicos são descritos (Sehgal 2005). Acredita-se que esta manifestação seja mediada por imunocomplexos, devido a deposição de imunoglobulina G (IgG) e componente C3 do sistema complemento nas paredes dos vasos sanguíneos, além da presença de imunocomplexos circulantes (Cuevas et al. 2007).

1.8. Fontes de infecção e transmissão do *M. leprae*

O mecanismo de transmissão da hanseníase ainda não foi totalmente esclarecido, embora se considere que a transmissão pessoa-pessoa por meio das vias respiratórias superiores seja a rota mais comum. Muitas pessoas podem se infectar com o *M. leprae*, mas apenas uma pequena minoria, cerca de 5% desenvolvem a doença clínica (Rodrigues & Lockwood 2011). Pacientes multibacilares podem eliminar bacilos de sua mucosa nasal e são considerados o principal reservatório do bacilo até o início da MDT (Van Beers et al. 1999). Contatos de pacientes MB apresentam risco aumentado de desenvolver hanseníase em relação à população geral, sendo que o risco para desenvolver a doença depende do tipo de contato, que deve ser íntimo e prolongado. O índice bacilar do caso índice também é um fator relevante no risco de transmissão. Contatos de pacientes MB tem maior risco de desenvolver

hanseníase que contatos de pacientes PB (Moet et al. 2004).

Uma outra possível forma de transmissão é pela via cutânea, por meio do contato com hansenomas de pele ulcerados (Job et al. 2008). As secreções orgânicas como leite, esperma, suor e secreção vaginal de pacientes com hanseníase, podem conter bacilos, mas acredita-se que não apresentam relevância na disseminação da infecção (Talhari 1997; Yamalkar 2002). Alguns autores sugerem a existência de reservatórios não humanos para o *M. leprae*. Indivíduos que não relatam história de exposição ao *M. leprae* podem desenvolver a doença e “clusters” de hanseníase foram identificados em áreas específicas, tais como áreas próximas a fontes de água (Truman & Fine 2010).

É importante fazer a distinção entre reservatório e passagem transitória do *M. leprae* pelo ambiente. Os pacientes multibacilares podem disseminar grandes quantidades do bacilo no ambiente e alguns bacilos podem permanecer viáveis por períodos como horas, dias ou semanas, mas isto não caracteriza um reservatório (Desikan & Sreevatsa 1995). Para que seja considerado um reservatório, o *M. leprae* deve se multiplicar. Entretanto, dados os conhecimentos do genoma do *M. leprae* é improvável que este microorganismo possa se replicar em qualquer ambiente extracelular (Cole et al. 2001). Mas, existe a possibilidade do *M. leprae* presente na água se associar a protozoários ou invertebrados aquáticos como tem sido mostrado para *M. ulcerans* (Mosi et al. 2008).

Atualmente, a única fonte “ambiental” do *M. leprae* comprovada é o tatu de nove bandas (*Dasypus novemcinctus*) do sul dos Estados Unidos. Um recente estudo comparou o genoma completo do *M. leprae* proveniente de um tatu selvagem e de três pacientes com hanseníase dos Estados Unidos, a análise genômica comparativa mostrou que a cepa era idêntica. Em seguida, a cepa do *M. leprae* norte americana foi comparada com cepas da Ásia e Brasil, identificando 51 SNPs, 11 inserções/deleções (INDEL) e 10 regiões repetidas em número variável (VNTR), sendo o genótipo da cepa dos Estados Unidos denominado 3I-2-v1. Posteriormente os sítios polimórficos da cepa 3I-2-v1 foram comparados com cepas de *M. leprae* obtidas a partir de 33 tatus selvagens coletados no Sul dos EUA e 39 pacientes com hanseníase. Entre as cepas dos tatus, 28 das 33 mostraram identidade genética idêntica com relação

ao genótipo 3I-2-v1. Do mesmo modo 25 dos 39 pacientes dos EUA também carregavam o genótipo 3I-2-v1 e residiam em áreas onde a exposição a tatus era possível. Sendo assim, o tatu pode ser um possível reservatório natural da hanseníase no sul dos Estados Unidos (Truman & Fine 2010; Truman et al. 2011).

1.9. Diagnóstico da Hanseníase

1.9.1 Diagnóstico Clínico

O diagnóstico da hanseníase é baseado em sinais e sintomas clínicos. Os sinais cardinais para hanseníase são: lesão de pele com anestesia ou hipoestesia e espessamento de nervos periféricos. O exame dermatoneurológico avalia a sensibilidade térmica, tátil e dolorosa nas lesões de pele, identifica neurites, comprometimento de troncos nervosos e incapacidades físicas (WHO 2000).

No exame dermatológico verifica-se a presença de lesões, sua localização, forma, número, dimensões e bordas. Geralmente, são encontradas as seguintes lesões: manchas hipocrômicas e/ou eritematosas, placas, lesões foveolares, tubérculos, nódulos, infiltrações difusas e outros tipos de manifestações. A identificação das lesões neurológicas é realizada pela inspeção dos olhos, nariz, mãos e pés, palpação dos troncos nervosos periféricos, avaliação da força muscular e a avaliação de sensibilidade nos olhos, membros superiores e inferiores (Ministério da Saúde 2002).

1.9.2 Diagnóstico Laboratorial.

1.9.2.1 Baciloscopia e Exame Histopatológico

O raspado intradérmico das lesões e dos lóbulos auriculares e/ou cotovelo é o exame complementar que auxilia o diagnóstico da hanseníase. Nos pacientes LL, a baciloscopia tende a ser positiva, porém na forma tuberculóide a baciloscopia é por definição negativa (Ministério da Saúde 2002).

O exame histopatológico baseia-se na análise microscópica de biópsias de lesões de pele ou de nervos sendo geralmente utilizado para a classificação histopatológica da hanseníase. No exame histopatológico da hanseníase se pesquisa a presença de granulomas, agressão neural, bacilos álcool-ácido resistentes, vasculite na derme e/ou hipoderme, paniculite, infiltrado celular, estratificação e espessamento de tecidos (Ridley 1955).

O exame histopatológico e a baciloscopia, não fazem parte dos exames de rotina preconizados pelo Programa Nacional de Controle da Hanseníase, mas são realizados em protocolos de pesquisa para a classificação da hanseníase (WHO 2000).

1.9.2.2 Reação em Cadeia de Polimerase para o DNA do *M. leprae*

Com o avanço das técnicas de biologia molecular e principalmente após a decodificação do genoma completo do *M. leprae* foi possível a detecção do DNA do bacilo pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em vários tecidos e líquidos corporais, assim como em fragmentos de biópsias de pele e de nervos (Gillis & Williams 1991).

A técnica de PCR tem mostrado especificidade de 100% e sensibilidade variando de 34-74% em pacientes com forma paucibacilar e taxas de sensibilidade acima de 80% em pacientes com forma multibacilar (Bang et al. 2009). A técnica de PCR requer equipamentos e infra-estrutura de alto custo e não é recomendada como teste diagnóstico para hanseníase, entretanto é utilizada como ferramenta de pesquisa.

Diferentes genes específicos do *M. leprae* são utilizados como alvo da amplificação por PCR: fragmento de 742 pb da sequência repetitiva do gene que codifica o antígeno de 65 kD (Santos et al. 1993), gene LSR/A15 que codifica o antígeno de 15 kDa (Misra et al. 1995), fragmentos 455 pb e 320 pb da sequência RLEP (Jamil et al. 1994), fragmento de 531 pb gene *pra* 36kDa do *M. leprae* (Wichitwechkarn et al. 1995), fragmento de 171 pb do gene 16S RNAr (Arnoldi et al. 1992; Kurabachew et al. 1998), fragmento 372 pb (Nishimura et al. 1994), fragmento de 360 pb do gene que codifica a proteína de 18 kDa (Williams et al. 1990; Scollard et al. 1998; Stefani et al. 2003), fragmento de 560 pb do gene que codifica um antígeno rico em prolina (de Wit et al. 1991), entre outros.

1.9.2.3 Testes Sorológicos

O desenvolvimento de métodos laboratoriais para auxiliar o diagnóstico ou classificação das diversas formas clínicas da hanseníase é uma das prioridades em pesquisa na área (Stefani 2008). Testes que possam ser realizados sem instalações laboratoriais ou mão de obra especializada, de leitura simples e rápida, poderiam ser utilizados no ponto do atendimento, “point of care (POC)”, para facilitar o diagnóstico/classificação da hanseníase.

Um dos primeiros antígenos específicos do *M. leprae* a ser isolado e caracterizado foi o glicolípido fenólico (PGL-I) (Brennan & Barrow 1980). Devido a sua natureza glicolípídica, o PGL-I estimula predominantemente a produção de anticorpos da classe IgM, que não apresentam reação cruzada com o *M. tuberculosis* ou com outras micobactérias conhecidas (Cho et al. 1992). O principal determinante antigênico do PGL-I é representado pela parte glicídica da molécula (trissacarídeo). Sabe-se que o *M. leprae* não é cultivável em meio de cultura artificial, deste modo a obtenção de antígenos que pudessem ser utilizados no sorodiagnóstico era realizada por meio de lesões de pacientes lepromatosos e de fígado e baço de tatus infectados (*Dasypus novemcinctus*). Os glicolípidos apresentam difícil separação/purificação devido a sua natureza altamente apolar. As estratégias de deacilação e incorporação do PGL-I a lipossomas foram propostas para permitir a utilização do PGL-I em ensaios imunológicos. Outros estudos propuseram a produção sintética da porção trissacarídea do PGL-I ou dos terminais monossacarídeo e dissacarídeo associados a carreadores hidrossolúveis (BSA/HSA), sendo produzidos os seguintes análogos sintéticos do PGL-I: monossacarídeo-octyl-BSA (M-O-BSA), dissacarídeo natural-octyl-BSA (ND-O-BSA), dissacarídeo natural-octyl-HSA (ND-O-HSA), trissacarídeo natural-phenil-BSA (NT-P-BSA) e o trissacarídeo natural-phenil-HSA (NT-P-HSA). Estes antígenos são utilizados atualmente por diversos grupos de pesquisa em hanseníase (Bührer-Sékula et al. 2000; Spencer & Brennan 2011).

A sorologia para detecção de anticorpos IgM específicos para o PGL-I representa o teste sorológico melhor avaliado e padronizado para hanseníase. Em geral, os resultados da sorologia anti PGL-I refletem a carga bacilar do paciente: pacientes MB apresentam alta taxa de soropositividade (70-90%),

enquanto apenas uma minoria dos pacientes PB (15-40%) tem sorologia positiva (Young et al. 1983; Bühler-Sékula et al. 1998; Oskam & Bühler-Sékula 2003). Alguns estudos têm mostrado que os resultados da sorologia anti PGL-I podem ser úteis para a classificação/diferenciação de pacientes MB/PB e podem contribuir para decisões terapêuticas adequadas (Bühler-Sékula et al. 2007).

A presença de anticorpos anti PGL-I em contatos domiciliares de pacientes MB é considerada fator de risco para desenvolvimento de hanseníase. Contatos que apresentam anticorpos anti PGL-I tem oito vezes mais risco de desenvolver hanseníase do que contatos soronegativos. Entre os contatos soropositivos para o PGL-I o risco de desenvolver hanseníase do tipo MB é de 34 vezes (Douglas et al. 2004). O seguimento dos contatos de pacientes MB pode permitir o diagnóstico precoce e a quimioprevenção deste grupo de risco poderia prevenir a transmissão da hanseníase (Oskam & Bühler-Sékula 2003).

Em pacientes com resposta humoral detectável no diagnóstico, os anticorpos anti PGL-I apresentam significativo declínio em decorrência do uso da MDT. O declínio é de 25-50% por ano, mas isto pode variar entre os pacientes. Com a morte do *M. leprae* pelo uso da MDT, a síntese de PGL-I é cessada e o antígeno é eliminado do organismo, consequentemente os níveis de anticorpos declinam (Roche et al. 1993; Silva et al. 2007). Em contrapartida, o aumento dos níveis de anticorpos anti PGL-I em pacientes que já receberam MDT poderia ser um indicador inicial de recidiva (Wu et al. 2002).

Testes em formato “point of care” baseados na detecção de IgM específica para o PGL-I foram desenvolvidos como objetivo de facilitar o diagnóstico/classificação da hanseníase (MB/PB). Em 1998, foi desenvolvido e avaliado um teste dipstick para detecção de anticorpos anti-PGL-I que fornece resultados em 3 horas e apresenta 97.2% de concordância com os resultados do ELISA. Este teste não requer equipamentos sofisticados nem reagentes refrigerados (Bühler-Sékula et al. 1998). O teste dipstick apresenta duas bandas, uma para o teste e uma para o controle positivo, consistindo do antígeno semi-sintético (ND-O-BSA) e da anti-IgM humana que se liga a IgM presente no soro, respectivamente (Bühler-Sékula et al. 2001).

Em 2003 foi produzido pelo Departamento de Pesquisa Biomédica do *KIT* (Koninklijk Instituut voor de Tropen – Instituto Real Tropical) em Amsterdam um teste simples e rápido baseado em imunocromatografia, o teste ML flow, para detecção de IgM anti-PGL-I em 10 minutos. O teste apresentou boa correlação com os resultados do ELISA (91%), podendo ser realizado com sangue total ou soro (Bührer-Sékula et al. 2003).

É importante ressaltar que a sorologia anti-PGL-I não permite distinguir entre infecção antiga ou recente e não deve ser utilizada de forma isolada como ferramenta de diagnóstico, pois a maioria dos pacientes PB são soronegativos e uma porcentagem de controles saudáveis endêmicos podem ser soropositivos (10%). As principais aplicações da sorologia anti PGL-I são a classificação correta (hanseníase MB ou PB) dos pacientes recém diagnosticados e identificação de contatos de alto risco de desenvolvimento de hanseníase (Oskam & Bührer-Sékula 2003).

O *M. leprae* é um bacilo intracelular obrigatório, não cultivável em meios de cultura axênicos o que até recentemente limitou a oferta de antígenos para serem testados para fins de diagnóstico laboratorial (Aseffa et al. 2005). Entretanto, o seqüenciamento completo do genoma do *M. leprae* em 2001 desvendou os genes e proteínas codificadas por este microorganismo (Cole et al. 2001). Além disso, os recentes avanços nas técnicas de biologia molecular de expressão gênica, clonagem de genes promoveram novas abordagens para a produção e análise de proteínas recombinantes. Simultaneamente, novas ferramentas de bioinformática tem permitido análises *in silico* destas proteínas contribuindo para a identificação de novos antígenos para o diagnóstico laboratorial da hanseníase.

Mais recentemente testes sorológicos (ELISA) para detecção de anticorpos da classe IgG contra proteínas recombinantes do *M. leprae* tem revelado novos antígenos candidatos ao uso no diagnóstico sorológico da hanseníase, especialmente para pacientes com hanseníase MB (Spencer et al. 2005; Araoz et al. 2006a; Duthie et al. 2010; Duthie et al. 2007; Geluk et al. 2009; Corstjens et al. 2010; Reece et al. 2006).

Em 2006 foram avaliadas 13 proteínas recombinantes do *M. leprae* em pacientes recém diagnosticados e não tratados para hanseníase (com as formas clínicas LL, BL, TT e BT) e contatos de pacientes MB provenientes das

Filipinas, foram também avaliados controles saudáveis não endêmicos e pacientes com tuberculose pulmonar provenientes de Seattthe/USA. Dentre as proteínas avaliadas, ML0405, ML2331 e ML2055 demonstraram altas taxas de reconhecimento por pacientes LL/BL. Pacientes com tuberculose e controles saudáveis não endêmicos mostraram baixa reatividade sorológica. No pólo paucibacilar da doença baixas taxas de reconhecimento foram encontradas, assim como nos contatos de pacientes MB (Reece et al. 2006).

Em 2007 as proteínas recombinantes ML0405, ML2331, ML1556c e ND-O-BSA foram testados em um largo painel de pacientes com hanseníase MB e PB, pacientes com TB pulmonar, contatos domiciliares de pacientes MB, controles saudáveis de área endêmica e não endêmica provenientes do Japão, Filipinas e Brasil (Goiânia e Salvador). Entre os pacientes MB provenientes das Filipinas 94% reconheceram o análogo sintético do PGL-I e 57% dos PB foram soropositivos para este antígeno, entretanto as respostas obtidas eram fracas. De 20 pacientes fracamente positivos, quatro demonstraram forte resposta para ML1556c, sugerindo que o uso desta proteína em associação com o PGL-I poderia aumentar a sensibilidade de um teste para detecção de PB. As proteínas recombinantes e PGL-I apresentaram baixas taxas de reconhecimento entre os pacientes com tuberculose, contatos domiciliares, controles endêmicos e não endêmicos. No Brasil, as proteínas ML0405 e ML2331 reagiram com uma grande proporção de pacientes MB (87% e 76%, respectivamente) e o PGL-I foi capaz de identificar 87% destes pacientes. Entre os pacientes PB, 69% reconheceram a proteína ML0405, mas somente 3% produziram anticorpos para ML2331, 12% reagiram com ML1556c e 20% possuíam anticorpos para o PGL-I. Entre os pacientes com tuberculose cerca de 12% reconheceram as proteínas e PGL-I. De acordo com estes resultados, foi construída uma nova proteína proveniente da fusão entre as proteínas ML0405 e ML2331, denominada LID-1 (Leprosy IDRI Diagnostic) e esta foi avaliada em pacientes com hanseníase (MB e PB) e controles saudáveis do Japão. A taxa de reconhecimento de LID-1 foi de 87% entre os MB e 20% entre os PB, indicando grande potencial para o uso de LID-1 para o diagnóstico da hanseníase MB. Entre os controles endêmicos apenas 4% foram sororeativos para esta proteína de fusão. Para avaliar a capacidade de LID-1 diagnosticar precocemente pacientes com hanseníase, amostras

provenientes de um estudo de seguimento (1985-1991) de contatos de pacientes com hanseníase MB das Filipinas foram testadas. No soro de alguns contatos que desenvolveram hanseníase MB, os níveis de anticorpos anti LID-1 apresentaram aumento um ano antes do diagnóstico clínico, sendo o aumento dos anticorpos anti LID-1 maior do que os anticorpos anti PGL-I, indicando que LID-1 poderia fornecer o diagnóstico precoce da hanseníase (Duthie et al. 2007).

Em 2008 foi realizada a triagem da sororeatividade de 71 proteínas recombinantes do *M. leprae* mediante o uso de microarranjo de proteínas (protein array), utilizando amostras de pacientes MB e PB e controles saudáveis endêmicos do Nepal. As proteínas que mostraram melhor discriminação entre pacientes MB e controles endêmicos (EC) foram: ML0405, ML2331, ML0050-ML0049, LID-1, ML0091 e ML2055. Em seguida, foi utilizado o ensaio MAPIA (Multiantigen Print Immunoassay) onde os antígenos foram imobilizados em membranas de nitrocelulose, neste ensaio as proteínas ML0405, ML2331 e ML0411 apresentaram alta reatividade quando testadas com amostras de soro de pacientes MB. Apesar do grande número de proteínas avaliadas, ML0405 e M2331 permaneceram como os melhores candidatos para um teste diagnóstico de MB. Na etapa final do estudo, LID-1 foi avaliada em testes de formato lateral flow (LF) e dual-path platform (DPP). O teste do tipo fluxo lateral foi capaz de detectar 5 de 10 pacientes MB, enquanto DPP foi capaz de detectar 10/10, além de fornecer um sinal mais forte, sugerindo que a plataforma DPP seria melhor opção para um teste “point of care” de diagnóstico da hanseníase (Duthie et al. 2008b).

Num estudo posterior foi projetada e produzida uma proteína de fusão quimérica com multiepítomos (PADL) a partir da fusão dos epítomos reativos de proteínas recombinantes do *M. leprae* (ML0405, ML2311, ML2055, ML0049, ML0050 ML0091 e ML0411). A proteína quimérica (PADL) foi avaliada em soro de pacientes com hanseníase MB e PB provenientes de São Paulo/Brasil e em pacientes com hanseníase (MB e PB) e controles endêmicos de Cebu/Filipinas. Foi demonstrado que todas as porções da proteína mantinham sua capacidade de ligação a anticorpos e a proteína oferecia grande acurácia no diagnóstico de pacientes MB. Entre os controles saudáveis endêmicos não foi observada resposta para PADL. Entretanto, outros estudos devem ser realizados para

avaliar se PADL pode fornecer o diagnóstico precoce da hanseníase (Duthie et al. 2009).

As proteínas recombinantes foram testadas em pacientes tratados para hanseníase para avaliar se os anticorpos IgG anti proteínas recombinantes eram afetados pelo tratamento. Foram recrutados para este estudo pacientes com hanseníase MB e PB, contatos domiciliares de pacientes MB, controles saudáveis e antigos pacientes que terminaram o tratamento para hanseníase a dez anos provenientes da Venezuela e Brasil (São Paulo e Uberlândia). Entre indivíduos que concluíram a MDT a resposta a ML0405, ML2331 e LID-1 foi baixa. Entretanto, quatro indivíduos apresentavam respostas positivas, sendo que três haviam recebido tratamento irregular e o outro indivíduo foi classificado como indeterminado e foi tratado como PB. Foram avaliados 107 pacientes do Brasil antes e após o tratamento e os títulos de anticorpos declinaram após a MDT. Entretanto, este declínio não foi observado em pacientes TT e LL que apresentam IB muito baixo e alto no início da MDT, respectivamente. Um dos contatos domiciliares apresentou resposta positiva e foi diagnosticado com infecção subclínica pelo *M. leprae*. Estes resultados sugerem que a sorologia com proteínas recombinantes do *M. leprae* poderia ser utilizada para monitorar a eficácia do tratamento (Duthie et al. 2011b).

Testes que avaliam a imunidade humoral apresentam pouca relevância para o diagnóstico das formas paucibacilares da hanseníase, já que estas apresentam resposta de anticorpos fraca ou ausente. Estudos que utilizam a detecção de IFN- γ como marcador de imunidade celular após estímulo de células sanguíneas com proteínas recombinantes ou peptídeos sintéticos do *M. leprae* tem como objetivo desenvolver um método diagnóstico para hanseníase PB. A secreção de IFN- γ em resposta a proteínas e peptídeos do *M. leprae* é observada tipicamente em pacientes TT/BT, contatos domiciliares e controles endêmicos (Araoz et al. 2006b; Duthie et al. 2008a; Geluk et al. 2005; Geluk et al. 2009; Geluk et al. 2010; Sampaio et al. 2011; Geluk et al. 2012; Sampaio et al. 2012). Ensaio baseado na liberação de IFN- γ (IGRAs - Interferon-Gamma Release Assays) foram desenvolvidos para o diagnóstico de TB latente. Estes ensaios se baseiam na detecção de IFN- γ após estimulação com os antígenos ESAT-6, CFP-10 e TB7.7 que são expressos especificamente no *M.*

tuberculosis. Existem dois IGRAs no mercado para diagnóstico de tuberculose latente: QuantiFERON-TB Gold In-Tube assay (Cellestis Ltda, Austrália) e T-SPOT.TB assay (Oxford Immunotec, Reino Unido) (Ringshausen et al. 2012). De modo semelhante tem se buscado o desenvolvimento de IGRAs para o diagnóstico da hanseníase PB. Neste sentido os homólogos de ESAT-6 e CFP-10 presentes no *M. leprae* foram testados e houve reconhecimento destes antígenos por células T de pacientes com tuberculose, limitando o potencial uso destes antígenos em áreas endêmicas para TB (Geluk et al. 2009).

Visando a identificação de antígenos “específicos” do *M. leprae* vários estudos utilizaram técnicas de bioinformática, como genômica comparativa para selecionar proteínas do *M. leprae* que apresentem baixa homologia como proteínas de outras micobactérias, como uma maneira de evitar reações cruzadas. Uma das técnicas utilizadas é o BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), que compara as sequências de aminoácidos de proteínas do *M. leprae* com proteínas codificadas por outras micobactérias (Spencer et al. 2005; Geluk et al. 2005; Geluk et al. 2009; Geluk et al. 2012).

Em 2005, Spencer e colaboradores avaliaram a imunoreatividade celular de quatro proteínas do *M. leprae* (ML0008, ML0126, ML1057 e ML2567) e 58 peptídeos sintéticos em pacientes com hanseníase (PB e MB) e grupos controles (pacientes com tuberculose, controles de área endêmica e contatos domiciliares) do Brasil a partir da detecção de IFN- γ em sobrenadante de cultura de células sangüíneas. Dos 58 peptídeos testados, 35 induziram produção de IFN- γ em pacientes paucibacilares e contatos domiciliares, os outros peptídeos estimularam resposta em controles endêmicos e pacientes com tuberculose. As proteínas estimularam maiores níveis de IFN- γ , entretanto a resposta foi inespecífica.

Em um estudo posterior, foram avaliados 50 peptídeos em relação a sua especificidade e sensibilidade, os peptídeos eram derivados das proteínas ML0576, ML1989, ML1990, ML2283 e ML2567. A avaliação foi realizada em pacientes com hanseníase (PB e MB), contatos domiciliares de pacientes MB, controles endêmicos do Rio de Janeiro/Brasil e em grupos controle provenientes da Holanda que incluíram: pacientes com TB pulmonar, indivíduos com cicatriz de BCG e controles não endêmicos. Dos 50 peptídeos,

quatro estimularam forte resposta de IFN- γ em pacientes PB e contatos domiciliares, sem estimular resposta nos controles holandeses. O uso de proteínas gera uma maior produção de IFN- γ , entretanto o estudo sugere que o risco de reatividade cruzada é aumentado. E desta maneira, os peptídeos poderiam fornecer uma resposta mais específica, contudo devido a restrição ao HLA é necessária a combinação de vários peptídeos (Geluk et al. 2008).

Os peptídeos estimulam uma menor produção de IFN- γ do que as proteínas, um estudo de 2010 avaliou estratégias para aumentar a sensibilidade do ensaio de sangue total (WBA) com dois peptídeos (p1-15 e 11-25) da proteína ML2531 pela adição de citocinas, adição de anticorpos anti CD49, CD28, CD40, IL-10 ou CD40L e pela manosiilação de peptídeos. Somente a citocina IL-12 aumentou a produção de IFN- γ em cultura de sangue total em amostras de pacientes com hanseníase BT da Holanda. Diferente do esperado, nenhum dos anticorpos teve impacto no aumento da secreção de IFN- γ pelas células T. A manosiilação não aumentou a sensibilidade do ensaio, entretanto permitiu utilizar uma quantidade 100 vezes menor dos peptídeos, diminuindo o custo do teste (Geluk et al. 2010).

Estudo colaborativo com nosso grupo de pesquisa comparou paralelamente a resposta de anticorpos e de células T (IFN- γ) de pacientes com hanseníase MB e PB, contatos domiciliares de pacientes MB, controles saudáveis de área endêmica e pacientes com TB pulmonar provenientes de Goiânia/Goiás. Um painel de 33 proteínas recombinantes foi avaliado quanto à imunogenicidade e especificidade da resposta por meio do ensaio imunoenzimático e ensaio de sangue total (WBA – whole blood assay). Das 33 proteínas avaliadas 16 foram imunogênicas e estimularam a produção de IFN- γ em pacientes PB e contatos domiciliares ou foram reconhecidas por anticorpos IgG de pacientes com hanseníase MB. As proteínas ML0405, ML2331 e ML2055 foram reconhecidas por anticorpos e por resposta imune celular específica para o *M. leprae*. As proteínas ML1632, ML1685, ML1556, ML2044, ML0276 e ML0840 foram imunogênicas, entretanto somente a resposta de IFN- γ foi específica. As proteínas ML2358, ML2346, ML2541, ML2603, ML0022, ML2380 e ML2203 foram imunogênicas, mas houve reconhecimento por anticorpos e produção de IFN- γ em todos os grupos testados, ou seja eram

proteínas imunogênicas, mas seu reconhecimento foi inespecífico. As outras 17 proteínas avaliadas foram não imunogênicas, não reagiram no ensaio de sangue total ou no ELISA para detecção de IgG. O número de proteínas capazes de estimular a resposta de IFN- γ foi superior ao número de proteínas que foram reconhecidas por anticorpos IgG. A análise paralela da resposta imune celular e humoral a estas proteínas permitiu concluir que somente proteínas que foram capazes de induzir imunidade celular/IFN- γ foram também reconhecidas por anticorpos. Além disso, os resultados deste estudo mostraram que as análises *in silico* não devem ser o único critério para exclusão de antígenos, visto que proteínas com alta homologia com proteínas de outras micobactérias não apresentaram reatividade cruzada. Por exemplo, a proteína ML2331 apresentou mais de 80% de homologia com várias proteínas de outras micobactérias, entretanto quando avaliada não apresentou reatividade cruzada na resposta imune humoral e celular. Por outro lado a proteína ML2346 que não apresentou homólogo em *M. tuberculosis* ou em outras micobactérias ambientais apresentou reatividade cruzada, estimulando resposta de IFN- γ em todos os grupos avaliados (Sampaio et al. 2011).

Como a resposta de IFN- γ para as proteínas e peptídeos do *M. leprae* é praticamente idêntica entre os casos TT/BT e contatos domiciliares, outros biomarcadores que sejam capazes de distinguir estes dois grupos tem sido investigados. Em um recente trabalho de nosso grupo de pesquisa, 14 biomarcadores (eotaxina, IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-15, IL-17A, IL-23, IL-31, CXCL10, and TNF- α) foram analisados em pacientes com hanseníase PB e MB e em contactantes de pacientes MB. Neste estudo nenhum destes biomarcadores foi capaz de distinguir a resposta de pacientes com hanseníase TT/BT da resposta de contatos domiciliares de pacientes MB, confirmando resposta com perfil Th1 em ambos os grupos. Houve produção de IL-4 em ensaio de sangue total de pacientes BL/LL. Entretanto, um contactante de paciente MB apresentou resposta imune do tipo Th2 e ausência de IFN- γ , o que poderia indicar doença MB inicial ou subclínica. O seguimento deste contato é essencial para determinar o valor prognóstico deste imunomarcador (Sampaio et al. 2012).

Outro estudo recente de biomarcadores, avaliou a resposta a 17 proteínas recombinantes e 19 biomarcadores (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IFN- γ , CXCL10, FSC-G, FSC- GM, MCP-1, CXCL9, MIP-1 β e TNF- α), com o objetivo de encontrar biomarcadores que distinguíssem controles endêmicos de pacientes TT/BT. Foram avaliados pacientes com hanseníase PB, contatos domiciliares, pacientes com TB pulmonar e controles endêmicos provenientes do Brasil (Fortaleza), Bangladesh, Coréia do Sul e Etiópia. Apenas, a proteína ML2478 foi capaz de estimular resposta de células T específica em grupos geneticamente diversos (Africano, Asiático e da América do Sul). A citocina IL-1 β e as quimiocinas MIP-1 β e MCP-1 foram capazes de diferenciar pacientes TT/BT e controles endêmicos. Entretanto, foi observada resposta entre contatos domiciliares e em pacientes com tuberculose. Estudos de coorte envolvendo um grande número de pacientes e controles são necessários para validar o uso destas ferramentas para prever uma resposta imune patogênica ao *M. leprae* (Geluk et al. 2012).

Apesar do impacto positivo da MDT na redução da prevalência global da hanseníase, esforços adicionais são necessários para reduzir a incidência da doença. Estes esforços devem incluir o desenvolvimento de uma vacina eficaz com potencial profilático (Duthie et al. 2011a). Qualquer antígeno do *M. leprae* ou de outra micobactéria que estimule a resposta imune celular poderá representar um bom candidato para uma nova vacina. A proteína recombinante ML0276 que demonstrou ser um bom antígeno para imunidade celular, estimulando alta resposta de IFN- γ em pacientes PB (Duthie et al. 2008a) e foi avaliada em modelo murino quanto ao seu potencial vacinal. Camundongos C57BL/6 foram imunizados três vezes com a proteína recombinante ML0276 juntamente com agonistas de TLRs e em seguida foram infectados pelo *M. leprae* por meio de injeção intradérmica na orelha ou por via subcutânea. A imunização de camundongos com ML0276 e agonistas de TLR4, TLR9 e TLR7 foi capaz de limitar a inflamação local (linfonodo) e induziu uma forte resposta Th1 (IFN- γ), mas não reduziu a carga bacteriana quando comparada com o grupo de camundongos não imunizados. Foi sugerido que talvez a proteína ML0276 não seja expressa de forma consistente durante a infecção pelo *M.*

leprae indicando que antígenos adicionais devem ser utilizados para se obter uma vacina que reduza a carga bacteriana (Raman et al. 2009).

Desde o sequenciamento do genoma do *M. leprae*, vários laboratórios de pesquisa examinaram cerca de 200 proteínas recombinantes (Geluk et al. 2011), quanto a reatividade humoral e celular e quanto ao potencial uso no desenvolvimento de testes “point of care”. Estes testes poderiam contribuir para a classificação de pacientes com hanseníase (PB/MB), triagem de indivíduos saudáveis e de contactantes de MB com alto risco de adoecimento e permitir o diagnóstico precoce e monitorização do tratamento.

2. JUSTIFICATIVA

Entre os maiores desafios para o controle e eliminação da hanseníase está o diagnóstico precoce da infecção. Até o momento o diagnóstico é baseado nos sinais e sintomas clínicos da doença. A sorologia anti PGL-I não é considerada teste diagnóstico, pois nem todos os pacientes possuem quantidade suficiente de bacilos para permitir o desenvolvimento de anticorpos anti PGL-I. Portanto, não apresenta sensibilidade adequada para o diagnóstico de pacientes paucibacilares e mesmo entre os pacientes multibacilares sua sensibilidade varia entre 70-90%. O desenvolvimento de um novo teste sorológico para o diagnóstico da hanseníase empregando antígenos protéicos do *M. leprae* associados ao PGL-I representa uma prioridade em pesquisa.

Neste contexto o grupo de pesquisa do Laboratório de Imunologia da AIDS e da Hanseníase integra desde 2004 o consórcio internacional de pesquisa- “IDEAL – Initiative for Diagnostic and Epidemiological Assays for Leprosy” que representa uma força tarefa que inclui 15 grupos de pesquisa de países endêmicos e não endêmicos priorizando o desenvolvimento de testes para o diagnóstico laboratorial da hanseníase que sejam aplicáveis aos países endêmicos.

Vários estudos pós genômicos têm identificado novas proteínas ou

peptídeos específicos do *M. leprae* com potencial aplicação para o sorodiagnóstico da hanseníase (Spencer et al. 2005; Reece et al. 2006; Duthie et al. 2007; Duthie et al. 2008b; Geluk et al. 2009; Geluk et al. 2010; Duthie et al. 2011b). Estudos recentes em parceria com nosso grupo de pesquisa avaliaram a reatividade sorológica de pacientes com hanseníase MB e PB e grupos controle recrutados em Goiás, na Bahia, nas Filipinas e Japão usando sete proteínas recombinantes, entre elas ML0405 e LID-1, que demonstraram ser imunogênicas e indutoras de reatividade sorológica específica (Duthie et al. 2007).

Outro estudo desenvolvido pelo nosso grupo testou a reatividade sorológica de pacientes com hanseníase MB e PB, grupos controle e contactantes recrutados em Goiás, para diversas proteínas do *M. leprae*, tais como: 92f, 46f e ML1213. As proteínas 92f, 46f são proteínas de fusão que se mostraram imunogênicas e indutoras de reatividade sorológica específica ao *M. leprae* e a proteína recombinante ML1213 foi considerada não imunogênica (Hungria et al. 2012).

Diferentes alelos do complexo HLA distintamente distribuídos em diversos grupos populacionais podem influenciar a reatividade imunológica a proteínas. A inclusão de grupos populacionais de áreas geográficas diferentes do Centro-Oeste é importante para comprovar que os antígenos protéicos do *M. leprae* são reconhecidos por grupos populacionais distintos. De forma ideal, um teste diagnóstico para hanseníase para uso em países endêmicos deve ser comprovadamente sensível e específico em pacientes de diferentes regiões geográficas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a reatividade sorológica para as proteínas recombinantes 92f, 46f, LID-1, ML0405 e ML1213 do *M. leprae* e para PGL-I em diferentes grupos populacionais de distintas regiões hiperendêmicas para hanseníase no Brasil: Rondonópolis/MT e Vila do Prata/PA.

3.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a reatividade sorológica mediante a detecção de IgG para as proteínas recombinantes do *M. leprae* e IgM para o PGL-I por ELISA em pacientes com hanseníase (MB e PB) recém diagnosticados, virgens de tratamento provenientes de Rondonópolis/MT.

2. Investigar a presença de anticorpos IgG para proteínas recombinantes do *M. leprae* e IgM para o PGL-I em contatos domiciliares de pacientes MB e antigos casos de hanseníase MB que concluíram a MDT nas populações da Rondonópolis/MT e Vila do Prata/PA.

3. Determinar a presença de IgG para as proteínas recombinantes do *M. leprae* e IgM para o PGL-I em controles saudáveis provenientes de Rondonópolis/MT.

4. Comparar dados sorológicos de IgG para as proteínas recombinantes do *M. leprae* com os dados da sorologia para detectar IgM anti- PGL-I em todos os grupos de estudo de Rondonópolis/MT e da Vila do Prata/PA.

4. MÉTODOS

4.1. Área geográfica e Grupos de estudo

Este estudo avaliou a resposta imune humoral de um total de 847 participantes recrutados de duas áreas endêmicas para hanseníase no Brasil: Rondonópolis/Mato Grosso e Vila do Prata/Pará.

Todos os pacientes com hanseníase incluídos neste estudo foram classificados de acordo com os critérios de Ridley e Jopling incluindo dados clínicos, baciloscópicos, histopatológicos e imunológicos. As amostras foram coletadas entre 2009 e 2010, armazenadas a -20°C e enviadas para o Laboratório de Imunologia da AIDS e Hanseníase (LIAH) no IPTSP/UFG, onde os testes sorológicos foram realizados.

4.1.1 Rondonópolis, Mato Grosso

O município de Rondonópolis está localizado no estado do Mato Grosso (195.476 habitantes e IDH= 0.791), a cerca de 210 km de Cuiabá, capital do estado, região centro-oeste do país (IBGE/ 2010). Conforme dados do Ministério da Saúde de 2011 o estado do Mato Grosso configura-se como uma região hiperendêmica para hanseníase com 2.371 casos registrados e um coeficiente de prevalência de 7.71 casos/10.000 habitantes. As diferentes regiões do estado apresentam diferenças marcantes nas taxas de prevalência de hanseníase (Ministério da Saúde/SVS/ Mato Grosso 2011). A figura 1 representa o coeficiente geral de detecção de hanseníase por municípios de Mato Grosso.

As ações de controle da hanseníase são desenvolvidas em todas as Unidades Básicas de Saúde (UBSs) de Rondonópolis. A detecção de casos de hanseníase em crianças menores de 15 anos tem aumentado assim como o número de casos da forma multibacilar da doença, indicando cadeia de transmissão ativa e permanência do município como região hiperendêmica. Adicionalmente, o número de casos atendidos com grau de incapacidade dois representa 5.4% de todos os casos novos avaliados, indicando diagnóstico tardio (Ministério da Saúde/ SVS/ 2009).

Os grupos de estudo avaliados de Rondonópolis/MT incluíram: pacientes

com hanseníase MB recém diagnosticados e não tratados (MB, n=58), pacientes PB recém diagnosticados e virgens de tratamento (PB, n=93), contatos domiciliares de pacientes MB (CD, n=192), controles saudáveis de área endêmica (CS, n=282) e indivíduos que foram previamente diagnosticados com hanseníase MB e tratados entre 1990-2006 (pós MDT, n=139). Os casos de hanseníase foram recrutados no Centro de dermatologia do Jardim Guanabara/Rondonópolis/MT.

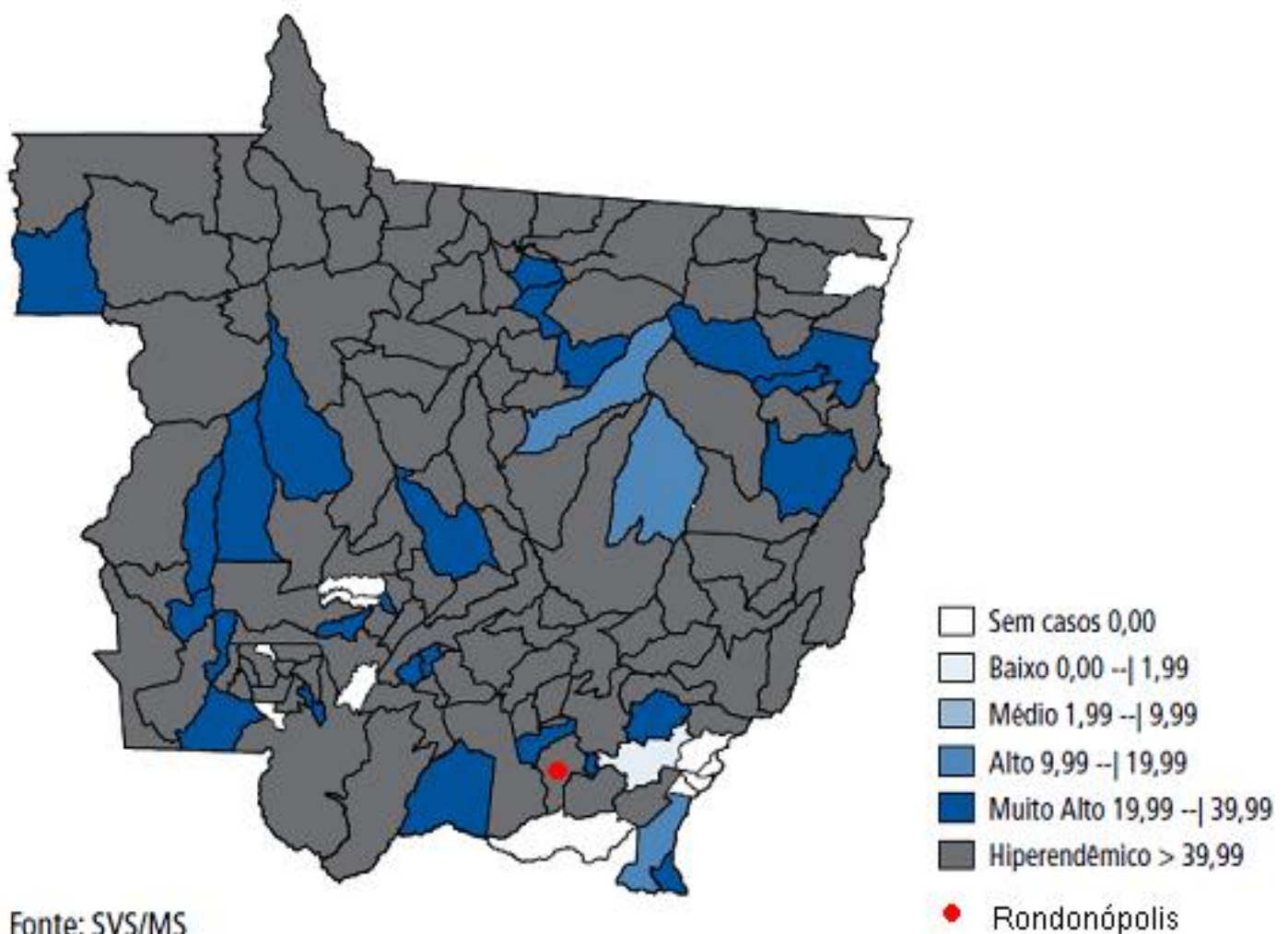


Figura 1. Coeficiente geral de detecção de hanseníase por municípios de Mato Grosso/ 2010. (Adaptado de Ministério da Saúde/ Sistema Nacional de Vigilância em Saúde/ Relatório de Situação / Mato Grosso 2011)

4.1.2 Vila do Prata em Igarapé-Açú/ Pará

A Vila do Prata está localizada no município de Igarapé-Açú (35.843 habitantes, IDH=0.67), a cerca de 100 km de Belém, capital do estado do Pará, região norte do Brasil. O estado do Pará apresentou no ano de 2011 um coeficiente de prevalência de 4.2 casos/10.000 habitantes (Ministério da Saúde/ SVS/ Pará 2011). A figura 2 representa o coeficiente geral de detecção de hanseníase por municípios do Pará.

A Vila do Prata foi fundada em 1898 por frades Capuchinhos Menores, que inicialmente trabalharam com a evangelização dos índios que ali residiam. Os primeiros hansenianos chegaram a vila em 1920, provenientes da Colônia do Tuncunduba, no município de Belém, para isolamento por ordem do governo da época. Desde então, a localidade ficou conhecida como Leprosário Santo Antônio do Prata, que passou a receber hansenianos vindos principalmente do estado do Pará e Maranhão.

A população da Vila do Prata é de aproximadamente 2.000 pessoas que permanecem isoladas até os dias atuais, provavelmente devido ao estigma ainda associado a hanseníase. A Vila do Prata representa um dos vários “hot pockets” de hanseníase dentro do estado do Pará, onde as taxas de prevalência são estimadas em 12.82% (Lazaro et al. 2011). A população da Vila do Prata é predominantemente parda, jovem e solteira. O grau de escolaridade é baixo, 53% dos moradores são analfabetos ou possuem apenas o primeiro grau incompleto e nenhum morador concluiu o ensino superior. O nível sócio-econômico é baixo e homogêneo, uma vez que todas as famílias recebem ajuda financeira do governo e poucos moradores exercem trabalho regular.

A Vila do Prata possui uma igreja e duas escolas, freqüentadas por todos os moradores. Da mesma maneira, são poucos os locais para compras de mantimentos e lazer, sempre localizados em torno da única praça. A comunidade é banhada por um igarapé, freqüentemente utilizado pelos moradores para banho, lavagem de roupas e lazer. A comunidade conta com uma unidade de atendimento a saúde, mantida pelo governo estadual, composta por dois consultórios médicos, uma sala de dispensação de medicamentos, um consultório odontológico e um pequeno laboratório de

análises clínicas para exames básicos de imunologia, bioquímica, hematologia e microbiologia. A equipe de pessoal residente é composta por um técnico de enfermagem, dois técnicos de laboratório e seis agentes comunitários de saúde treinados e recrutados da própria vila. O serviço conta ainda com uma equipe não residente, composta por médico, dentista e enfermeiro (Marckert 2008).

Dois grupos de estudo foram recrutados na Vila do Prata: contatos domiciliares de pacientes MB (CD, n=36) e indivíduos previamente diagnosticados com hanseníase multibacilar e que completaram a MDT entre 1990-2006 (pós MDT, n=47).

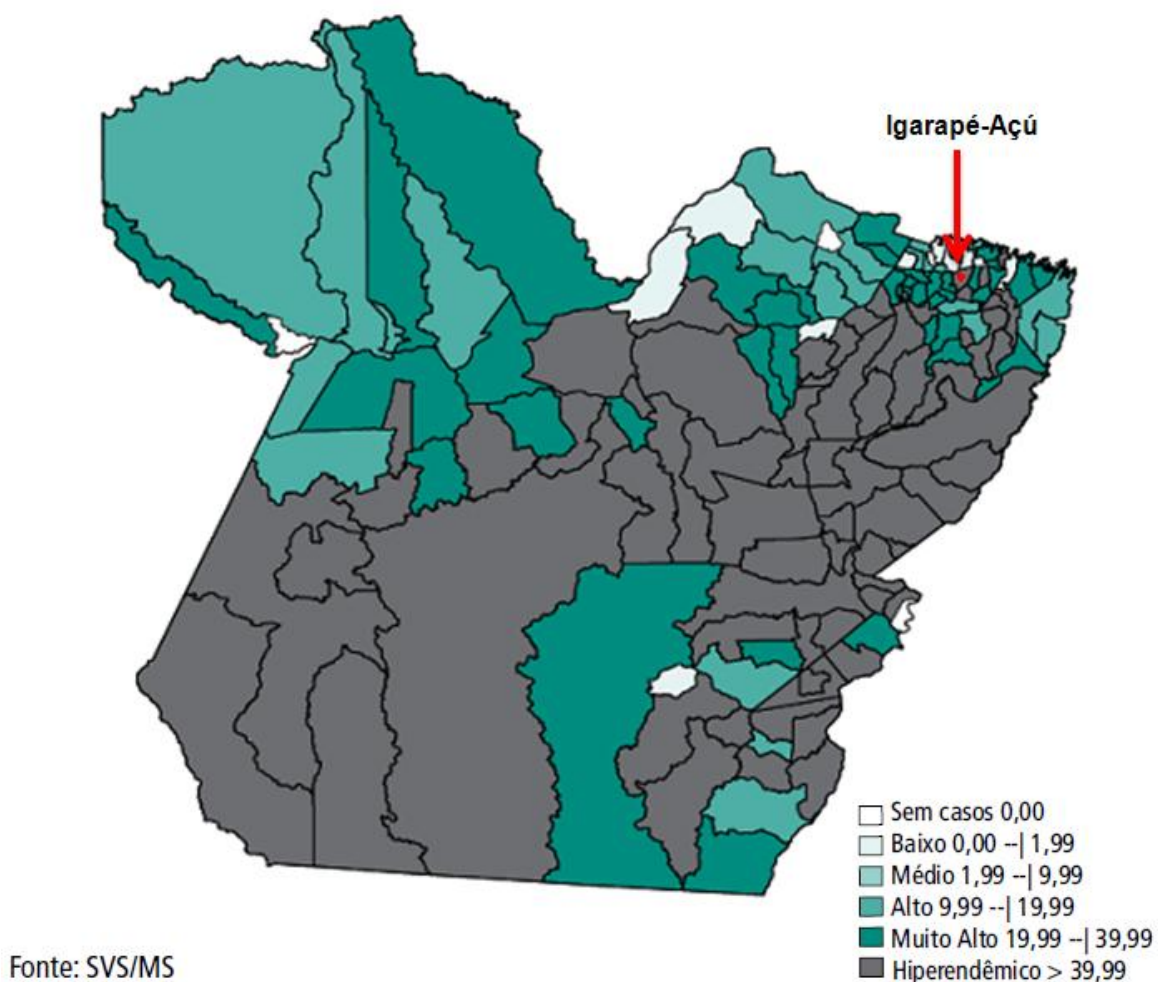


Figura 2. Coeficiente geral de detecção de hanseníase por municípios do Pará/ 2010. (Adaptado de Ministério da Saúde/ Sistema Nacional de Vigilância em Saúde/ Relatório de Situação/ Pará 2011)

4.2 Critérios de Inclusão/ exclusão:

Os pacientes com hanseníase, virgens de tratamento, foram recrutados no período de 2009 e 2010 tendo como critério os resultados de exames clínicos e laboratoriais.

Foram recrutados os contatos domiciliares dos casos de hanseníase MB registrados no período de 2009 e 2010. A todos os indivíduos que aceitaram participar da pesquisa, foi procedida a anamnese e quando necessário foram realizados exames laboratoriais confirmatórios (baciloscopia, histopatologia e teste de Mitsuda). Os contactantes de pacientes MB incluídos foram examinados e não apresentavam sinais e sintomas clínicos de hanseníase.

O grupo de controles saudáveis de área endêmica foi constituído de indivíduos sem história prévia de hanseníase e que não referiam contato conhecido com pacientes com hanseníase ou tuberculose. Os indivíduos incluídos como controles saudáveis de área endêmica responderam a um formulário padronizado sobre aspectos sócio-demográficos e histórico de outras doenças. Apenas indivíduos sororeativos para o PGL-I foram avaliados clinicamente.

Para seleção do grupo de indivíduos tratados (grupo pós MDT) foram examinados os antigos casos multibacilares (classificação operacional) diagnosticados e tratados entre 1990 e 2006, segundo o sistema de registro de hanseníase (SINAN).

4.3 Produção das proteínas recombinantes do *M. leprae*

As proteínas recombinantes utilizadas neste estudo foram produzidas pelo IDRI (Infectious Disease Research Institute - Seattle, WA, EUA) de acordo com o protocolo a seguir:

Para expressão das proteínas, o DNA que codifica as proteínas selecionadas do *M. leprae* foi amplificado por PCR a partir do DNA da cepa Thay-53, usando a DNA-polimerase Pfx (Invitrogen, Carlsbad, CA). Os primers para PCR foram produzidos com a inserção de sítios específicos para a incorporação das enzimas de restrição 5' 3' no DNA nos genes de interesse e esses sítios foram excluídos posteriormente no produto final do gene.

Após amplificação por PCR, os produtos purificados foram digeridos com enzimas de restrição e ligadas ao vetor de expressão pET28a (Novagen, Madison, WI). Os plasmídeos recombinantes foram inseridos em *Escherichia coli* BL21 Rosetta 2 (DE3) (pLysS) (Novagen).

Foram isolados os produtos de proteínas recombinantes (proteínas recombinantes solúveis) ou desnaturadas com ácido Ni-nitrilotriacético (uréia - 8 M), usando cromatografia de afinidade de íon metálico (Qiagen, Valença, CA). As frações de proteínas purificadas por afinidade foram analisadas em gel de eletroforese de poliacrilamida e quantificadas usando o ensaio de proteína ácida bicinconínica (Pierce, Rockford, IL). Os níveis de endotoxina foram mensurados pelo ensaio de *Limulus ameobocyte* QCL-1000 (Lonza Inc., Basel, Suíça) e todos apresentaram <100 unidades de endotoxina/mg de proteína.

4.4 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para detecção de IgG para as proteínas recombinantes do *M. leprae*

A reatividade sorológica de pacientes, controles e indivíduos pós MDT foi avaliada por ELISA para detecção de IgG específica para as proteínas recombinantes do *M. leprae*. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Imunologia da AIDS e Hanseníase do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás.

Placas de poliestireno para ELISA (Corning - Costar, fundo “U”, 96 poços) foram sensibilizadas com 2 µg/ml da proteína recombinante do *M. leprae* em estudo em tampão bicarbonato, pH 9.6, e incubadas ‘overnight’ a temperatura de 4°C. Após este período as placas foram novamente incubadas com 200µL de solução de bloqueio (tampão fosfato de sódio + 0.04 % tween 20 [PBST] e 1% de albumina bovina [BSA]) por 1 hora (h) a temperatura ambiente (15-25°C). Em seguida, as placas foram lavadas cinco vezes com PBST (PBS+ 0.05% Tween 20) e duas vezes com PBS. Seguindo as lavagens foram adicionadas amostras dos soros teste (1/200) em PBST 0.1% de BSA em duplicata e incubadas por 2 h a temperatura ambiente. Após as lavagens foi adicionado o conjugado contendo anti- IgG humana- peroxidase (Southern Biotech, Birmingham, AL; 1/5.000 PBST+0.1% de BSA) e incubado por 1 h. Após lavagens a reação foi desenvolvida pela adição de 100µL de cromógeno

Tetrametilbenzidina (TMB - KPL- EUA) contendo o substrato peróxido de hidrogênio. As placas foram incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente e a reação foi finalizada com a adição de 50µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 1 N. A densidade óptica (DO) foi detectada em leitora de ELISA (Multiskan - Thermo Scientific, USA) usando filtro de 450 nm.

O limiar de reatividade (*cut-off*) foi definido anteriormente como sendo duas vezes o desvio padrão da média da DO (ELISA) de indivíduos saudáveis de área endêmica (Goiás) (Duthie et al. 2007). Desta forma, amostras com DO superiores a 0.300 foram consideradas positivas e amostras com DO abaixo de 0.300 foram consideradas negativas. Os resultados foram expressos como a média de absorbância das duplicatas.

4.5 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para detecção de IgM para o PGL-I

O ensaio de ELISA para detecção de anticorpos IgM contra o PGL-I do *M. leprae* foi realizado como descrito anteriormente (Brett et al. 1986) usando como análogo sintético do PGL-I, o trissacarídeo NT-P-BSA. O antígeno foi diluído com base na sua concentração de açúcar (0.01 µg/ml) em tampão volátil de acetato de amônia carbonado (pH 8.2). As placas (Nunc Maxisorp, Roskild, Dinamarca) foram sensibilizadas e deixadas para secar em temperatura ambiente. O BSA foi usado como controle na sensibilização das placas: os poços não sensibilizados pelo antígeno (NT-P-BSA) foram sensibilizados com BSA. Para o cálculo dos resultados, a DO proveniente da reação da amostra ao BSA foi subtraído do resultado em DO da reação da amostra com o antígeno (NT-P-BSA), uma vez que pode ocorrer reação inespecífica ao BSA.

As placas foram bloqueadas por incubação de 60 minutos com solução de PBS 1% (m/v) BSA. Após quatro lavagens com PBS 0.1% Tween-20 (PBST), adicionou-se soro diluído 1:300 em PBST contendo 1% BSA. As placas foram incubadas a 37°C por 60 minutos, seguido por outro passo de lavagem. Conjugado anti- IgM humana ligada a peroxidase (Immuno Chemicals, St. Louis, Missouri, USA) foi adicionado diluído a 1:2.000 em PBST-1% BSA. Após incubação a 37°C por 60 minutos, o procedimento de lavagem foi repetido. A reação foi desenvolvida pela adição do substrato e cromógeno (TMB - KPL- EUA) em cada poço. Visando controlar a variação intra teste, um

soro de referência foi incluído em quadruplicata em cada placa. A reação foi interrompida adicionando-se 2.5 N H₂SO₄ quando a densidade óptica (DO) do soro de referência atingia um valor de 0.6 a 450 nm (Thermo Labsystems Multiskan, USA). Todas as amostras de soro foram testadas em duplicata e os resultados do ELISA foram expressos como a média de absorbância das duplicatas. O valor final de DO foi calculado subtraindo do valor da média de DO para PGL-I da duplicata de cada soro da média dos valores de DO obtidos nos poços sensibilizados com BSA (Bührer-Sékula et al. 1998).

4.6 Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Lauro de Souza Lima (protocolo #172/09). Para participantes abaixo de 18 anos de idade, o termo de consentimento foi assinado por um dos pais ou pelo responsável legal. Os participantes foram informados do objetivo da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) antes da coleta de sangue.

4.7 Análises estatísticas

Os programas GraphPad Prism (versão 5) e MS Excel (2007) foram utilizados para os cálculos de média, mediana e elaboração dos gráficos dot blot. A avaliação da significância estatística foi realizada por meio do teste de Kruskal-Wallis para comparação de múltiplos grupos e por Mann-Whitney para comparação entre dois grupos. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando o valor de $p < 0.05$.

5. RESULTADOS

5.1. Características gerais dos grupos de estudo

Um total de 847 participantes entre pacientes com hanseníase (MB e PB), contatos domiciliares de pacientes MB, controles saudáveis de área endêmica e indivíduos que concluíram a MDT (pós MDT) foram incluídos neste estudo. A composição e principais características dos grupos de estudo em Rondonópolis/MT e Vila do Prata/PA estão descritas na Tabela 2.

No grupo de pacientes com hanseníase MB procedentes de Rondonópolis/MT a maioria era do sexo masculino, com mediana de idade superior aos casos PB (45 anos). A maioria dos pacientes com hanseníase MB foi classificada com forma clínica BB e apresentaram mediana de índice baciloscópico (IB) de 1,5. Entre os pacientes com hanseníase PB, a maior parte era do sexo feminino com mediana de idade de 42 anos, sendo classificados em sua maioria com forma clínica BT. Os contatos domiciliares e controles saudáveis apresentaram idades semelhantes (32-33 anos), com maior proporção de participantes do sexo feminino nos dois grupos. Indivíduos que concluíram a MDT entre 4-20 anos atrás apresentaram a maior mediana de idade dentre os grupos avaliados de Rondonópolis (53 anos), sendo que a maioria era do sexo masculino.

Os contatos domiciliares de pacientes MB e indivíduos pós MDT recrutados da Vila do Prata apresentaram proporção semelhante de homens e mulheres e a mediana de idade foi superior para os indivíduos pós MDT (46 anos).

Tabela 1. Principais características dos grupos de estudo em Rondonópolis/MT e Vila do Prata/PA.

Áreas de estudo/ Grupos de Estudo	Classificação RJ/ IB (intervalo)	n	Gênero (M/F)	Mediana idade (anos) (intervalo)
1. Rondonópolis/MT (n=764)				
MB	12LL/11BL/ 35BB Mediana IB=1,5 (0-4,25)	58	40/18	45 (15-84)
PB	42TT/ 51BT IB= 0	93	40/53	42 (13-80)
CD	NA	192	80/112	32 (6-83)
CS	NA	282	101/181	33 (5-79)
Pós MDT	NA	139	101/38	53 (10-93)
2. Vila do Prata/PA (n=83)				
CD	NA	36	17/19	23 (6-53)
Pós MDT	NA	47	23/24	46 (18-90)

RJ: Classificação de Ridley e Jopling; MB: Hanseníase multibacilar; PB: Hanseníase paucibacilar; IB: Índice baciloscópico; CD: Contato domiciliar de paciente com hanseníase MB; CS: Controle saudável de área endêmica; F: Feminino; M: Masculino; MDT: Multidrogaterapia; NA: não aplicável.

5.2 Reatividade sorológica para as proteínas recombinantes do *M. leprae* nos diferentes grupos de estudo de Rondonópolis/MT

Altas taxas de reatividade foram observadas entre os pacientes MB para as proteínas ML0405, LID-1 e 46f (Figura 3A). As taxas de reatividade foram superiores a 80%, sendo que a proteína fusão LID-1 apresentou a maior taxa de positividade (89%, 52/58), com uma mediana de DO de 1.6. As proteínas ML0405 e 46f apresentaram medianas de DO de 1.81 e 1.26, respectivamente.

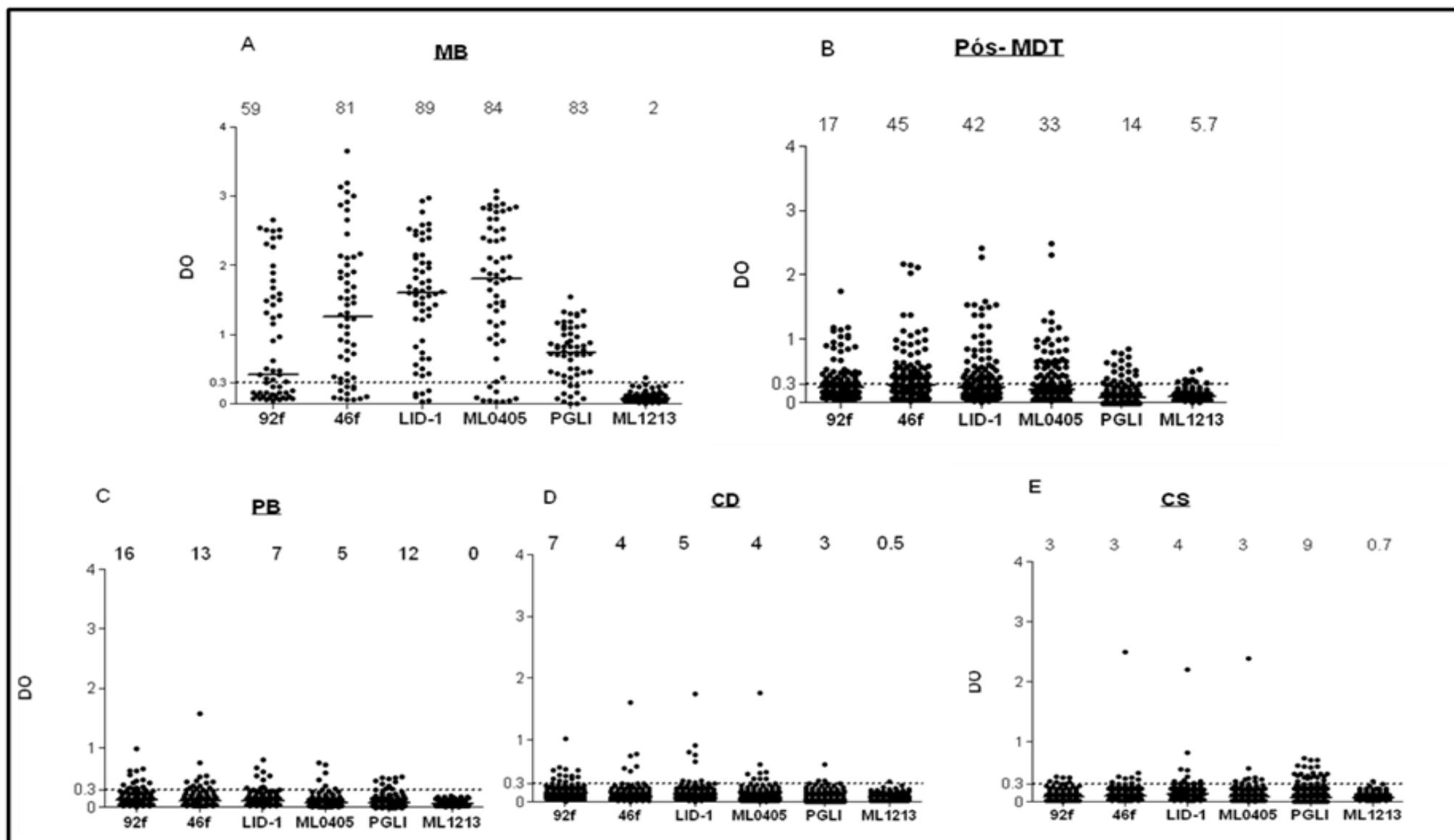


Figura 3: Reatividade sorológica as proteínas recombinantes do *M. leprae* (92f, 46f, LID-1, ML0405 e ML1213) e PGL-I entre os participantes de Rondonópolis/MT: A. pacientes MB recém diagnosticados e não tratados (n=58); B. Pós MDT, indivíduos que receberam MDT no passado (n=139); C. pacientes PB recém diagnosticados e virgens de tratamento (n=93); D. contatos domiciliares de pacientes MB (n=192); E. controles saudáveis de área endêmica (n=282). Anticorpos IgG para as proteínas recombinantes e IgM para PGL-I foram detectados por ELISA. Cada ponto representa a média da DO de uma amostra de soro, mediana da DO de cada grupo é representada pela linha horizontal e a linha tracejada representa o cut-off (DO>0.3). O número na parte superior da figura representa a porcentagem de resposta positiva. DO: Densidade óptica.

A sororeatividade de pacientes MB para as proteínas recombinantes (ML0405, LID-1 e 46f) foi estatisticamente diferente da reatividade de controles saudáveis de área endêmica ($p < 0.0001$). A proteína 92f apresentou as menores taxas de reconhecimento entre os pacientes MB (59%, 34/58), com mediana de DO de 0.43, variando de 0.05 a 2.66. A soropositividade entre os pacientes MB ao PGL-I foi de 83% (48/58), com mediana de DO de 0.74 (0.03-1.55).

Entre os pacientes com hanseníase PB baixas taxas de soropositividade foram encontradas para todas as proteínas recombinantes do *M. leprae* avaliadas neste estudo. A soropositividade deste grupo para a proteína recombinante 92f foi de 16% (15/93) com mediana de DO de 0.13. Para as proteínas ML0405, LID-1 e 46f as taxas de reatividade variaram de 5-13%. A soropositividade de pacientes PB para o PGL-I foi de 12% (11/93), com mediana de 0.08 (0.01- 0.51) (Figura 3C).

Entre os contatos domiciliares e controles saudáveis de área endêmica baixas taxas de reatividade foram observadas, variando entre 3 e 7% para as proteínas recombinantes do *M. leprae* (Figura 3D e 3E). Nestes mesmos grupos a soropositividade ao PGL-I foi de 3% para os contatos domiciliares e entre os controles saudáveis a reatividade foi de 9%.

A análise de resultados não pareados de indivíduos pós MDT e pacientes recém diagnosticados e não tratados para hanseníase MB mostraram que a sororeatividade (porcentagem de resposta positiva e mediana da DO) entre indivíduos pós MDT foi menor que a observada entre os pacientes MB recém diagnosticados e não tratados e variou entre 17 a 45% (Figura 3B). Para todas as proteínas testadas a mediana da DO de ELISA das amostras dos indivíduos que completaram a MDT ficou abaixo do *cut-off* (0.300): 0.25 para LID-1, 0.20 para ML0405, 0.28 para 46f e 0.24 para 92f. A reatividade para o PGL-I neste grupo foi de 14%, com uma mediana de DO no ELISA = 0.03.

Com o objetivo de verificar o efeito do tempo após a MDT no declínio dos níveis de anticorpos anti proteínas recombinantes e anticorpos anti PGL-I nos indivíduos previamente diagnosticados como MB e tratados de Rondonópolis/MT, os participantes foram estratificados segundo o tempo decorrido após a MDT: 4-5 anos n=27; 6-10 anos n=70; 11-15 anos n=38 e 16-

20 n=4. Utilizando-se proteínas recombinantes do *M. leprae* no ELISA não houve correlação direta entre o declínio da sororeatividade e o tempo decorrido após MDT (Kruskal Wallis $p>0.05$) (Figura 4). Os indivíduos do grupo pós MDT que receberam tratamento entre seis e dez anos atrás (n=70) apresentaram 45% sororeatividade para a proteína recombinante LID-1 e aqueles que concluíram a MDT entre 11-15 anos (n=38) apresentaram 47% de positividade, mostrando que não houve declínio nos anticorpos anti LID-1 no decorrer deste período. Para o PGL-I, 14% dos indivíduos tratados entre seis e dez anos foram soropositivos e 11% dos indivíduos do grupo pós MDT tratados de 11 a 15 anos atrás possuíam anticorpos anti-PGL-I.

Neste estudo a proteína ML1213, foi utilizada como controle, sendo que esta já havia sido previamente testada em ensaios sorológicos e apresentou baixas taxas de reconhecimento em todos os grupos de estudo (Reece et al. 2006). De modo semelhante, no presente estudo a proteína recombinante ML1213 apresentou baixa reatividade (mediana de DO variando de 0.07- 0.1) sendo que o maior percentual de positividade foi observado no grupo pós MDT (5.7%).

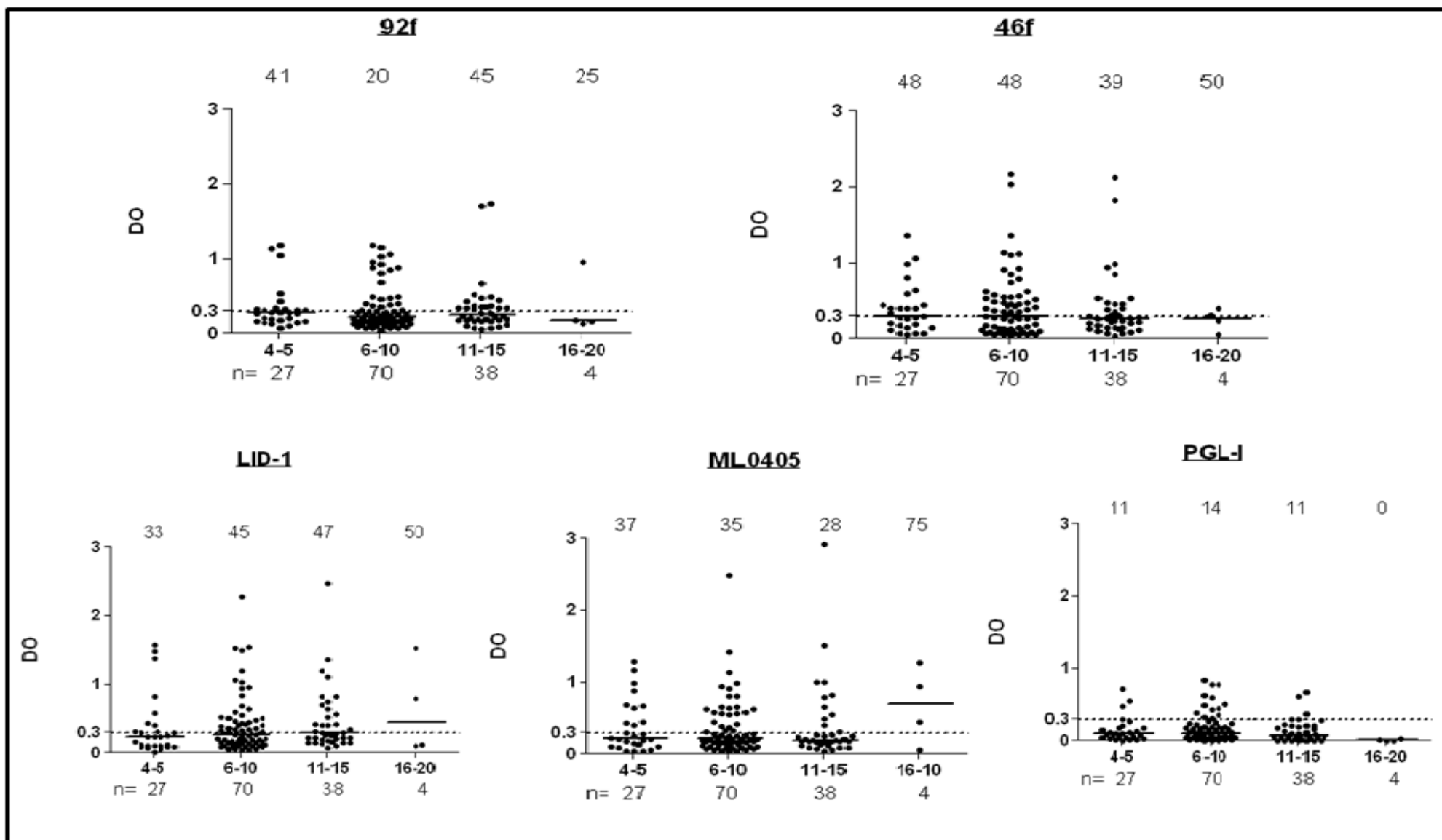


Figura 4. Sororeatividade para as proteínas recombinantes do *M. leprae* (92f, 46f, LID-1 e ML0405) e PGL-I em indivíduos previamente tratados com MDT de Rondonópolis/MT. Os indivíduos foram estratificados por tempo pós tratamento (4-5 anos; 6-11 anos; 11-15 anos e 16-20 anos). Anticorpos IgG para as proteínas recombinantes e IgM para PGL-I foram detectados por ELISA. Cada ponto representa a média da DO de uma amostra de soro, mediana da DO de cada grupo é representada pela linha horizontal e a linha tracejada representa o cut-off (DO>0.3).O número na parte superior indica a porcentagem de respostas acima do cut-off e o número de indivíduos em cada estrato de tempo é indicado na parte inferior da figura. DO: Densidade óptica.

5.3 Reatividade sorológica as proteínas recombinantes do *M. leprae* entre os participantes da Vila do Prata/PA

Um total de 83 participantes de dois grupos de estudo foram recrutados na Vila do Prata: 47 indivíduos que receberam MDT entre 4-20 anos atrás (pós MDT) e 36 contatos domiciliares de pacientes MB.

As taxas de positividade entre os indivíduos que tiveram hanseníase MB e foram tratados entre 4-20 anos atrás variou de 33 a 50%, sendo 50% para 92f e 46f, 35% para LID-1 e 33% para ML0405. A mediana da DO para todas as proteínas testadas foi inferior a mediana obtida em pacientes MB virgens de tratamento (não pareados). A soropositividade de indivíduos pós MDT para o PGL-I foi de 8%. E a proteína controle (ML1213) gerou resposta em 8% dos indivíduos pós MDT (Figura 5A).

Entre os contatos domiciliares de pacientes MB as taxas de positividade para as proteínas recombinantes variaram de 3 a 8%, sendo que 11% dos contactantes possuíam anticorpos anti-PGL-I (Figura 5B). A proteína ML1213 apresentou baixa taxa de reconhecimento neste grupo (2.7%).

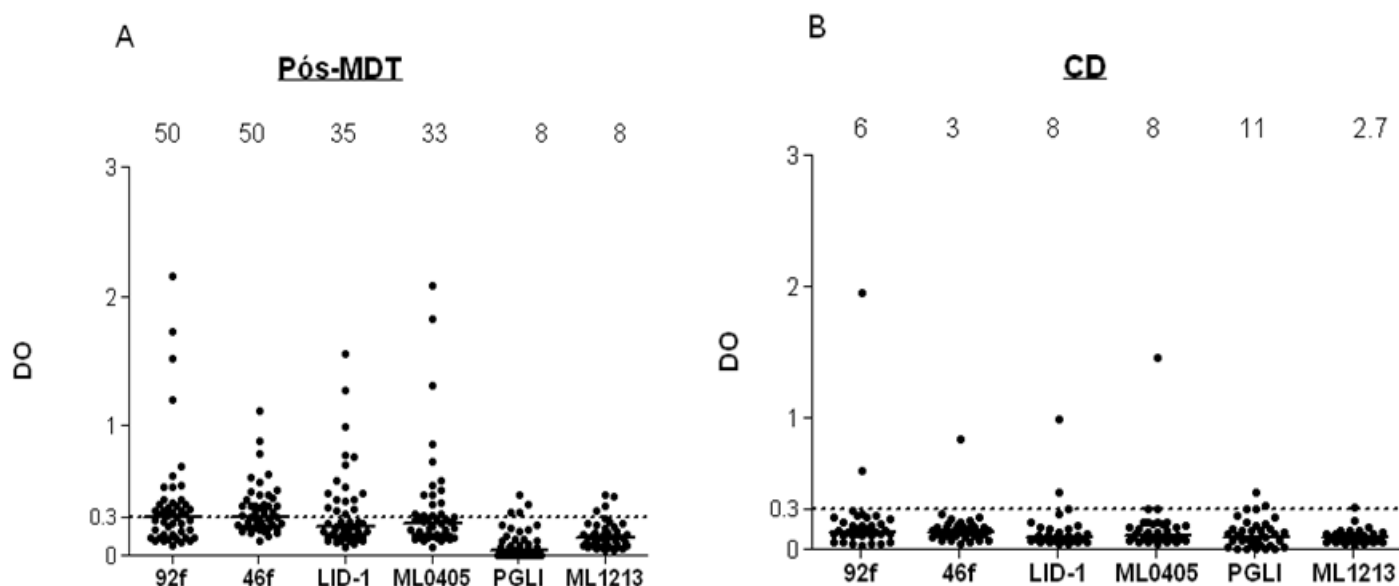


Figura 5. Reatividade sorológica as proteínas recombinantes do *M. leprae* (92f, 46f, LID-1, ML0405 e ML1213) e PGL-I entre os participantes da Vila do Prata/PA: A. Pós MDT, indivíduos que receberam MDT no passado (n= 47); B. contatos domiciliares de pacientes MB (n= 36). Anticorpos IgG para as proteínas recombinantes e IgM para PGL-I foram detectados por ELISA. Cada ponto representa a média da DO de uma amostra de soro e a mediana da DO de cada grupo é representada pela linha horizontal e a linha tracejada representa o cut-off (DO>0.3). O número na parte superior da figura representa a porcentagem de resposta positiva. DO: Densidade óptica.

O grupo pós MDT proveniente da Vila do Prata/PA também foi estratificado de acordo com o tempo decorrido após o tratamento (MDT): 4-5 anos n=5; 6-10 anos n=32; 11-20 anos n=10. A análise do efeito do tempo sobre os níveis de anticorpos anti- proteínas recombinantes e anti- PGL-I mostrou que não houve correlação entre o tempo decorrido após a MDT e os níveis de anticorpos (Kruskal Wallis $p>0.05$). Entre os indivíduos que concluíram a MDT entre seis e dez anos atrás (n=32) 31% possuíam anticorpos anti-LID-1 e 8% foram soropositivos para o PGL-I. E entre os pacientes tratados entre 10 e 20 atrás (n=10) maiores taxas de soropositividade foram encontradas: 50% para LID-1 e 14% para o PGL-I. (Figura 6).

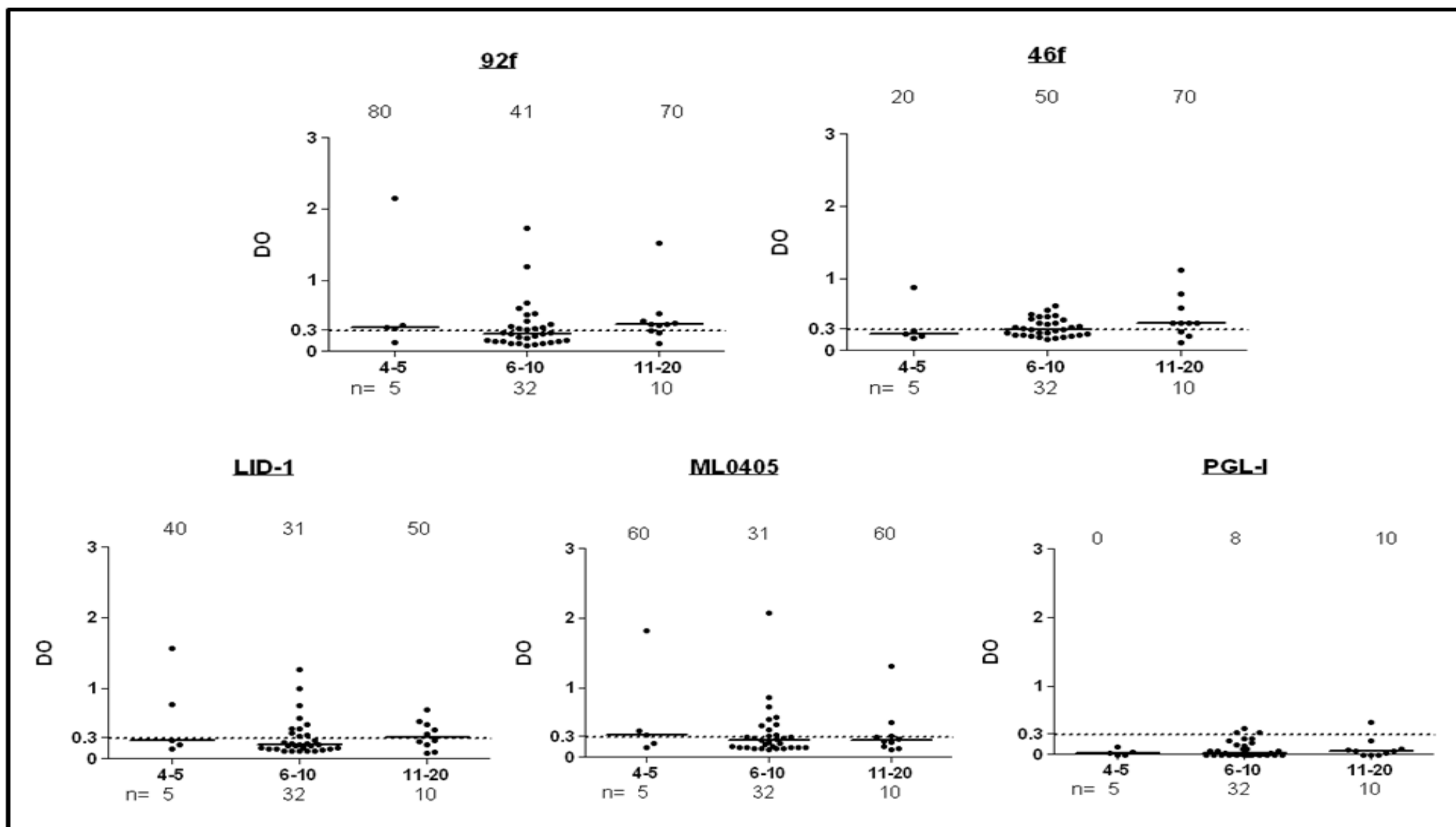


Figura 6. Sororeatividade para as proteínas recombinantes do *M. leprae* (92f, 46f, LID-1 e ML0405) e PGL-I em indivíduos previamente tratados com MDT da Vila do Prata/PA. Os indivíduos foram estratificados por tempo pós tratamento (4-5 anos; 6-10 anos e 11-20 anos). Anticorpos IgG para as proteínas recombinantes e IgM para PGL-I foram detectados por ELISA. Cada ponto representa a média da DO de uma amostra de soro, mediana da DO de cada grupo é representada pela linha horizontal e a linha tracejada representa o cut-off (DO>0.3).O número na parte superior indica a porcentagem de respostas acima do cut-off e o número de indivíduos em cada estrato de tempo é indicado na parte inferior da figura. DO: Densidade óptica

6. DISCUSSÃO

Apesar da hanseníase representar uma das doenças infecciosas mais antigas da humanidade, o seu diagnóstico se baseia em sinais e sintomas clínicos da doença. Até o momento não há nenhum teste laboratorial comercialmente disponível para o diagnóstico da hanseníase que continua a representar um grave problema de saúde pública em vários países, dentre eles o Brasil. Neste cenário, o desenvolvimento de testes laboratoriais que possam ser utilizados para auxiliar o diagnóstico da hanseníase é considerado um tema prioritário para pesquisa (Oskam & Bühner-Sékula 2003; Stefani 2008).

A sorologia anti PGL-I para detecção de anticorpos da classe IgM contra o fenoglicolípídeo específico de membrana do *M. leprae* representa o teste sorológico melhor padronizado e avaliado para hanseníase (Young et al. 1983; Bühner-Sékula et al. 1998; Bühner-Sékula et al. 2001; Bühner-Sékula et al. 2003). Entretanto, diversos estudos demonstraram que a sorologia anti PGL-I não deve ser usada como teste diagnóstico uma vez que seus resultados refletem o índice bacilar do paciente. Portanto, pacientes multibacilares são na sua maioria positivos e a grande parte dos pacientes paucibacilares é soronegativa (Fine et al. 1988; Bühner-Sékula et al. 2007). Após a decodificação do genoma completo do *M. leprae*, várias proteínas recombinantes do bacilo têm sido avaliadas por diversos grupos de pesquisa, dentre eles o nosso grupo da UFG, visando identificar novos antígenos para diagnóstico e/ou vacinas. A meta destes estudos não é identificar antígenos para substituir o PGL-I e sim identificar antígenos que possam complementar a sorologia anti PGL-I conferindo-lhe maior sensibilidade para os pacientes MB. Na última década cerca de 200 novas proteínas recombinantes do *M. leprae* foram avaliadas quanto à imunoreatividade (Spencer et al. 2005; Reece et al. 2006; Duthie et al. 2007; Duthie et al. 2010; Geluk et al. 2011- revisão).

Apesar de extensa informação já gerada, a fase de triagem das proteínas recombinantes com potencial para uso em diagnóstico ainda não foi concluída. O genoma do *M. leprae* possui 1.604 genes potencialmente ativos

(Cole et al. 2001) e nem todas proteínas que o genoma do bacilo pode codificar foram avaliadas. Somente 165 genes do *M. leprae* não possuem ortólogo no *M. tuberculosis* e foram considerados específicos do *M. leprae*. Entretanto, as análises *in silico* demonstraram que muitas proteínas com alto grau de homologia com proteínas de outras micobactérias não apresentam reatividade cruzada na sorologia com grupos controle (tuberculose e indivíduos saudáveis de área endêmica). Além disso, existe uma quantidade imprevisível de novas proteínas de fusão que podem ser produzidas, aumentando as possibilidades de antígenos para serem avaliados. As proteínas de fusão 46f e 92f foram descritas anteriormente quanto a sua reatividade celular e as proteínas ML0405 e LID-1 foram avaliadas em 2007 por nosso grupo de pesquisa e identificadas como fortes indutoras de imunidade humoral específica ao *M. leprae* em pacientes com hanseníase MB com as formas clínicas LL/BL (Duthie et al. 2007; Duthie et al. 2008a; Sampaio et al. 2012). Neste trabalho, extendemos a avaliação imunológica humoral destas proteínas em um grande painel de amostras de indivíduos provenientes de duas regiões endêmicas distintas do Brasil com diferentes composições étnicas/ genéticas.

De um modo geral, entre os 847 indivíduos testados de Rondonópolis/MT e Vila do Prata/PA observamos diferentes graus de sororeatividade para as proteínas recombinantes do *M. leprae*. Os pacientes MB foram os mais reativos, seguidos dos indivíduos tratados para hanseníase MB, pacientes PB, contatos domiciliares e controles saudáveis de área endêmica. Os resultados entre os pacientes com hanseníase (PB e MB) mostram que, assim como ocorre na resposta ao PGL-I a soropositividade para as proteínas recombinantes pode refletir o índice bacilar do paciente: pacientes MB apresentam altas taxas de soropositividade enquanto a grande maioria dos pacientes PB tem sorologia negativa. A reatividade sorológica observada entre os contatos domiciliares e controles saudáveis provavelmente indica exposição ao *M. leprae*. De forma semelhante, outros estudos têm mostrado diferentes taxas de reatividade entre diversos grupos incluindo pacientes com hanseníase MB e PB, contactantes domiciliares e controles de área endêmica e não endêmica (Reece et al. 2006; Duthie et al. 2007; Sampaio et al. 2011).

No presente estudo, as taxas de reconhecimento do PGL-I e das proteínas recombinantes entre os pacientes com hanseníase MB foram

similares, em torno de 80%, semelhantes as encontradas por outros estudos (Oskam & Bühner-Sékula 2003; Duthie et al. 2007; Sampaio et al. 2011). Entretanto, no nosso estudo alguns pacientes MB com sorologia anti-PGL-I negativa, apresentaram anticorpos para as proteínas do *M. leprae*. Entre os 10 pacientes MB soronegativos para o PGL-I (média de DO: 0- 0.26), cinco apresentavam anticorpos anti-LID-1 (média de DO: 0.4- 1.7) e quatro destes reconheceram as proteínas 92f, 46f e ML0405. Esta análise permite concluir que pelo menos em teoria a associação de proteínas recombinantes ao PGL-I pode resultar em um teste sorológico com maior sensibilidade para hanseníase MB. Teoricamente se tivéssemos um teste sorológico associando o PGL-I e a proteína de fusão LID-1, a taxa de reatividade entre pacientes com hanseníase MB passaria de 83% (48/58) para 91% (53/58).

O uso de quimioprofilaxia em contatos domiciliares de pacientes com hanseníase MB ainda representa um tema polêmico. Uma revisão sistemática e meta-análise mostrou que a incidência de hanseníase entre contatos pode ser reduzida entre 30-72% pelo uso de quimioprofilaxia. Os fármacos acedapsona, rifampicina e dapsona foram avaliados e todos diminuíram a incidência de hanseníase quando comparados ao placebo (Revez et al. 2009). Em nosso estudo a reatividade sorológica para o PGL-I entre os contatos domiciliares de pacientes MB foi de 3% em Rondonópolis e 11% na Vila do Prata. Entre as proteínas recombinantes as taxas de positividade variaram de 3 a 7% nas duas áreas de estudo. As taxas de sororeatividade para o PGL-I foram maiores entre os controles saudáveis (9%) do que entre os contactantes domiciliares de pacientes MB (3%). Enquanto todos os contactantes foram avaliados por um clínico para possível diagnóstico de casos novos, somente controles saudáveis que apresentaram sorologia anti PGL-I positiva foram avaliados clinicamente. Desta forma este procedimento pode explicar a menor reatividade entre os contactantes.

Sabe-se que indivíduos que convivem por longo período no mesmo domicílio de pacientes com hanseníase MB sem tratamento tem risco aumentado de desenvolver a doença quando comparados a população geral (Van Beers et al. 1999). A soropositividade para o PGL-I entre contatos tem sido considerada um fator de risco para o desenvolvimento de hanseníase e este dado pode ter aplicações para os programas de controle da hanseníase

(Douglas et al. 2004). Desta forma, medidas preventivas tais como a quimioprofilaxia ou monitoramento para prevenção do diagnóstico tardio poderiam ser implementadas mediante o resultado positivo da sorologia anti-PGL-I (Oskam & Bühner-Sékula 2003). A quimioprofilaxia entre contatos não domiciliares, como vizinhos e pessoas que compartilham o mesmo ambiente de trabalho não é recomendada, pois sua eficácia ainda não foi comprovada neste grupo e pode ser considerada antiética devido a exposição/revelação da identidade do caso índice (Rodrigues e Lockwood 2011). Nossos resultados indicam que cerca de 10% dos contactantes domiciliares de pacientes MB apresentaram sorologia positiva para o PGL-I e para as proteínas recombinantes. Estes indivíduos poderiam representar potenciais candidatos a receber quimioprofilaxia para hanseníase. Foi demonstrado que cerca de 10% dos contatos apresentam DNA de *M. leprae* em biópsias de mucosa nasal e 4% tem DNA de *M. leprae* detectado em swab nasal (Patrocínio et al. 2005). Entretanto, não se sabe qual o papel dos contatos de pacientes MB na propagação do bacilo e na transmissão da hanseníase. A OMS por meio da Estratégia Global para Maior Redução da Carga de Hanseníase (período do plano 2011-2015) estimula o uso da quimioprofilaxia em contatos como uma ferramenta para prevenir casos novos de hanseníase. Para isso a OMS recomendou que um grupo de trabalho fosse criado para revisar os dados disponíveis sobre quimioprofilaxia e desenvolver protocolos apropriados para a implementação desta ferramenta nas estratégias de controle da hanseníase (WHO 2009). No Brasil, o Programa de Controle da Hanseníase do Ministério da Saúde não inclui recomendação de quimioprofilaxia para contactantes de pacientes MB com sorologia positiva.

A vacinação com BCG foi inicialmente proposta para prevenção da tuberculose, e sabe-se que uma única dose de BCG é capaz de conferir significativa proteção contra hanseníase, variando de 20-80%. As razões para tal variação não são completamente compreendidas, mas podem ser devido as diferentes cepas utilizadas na vacina, diferentes doses usadas e distintas características genéticas e fisiológicas das populações avaliadas (Abel et al. 1990). No Brasil, a vacina BCG é recomendada para prevenção de neurotuberculose e tuberculose miliar na infância e para contactantes de pacientes com tuberculose e hanseníase (Ministério da Saúde 2001b). No

presente estudo os 10% dos contactantes domiciliares de pacientes MB apresentaram sorologia positiva para o PGL-I e para as proteínas recombinantes. Embora a vacinação com BCG seja indicada para todos os contactantes domiciliares, em especial os contactantes soropositivos podem se beneficiar do reforço com BCG, pois estes tem risco maior de desenvolver a hanseníase. O acompanhamento de contactantes de pacientes MB esta fora do escopo deste estudo.

A presença de reatividade cruzada pode ser um problema adicional no desenvolvimento de testes sorológicos, especialmente para o diagnóstico da hanseníase. Em vários países hiperendêmicos para hanseníase ocorrem altas taxas de incidência de tuberculose, há alta cobertura vacinal com BCG neonatal simultaneamente com alto nível de exposição à micobactérias ambientais não patogênicas (Geluk et al. 2005). O grau de homologia entre proteínas e outros componentes celulares das micobactérias é muito alto, o que pode resultar em baixa especificidade. Para evitar a reatividade cruzada alguns autores utilizaram análises *in silico* para seleção prévia de antígenos testando apenas antígenos que não apresentaram homólogos em outras micobactérias (Spencer et al. 2005; Geluk et al. 2005; Geluk et al. 2009; Geluk et al. 2012). As proteínas que foram incorporadas para formação das proteínas de fusão 92f, 46f e LID-1 e as proteínas recombinantes ML0405 e ML1213 apresentam homólogos no *M. tuberculosis* e *M. bovis*. Entretanto, quando essas proteínas foram avaliadas em controles saudáveis, pacientes com tuberculose pulmonar e contactantes de pacientes com hanseníase MB de Goiânia/Goiás não houve reatividade cruzada com pacientes com tuberculose pulmonar nem em indivíduos saudáveis com cicatriz vacinal de BCG, sendo que em Goiânia a cobertura vacinal com BCG é alta (em torno de 90%) (Duthie et al. 2007; Hungria et al. 2012). Não possuímos dados para confirmar o percentual de cobertura vacinal nos grupos de estudo de Rondonópolis/MT e Vila do Prata/PA. Entretanto, as taxas de reatividade entre os contactantes e indivíduos saudáveis destes dois locais foram baixas. Muitos destes participantes testados provavelmente foram vacinados com BCG, pois desde 1971 a vacina BCG é utilizada no Brasil. Não podemos descartar a possibilidade que a baixa reatividade para as proteínas recombinantes encontrada entre os CD e CS possa ser devido a exposição ao *M. leprae* em

área hiperendêmica ou a micobactérias ambientais. Existem evidências de que a proteção contra a tuberculose e a hanseníase possa ser induzida pela exposição à micobactérias ambientais, devido à expressão de antígenos homólogos (Fine et al. 2001).

Os dois locais de recrutamento deste estudo apresentam diferentes IDHs, índice que avalia qualidade de vida e desenvolvimento econômico, com escala variando de 0 a 1. O município de Rondonópolis/MT possui um IDH de 0.791 e o município de Igarapé-Açu/PA onde se localiza a Vila do Prata apresentou um IDH de 0.67 em 2011 (pnud.org.br). A população da Vila do Prata apresenta baixo grau de escolaridade, baixo nível sócio-econômico e o menor IDH entre os dois municípios avaliados. Estudo prévio realizado nesta população indicou uma das maiores taxas de prevalência de hanseníase do mundo (Lazaro et al. 2011). Indiretamente nossos resultados confirmam dados da literatura que associam hanseníase e pobreza. Como a população da Vila do Prata permanece isolada até os dias atuais, ações governamentais que melhorem o acesso aos serviços de saúde, favorecendo o monitoramento de indivíduos de alto risco, diagnóstico e tratamento precoces poderiam diminuir as taxas de prevalência de hanseníase nesta população. A Vila do Prata foi formada por indivíduos geneticamente susceptíveis a hanseníase (filhos e familiares de antigos pacientes que ficaram isolados neste leprosário) e seus moradores permanecem isolados por quase um século com altas taxas de exposição ao *M. leprae*. Se um teste POC para hanseníase estivesse disponível para monitoramento de indivíduos de alto risco, muitos moradores da Vila do Prata poderiam ser candidatos a receber quimioprofilaxia, tais como os contatos domiciliares positivos para o PGL-I e proteínas recombinantes.

Os pacientes PB são caracterizados por apresentarem imunidade celular ao *M. leprae* e fraca produção de anticorpos (Ridley e Jopling 1966; Yamamura et al. 1992). Corroborando estudos prévios, a sororeatividade de pacientes PB para proteínas recombinantes do *M. leprae* e PGL-I foi baixa. Curiosamente a proteína 92f que apresentou as menores taxas de reconhecimento no grupo de pacientes MB (59%) foi a mais reativa entre os pacientes PB (16%). A proteína 92f é formada pela tri-fusão das proteínas ML2028, ML2346 e ML1862. A proteína ML2028 é membro da família de proteínas do complexo Ag85B e foi descrita como sendo capaz de detectar

resposta de anticorpos na maioria dos pacientes PB. Esta proteína detectou 90% dos pacientes LL/BL e 65% dos pacientes TT/BT por ELISA em um estudo realizado em pacientes com hanseníase provenientes das Filipinas. Neste mesmo estudo baixas taxas de sororeatividade foram encontradas nos controles endêmicos e nos pacientes com tuberculose (Spencer et al. 2011). Desta forma, é provável que a proteína recombinante ML2028 presente na proteína de fusão 92f contribua para reatividade observada em pacientes PB. As respostas imunológicas para proteínas de fusão é imprevisível podendo resultar em maior ou menor reatividade em razão do processo de fusão. Nas proteínas de fusão pode ocorrer sinergismo devido ao aumento na disponibilidade de epítomos imunogênicos aumentando a resposta às proteínas de fusão. No entanto, frequentemente a resposta às proteínas de fusão pode ser diminuída, como uma consequência da menor disponibilidade de epítomos devido ao enovelamento tridimensional da nova proteína gerada ou simplesmente por uma diminuição na densidade de epítomos. Infelizmente, não há método racional ou preditivo para avaliar estas possibilidades antes da expressão e avaliação biológica.

Em nosso estudo avaliamos um grupo de antigos pacientes que foram diagnosticados com hanseníase MB e concluíram o tratamento entre 1990-2006 (grupo pós MDT). Estudos anteriores mostraram que os níveis de anticorpos anti PGL-I em pacientes avaliados após a MDT apresentaram significativo declínio (Cho et al. 1991; Roche et al. 1993; Cho et al. 2001; Silva et al. 2007). Um estudo recente, avaliou o impacto da MDT na resposta de anticorpos (IgG) as proteínas recombinantes do *M. leprae* (Duthie et al. 2011b). Foram avaliados antigos pacientes que receberam tratamento (MDT) há dez anos (1999-2002), contatos de pacientes MB e controles saudáveis de quatro vilas da Venezuela, onde a hanseníase foi endêmica uma década atrás. Entre os antigos casos de hanseníase houve redução dos níveis de anticorpos IgG anti proteínas recombinantes (ML0405, ML2331 e LID-1). Entretanto, quatro dos indivíduos tratados (4/57), mostraram respostas positivas quando comparadas aos controles. Para estes indivíduos a reatividade foi associada a tratamento irregular ou inadequado. Comparado aos nossos resultados identificamos maiores taxas de positividade entre os indivíduos pós MDT nos dois locais de recrutamento. Nos dois grupos pós MDT (Rondonópolis/MT e

Vila do Prata/PA) não observamos relação entre o tempo decorrido após a MDT e os níveis de anticorpos. Nosso estudo não foi delineado para verificar o efeito do tempo pós MDT no declínio de anticorpos e este efeito provavelmente é variável entre diferentes indivíduos. Além disso, como nosso estudo foi uma avaliação transversal e não um estudo de coorte, não possuímos dados suficientes para avaliar se houve tratamento incorreto/irregular e qual seria a taxa de recidiva nestes grupos. Para se verificar o efeito do tempo pós MDT no declínio dos níveis de anticorpos o ideal seria monitorar numa coorte pacientes em diferentes períodos durante e após a MDT.

É importante salientar que os pacientes dos grupos pós MDT receberam tratamento entre 1990 e 2006, neste período a classificação da hanseníase, a duração do tratamento, a definição de cura e as taxas de cobertura sofreram alterações, dificultando a comparação dos resultados deste grupo. Em 1981 a OMS recomendou o uso da MDT para todos os pacientes com hanseníase. Neste período os pacientes PB eram tratados por 6 meses, já o regime para os MB era de 24 meses ou até a baciloscopia se tornar negativa (WHO 1994). Em novembro de 1987 o *Expert Committee on Leprosy* fez alterações na classificação dos casos de hanseníase para proposta de MDT: todos os pacientes com baciloscopia positiva deveriam ser classificados como MB, mesmo que apresentassem menos de 5 lesões de pele. Em 1992, o tratamento com duração fixa foi implementado (6 meses para PB e 24 meses para MB) e o exame baciloscópico deixou de ser utilizado para definição de cura. No ano 2000 a duração do tratamento para pacientes MB foi diminuída de 24 para 12 meses (WHO 2004). A implementação global da MDT foi gradual, entre 1990-1993 a cobertura com MDT era de aproximadamente 50% e a partir de 1997 as taxas de cobertura passaram para 100% (WHO 2012).

Estudo prévio (Duthie et al. 2011b) também avaliou o declínio da resposta de anticorpos durante a MDT em 107 pacientes provenientes de São Paulo/Brasil acompanhados desde o início do tratamento e a cada dois meses, até completarem 5 meses de tratamento. A resposta de anticorpos declinou gradualmente durante a MDT, sendo o declínio da resposta de anticorpos anti proteínas recombinantes mais pronunciada (30%) do que o declínio de IgM para o PGL-I (10%). No presente estudo a mediana da DO para PGL-I entre os indivíduos pós MDT de Rondonópolis e da Vila do Prata foi menor que a

mediana da DO para as proteínas recombinantes e menores taxas de positividade foram encontradas para o PGL-I. Entre os indivíduos pós MDT provenientes de Rondonópolis a positividade para o PGL-I foi de 14% e de 42% para LID-1. Na Vila do Prata, 8% dos indivíduos pós MDT reconheceram o PGL-I e 35% foram positivos para LID-1. Diferentemente dos resultados anteriores, nossos resultados sugerem que os anticorpos IgM para o PGL-I declinam mais rapidamente do que os anticorpos IgG para as proteínas recombinantes. Contudo, a mediana da DO da sorologia para LID-1 entre pacientes MB virgens de tratamento foi duas vezes maior do que a mediana da DO da sorologia para PGL-I (1.6 e 0.74, respectivamente). Além disso, a taxa de positividade para PGL-I (83%) foi menor do que a obtida para LID-1 (89%) entre pacientes MB virgens de tratamento. Em conjunto, estes resultados podem justificar a menor reatividade para o PGL-I observada entre os indivíduos pós MDT. Além disso, as discrepâncias observadas entre o nosso estudo e o estudo de Duthie et al. (2011b) também podem ser pelo menos parcialmente atribuídas ao uso de diferentes análogos sintéticos do PGL-I (dissacarídeo ND-O-BSA usado por Duthie et al. e trissacarídeo NT-P-BSA usado neste estudo). Além disso, diferenças na forma de avaliar a positividade (índice ELISA usado por Duthie et al. e mediana de DO usada neste estudo) e características distintas nas populações avaliadas podem ter contribuído para estas discrepâncias.

Diferentes alelos do complexo HLA distribuídos de forma distinta entre grupos populacionais podem influenciar a reatividade imunológica as proteínas recombinantes do *M. leprae* (Geluk et al. 2005). Desta forma, um teste diagnóstico com aplicação para países endêmicos deve ser comprovadamente sensível e específico em pacientes de diferentes regiões geográficas. A avaliação de proteínas recombinantes previamente identificadas como indutoras de reatividade humoral específica para o *M. leprae* em diferentes grupos de estudo do estado de Goiás e em outras duas regiões geográficas mostrou que proteínas imunogênicas e específicas foram reconhecidas por pacientes MB de outras duas áreas hiperendêmicas para hanseníase com composições étnicas/genéticas diferentes. Não se pode descartar que diferenças regionais nos alelos HLA impliquem na utilização simultânea de múltiplos antígenos em um único teste diagnóstico.

Sabe-se que os pacientes com hanseníase multibacilar não tratados eliminam grandes quantidades de bacilos pela mucosa nasal representando a principal fonte de transmissão do bacilo (Job et al. 2008). A estratégia de eliminação da hanseníase baseada na MDT não afetou as taxas de incidência da doença e a transmissão da doença permanece ativa. Portanto, um teste laboratorial capaz de diagnosticar precocemente pacientes MB, principalmente um teste POC que possa ser usado em situações de campo nos países endêmicos, poderá contribuir para a rápida introdução da MDT auxiliando a interrupção da cadeia transmissão do *M leprae* que é crucial para o controle da hanseníase.

7. CONCLUSÃO

- As proteínas recombinantes do *M. leprae* 92f, 46f, LID-1, ML0405 se mostraram imunogênicas e específicas quando avaliadas em um amplo painel de amostras de pacientes e controles provenientes de duas regiões endêmicas para hanseníase no centro-oeste e norte do Brasil (Rondonópolis/MT e Vila do Prata/PA).
- Entre os pacientes multibacilares de Rondonópolis/MT taxas de reatividade acima de 80% foram detectadas para as proteínas recombinantes (46f, LID-1 e ML0405) e PGL-I. Entre os pacientes paucibacilares as taxas de reatividade para as proteínas recombinantes variaram de 5-16% e para o PGL-I a taxa de reatividade foi de 12%. Nossos dados sugerem que o desenvolvimento de um teste sorológico que associe proteínas recombinantes do *M. leprae* e PGL-I poderá resultar em teste de maior sensibilidade para hanseníase MB.
- Entre os contactantes de pacientes MB de Rondonópolis/MT a reatividade para as proteínas variou de 4-7% e na Vila do Prata/PA a reatividade variou 3-8%. Diferentes taxas de positividade foram encontradas para o PGL-I, sendo que 3% dos contactantes de Rondonópolis foram soropositivos e 11% dos contactantes da Vila do Prata/PA. Os contactantes soropositivos para proteínas recombinantes e PGL-I representam os potenciais candidatos a receber quimioprofilaxia.
- Entre os controles saudáveis de área endêmica (Rondonópolis/MT) as taxas de reatividade para as proteínas recombinantes e PGL-I foram baixas (3-9%), indicando que apesar das altas taxas de incidência de tuberculose e alta cobertura vacinal com BCG e a exposição à micobactérias ambientais não patogênicas, não observamos reatividade cruzada.
- Nos grupos pós MDT, observou-se declínio das taxas de reatividade para as proteínas recombinantes e PGL-I em relação a pacientes MB recém diagnosticados e virgens de tratamento.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abel L, Cua VV, Oberti J, Lap VD, Due LK, Grosset J, Lagrange PH 1990. Leprosy and BCG in southern Vietnam. *Lancet* 335: 1536.

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 2006a. Towards an immunodiagnostic test for leprosy. *Microbes Infect* 8: 2270-2276.

Araoz R, Honore N, Cho S, Kim JP, Cho SN, Monot M, Demangel C, Brennan PJ, Cole ST 2006b. Antigen discovery: a postgenomic approach to leprosy diagnosis. *Infect Immun* 74: 175-182.

Arnoldi J, Gerdes J, Flad HD 1990. Immunohistologic assessment of cytokine production of infiltrating cells in various forms of leprosy. *Am J Pathol* 137: 749-753.

Arnoldi J, Schluter C, Duchrow M, Hubner L, Ernst M, Teske A, Flad HD, Gerdes J, Bottger EC 1992. Species-specific assessment of *Mycobacterium leprae* in skin biopsies by in situ hybridization and polymerase chain reaction. *Lab Invest* 66: 618-623.

Aseffa A, Brennan P, Dockrell H, Gillis T, Hussain R, Oskam L, Hendrik JAN 2005. Report on the first meeting of the IDEAL (Initiative for Diagnostic and Epidemiological Assays for Leprosy) Consortium held at Armauer Hansen on 24 – 27 October 2004. *Lepr Rev* 76 :147-159.

Attia EA, Abdallah M, Saad AA, Afifi A, El Tabbakh A, El-Shennawy D, Ali HB 2010. Circulating CD4+ CD25 high FoxP3+ T cells vary in different clinical forms of leprosy. *Int J Dermatol* 49: 1152-1158.

Bang PD, Suzuki K, Phuong le T, Chu TM, Ishii N, Khang TH 2009. Evaluation of polymerase chain reaction-based detection of *Mycobacterium leprae* for the diagnosis of leprosy. *J Dermatol* 36: 269-276.

Barnes PF, Chatterjee D, Brennan PJ, Rea TH, Modlin RL 1992. Tumor necrosis factor production in patients with leprosy. *Infect Immun* 60: 1441-1446.

Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC 1997. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* 15: 749-795.

Brasil. Lei Nº 9.010, de 29 de março de 1995. Dispõe sobre a terminologia oficial relativa à hanseníase e dá outras providências. Casa Civil/ Subchefia para Assuntos Jurídicos. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L9010.htm

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

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

Britton WJ 1993. Immunology of leprosy. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 87: 508-514.

Bührer-Sékula S, Cunha MG, Ferreira WA, Klatser PR 1998. The use of whole blood in a dipstick assay for detection of antibodies to *Mycobacterium leprae*: a field evaluation. *FEMS Immunol Med Microbiol* 21: 197-201.

Bührer-Sékula S, Sarno EN, Oskam L, Koop S, Wichers I, Nery JA, Vieira LM, de Matos HJ, Faber WR, Klatser PR 2000. Use of ML dipstick as a tool to classify leprosy patients. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 68: 456-463.

Bührer-Sékula S, Cunha MG, Foss NT, Oskam L, Faber WR, Klatser PR 2001. Dipstick assay to identify leprosy patients who have an increased risk of relapse. *Trop Med Int Health* 6: 317-323.

Bührer-Sékula S, Smits HL, Gussenhoven GC, van Leeuwen J, Amador S, Fujiwara T, Klatser PR, Oskam L 2003. Simple and fast lateral flow test for classification of leprosy patients and identification of contacts with high risk of developing leprosy. *J Clin Microbiol* 41: 1991-1995.

Bührer-Sékula S, Visschedijk J, Grossi MA, Dhakal KP, Namadi AU, Klatser PR, Oskam L 2007. The ML flow test as a point of care test for leprosy control programmes: potential effects on classification of leprosy patients. *Lepr Rev* 78: 70-79.

Chen G, Pedra JH 2010. The inflammasome in host defense. *Sensors (Basel)* 10: 97-111.

Cho SN, Cellona RV, Fajardo TT, Jr., Abalos RM, dela Cruz EC, Walsh GP, Kim JD, Brennan PJ 1991. Detection of phenolic glycolipid-I antigen and antibody in sera from new and relapsed lepromatous patients treated with various drug regimens. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 59: 25-31.

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

Cho SN, Cellona RV, Villahermosa LG, Fajardo TT, Jr., Balagon MV, Abalos RM, Tan EV, Walsh GP, Kim JD, Brennan PJ 2001. Detection of phenolic glycolipid I of *Mycobacterium leprae* in sera from leprosy patients before and after start of multidrug therapy. *Clin Diagn Lab Immunol* 8: 138-142.

Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE, 3rd, Tekaia 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 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393: 537-544.

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 2001. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature* 409: 1007-1011.

Cooper CL, Mueller C, Sinchaisri TA, Pirmez C, Chan J, Kaplan G, Young SM, Weissman IL, Bloom BR, Rea TH, et al. 1989. Analysis of naturally occurring delayed-type hypersensitivity reactions in leprosy by in situ hybridization. *J Exp Med* 169: 1565-1581.

Corstjens PL, de Dood CJ, van der Ploeg-van Schip JJ, Wiesmeijer KC, Riuttamaki T, van Meijgaarden KE, Spencer JS, Tanke HJ, Ottenhoff TH, Geluk A 2010. Lateral flow assay for simultaneous detection of cellular- and humoral immune responses. *Clin Biochem* 44: 1241-1246.

Cuevas J, Rodriguez-Peralto JL, Carrillo R, Contreras F 2007. Erythema nodosum leprosum: reactional leprosy. *Semin Cutan Med Surg* 26: 126-130.

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

Demangel C, Britton WJ 2000. Interaction of dendritic cells with mycobacteria: where the action starts. *Immunol Cell Biol* 78: 318-324.

Desikan KV, Sreevatsa 1995. Extended studies on the viability of *Mycobacterium leprae* outside the human body. *Lepr Rev* 66: 287-295.

Douglas JT, Cellona RV, Fajardo TT, Jr., Abalos RM, Balagon MV, Klatser PR 2004. Prospective study of serological conversion as a risk factor for development of leprosy among household contacts. *Clin Diagn Lab Immunol* 11: 897-900.

Duncan ME 1993. An historical and clinical review of the interaction of leprosy and pregnancy: a cycle to be broken. *Soc Sci Med* 37: 457-472.

Duppre NC, Camacho LA, da Cunha SS, Struchiner CJ, Sales AM, Nery JA, Sarno EN 2008. Effectiveness of BCG vaccination among leprosy contacts: a cohort study. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 102: 631-638.

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, Hoft D, Reed SG 2007. Use of protein antigens for early serological diagnosis of leprosy. *Clin Vaccine Immunol* 14: 1400-1408.

Duthie MS, Goto W, Ireton GC, Reece ST, Sampaio LH, Grassi AB, Sousa AL, Martelli CM, Stefani MM, Reed SG 2008a. Antigen-specific T-cell responses of leprosy patients. *Clin Vaccine Immunol* 15: 1659-1665.

Duthie MS, Ireton GC, Kanaujia GV, Goto W, Liang H, Bhatia A, Busceti JM, Macdonald M, Neupane KD, Ranjit C, Sapkota BR, Balagon M, Esfandiari J, Carter D, Reed SG 2008b. Selection of antigens and development of prototype tests for point-of-care leprosy diagnosis. *Clin Vaccine Immunol* 15: 1590-1597.

Duthie MS, Hay MN, Morales CZ, Carter L, Mohamath R, Ito L, Oyafuso LK, Manini MI, Balagon MV, Tan EV, Saunderson PR, Reed SG, Carter D 2009. Rational design and evaluation of a multiepitope chimeric fusion protein with the potential for leprosy diagnosis. *Clin Vaccine Immunol* 17: 298-303.

Duthie MS, Truman RW, Goto W, O'Donnell J, Hay MN, Spencer JS, Carter D, Reed SG 2010. Insight toward early diagnosis of leprosy through analysis of the developing antibody responses of *Mycobacterium leprae*-infected armadillos. *Clin Vaccine Immunol* 18: 254-259.

Duthie MS, Gillis TP, Reed SG 2011a. Advances and hurdles on the way toward a leprosy vaccine. *Hum Vaccin* 7: 1172-1183.

Duthie MS, Hay MN, Rada EM, Convit J, Ito L, Oyafuso LK, Manini MI, Goulart IM, Lobato J, Goulart LR, Carter D, Reed SG 2011b. Specific IgG antibody responses may be used to monitor leprosy treatment efficacy and as recurrence prognostic markers. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 30: 1257-1265.

Fine PE, Ponnighaus JM, Burgess P, Clarkson JA, Draper CC 1988. Seroepidemiological studies of leprosy in northern Malawi based on an enzyme-linked immunosorbent assay using synthetic glycoconjugate antigen. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 56: 243-54.

Fine PE, Floyd S, Stanford JL, Nkhosa P, Kasunga A, Chaguluka S, Warndorff DK, Jenkins PA, Yates M, Ponnighaus JM 2001. Environmental mycobacteria in northern Malawi: implications for the epidemiology of tuberculosis and leprosy. *Epidemiol Infect* 126: 379-387.

Fine PE 2006. Global leprosy statistics: a cause for pride, or frustration? *Lepr Rev* 77: 295-297.

Foss NT 1999. Hanseníase: Aspectos clínicos, imunológicos e terapêuticos. *An Bras Dermatol* 74: 113-119.

Franks ME, Macpherson GR, Figg WD 2004. Thalidomide. *Lancet* 363: 1802-1811.

Geluk A, Klein MR, Franken KL, van Meijgaarden KE, Wieles B, Pereira KC, Bühner-Sékula S, Klatser PR, Brennan PJ, Spencer JS, Williams DL, Pessolani MC, Sampaio EP, Ottenhoff TH 2005. Postgenomic approach to identify novel *Mycobacterium leprae* antigens with potential to improve immunodiagnosis of infection. *Infect Immun* 73: 5636-5644.

Geluk A, van der Ploeg J, Teles RO, Franken KL, Prins C, Drijfhout JW, Sarno EN, Sampaio EP, Ottenhoff TH 2008. Rational combination of peptides derived from different *Mycobacterium leprae* proteins improves sensitivity for immunodiagnosis of *M. leprae* infection. *Clin Vaccine Immunol* 15: 522-533.

Geluk A, Spencer JS, Bobosha K, Pessolani MC, Pereira GM, Banu S, Honore N, Reece ST, MacDonald M, Sapkota BR, Ranjit C, Franken KL, Zewdie M, Aseffa A, Hussain R, Stefani MM, Cho SN, Oskam L, Brennan PJ, Dockrell HM 2009. From genome-based in silico predictions to ex vivo verification of leprosy diagnosis. *Clin Vaccine Immunol* 16: 352-359.

Geluk A, van der Ploeg-van Schip JJ, van Meijgaarden KE, Commandeur S, Drijfhout JW, Benckhuijsen WE, Franken KL, Naafs B, Ottenhoff TH 2010. Enhancing sensitivity of detection of immune responses to *Mycobacterium leprae* peptides in whole-blood assays. *Clin Vaccine Immunol* 17: 993-1004.

Geluk A, Duthie MS, Spencer JS 2011. Postgenomic *Mycobacterium leprae* antigens for cellular and serological diagnosis of *M. leprae* exposure, infection and leprosy disease. *Lepr Rev* 82: 402-421.

Geluk A, Bobosha K, van der Ploeg-van Schip JJ, Spencer JS, Banu S, Martins MV, Cho SN, Franken KL, Kim HJ, Bekele Y, Uddin MK, Abdul Hadi S, Aseffa A, Pessolani MC, Pereira GM, Dockrell HM, Ottenhoff TH 2012. New biomarkers with relevance to leprosy diagnosis applicable in areas hyperendemic for leprosy. *J Immunol* 188: 4782-4791.

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

Hart BE, Tapping RI 2012. Genetic Diversity of Toll-Like Receptors and Immunity to *M. leprae* Infection. *J Trop Med* 2012: 415057.

Hernandez Mde O, Fulco Tde O, Pinheiro RO, Pereira Rde M, Redner P, Sarno EN, Lopes UG, Sampaio EP Thalidomide modulates *Mycobacterium leprae*-induced NF-kappaB pathway and lower cytokine response. *Eur J Pharmacol* 670: 272-279.

IBGE [database da Internet] - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo 2010. [acesso em 10 fevereiro de 2012]. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/estadosat>

Jacobson RR, Krahenbuhl JL 1999. Leprosy. *Lancet* 353: 655-660.

Jamil S, Wilson SM, Hackett M, Hussain R, Stoker NG 1994. A colorimetric PCR method for the detection of *M. leprae* in skin biopsies from leprosy patients. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 62: 512-520.

Job CK, Jayakumar J, Kearney M, Gillis TP 2008. Transmission of leprosy: a study of skin and nasal secretions of household contacts of leprosy patients using PCR. *Am J Trop Med Hyg* 78: 518-521.

Jopling WH 1971. Leprosy. *Practitioner* 207: 164-172.

Kahawita IP, Lockwood DN 2008. Towards understanding the pathology of erythema nodosum leprosum. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 102: 329-337.

Kaur C, Thami GP, Mohan H 2005. Lucio phenomenon and Lucio leprosy. *Clin Exp Dermatol* 30: 525-527.

Kerr-Pontes LR, Montenegro AC, Barreto ML, Werneck GL, Feldmeier H 2004. Inequality and leprosy in Northeast Brazil: an ecological study. *Int J Epidemiol* 33: 262-269.

Khanolkar-Young S, Rayment N, Brickell PM, Katz DR, Vinayakumar S, Colston MJ, Lockwood DN 1995. Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) synthesis is associated with the skin and peripheral nerve pathology of leprosy reversal reactions. *Clin Exp Immunol* 99: 196-202.

Kumar B, Dogra S, Kaur I 2004. Epidemiological characteristics of leprosy reactions: 15 years experience from north India. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 72: 125-133.

Kurabachew M, Wondimu A, Ryon JJ 1998. Reverse transcription-PCR detection of *Mycobacterium leprae* in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 36: 1352-1356.

Lazaro FP, Werneck RI, Mackert CC, Cobat A, Prevedello FC, Pimentel RP, Macedo GM, Eleuterio MA, Vilar G, Abel L, Xavier MB, Alcais A, Mira MT 2011. A major gene controls leprosy susceptibility in a hyperendemic isolated population from north of Brazil. *J Infect Dis* 201: 1598-1605.

Little D, Khanolkar-Young S, Coulthart A, Suneetha S, Lockwood DN 2001. Immunohistochemical analysis of cellular infiltrate and gamma interferon, interleukin-12, and inducible nitric oxide synthase expression in leprosy type 1 (reversal) reactions before and during prednisolone treatment. *Infect Immun* 69: 3413-3417.

Lowy L, Ridley DS 1954. The acid-fast staining properties of *Mycobacterium leprae*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 48: 406-410.

Maloy KJ, Powrie F 2001. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol* 2: 816-822.

Marcket, C. Estudo de base populacional de fatores epidemiológicos de risco e hanseníase. 2008. 90f. Dissertação. Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

Massone C, Nunzi E, Ribeiro-Rodrigues R, Talhari C, Talhari S, Schettini AP, Parente JN, Brunasso AM, Puntoni M, Clapasson A, Noto S, Cerroni L 2010. T regulatory cells and plasmacytoid dendritic cells in hansen disease: a new insight into pathogenesis? *Am J Dermatopathol* 32: 251-256.

Mastrangelo G, Marcer G, Cegolon L, Buja A, Fadda E, Scozzato L, Pavanello S 2008. How to prevent immunological reactions in leprosy patients and interrupt transmission of *Mycobacterium leprae* to healthy subjects: two hypotheses. *Med Hypotheses* 71: 551-563.

Meima A, Irgens LM, van Oortmarssen GJ, Richardus JH, Habbema JD 2002. Disappearance of leprosy from Norway: an exploration of critical factors using an epidemiological modelling approach. *Int J Epidemiol* 31: 991-1000.

Ministério da Saúde/ Secretaria de Políticas de Saúde/ Departamento de Atenção Básica. Controle da Hanseníase na Atenção Básica 2001a.

Ministério da Saúde/ Fundação Nacional de Saúde. Manual de Normas de Vacinação. 3. ed. 2001b.

Ministério da Saúde/ Secretaria de Políticas de Saúde/ Departamento de Atenção Básica. Guia para o Controle da Hanseníase 2002.

MS/SVS-Ministério da Saúde/ Secretaria de Vigilância em Saúde 2009. [acesso em 5 fevereiro 2012]. Relatório de Situação Mato Grosso. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/005_mt_relatorio_de_situacao.pdf

MS/SVS-Ministério da Saúde/ Secretaria de Vigilância em Saúde 2011. [acesso em 5 junho 2012]. Relatório de Situação Mato Grosso. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/26_mato_grosso_final.pdf

MS/SVS-Ministério da Saúde/ Secretaria de Vigilância em Saúde 2011. [acesso em 5 junho 2012]. Relatório de Situação Pará. Disponível em: http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/sistema_nacional_vigilancia_saude_pa_5ed.pdf

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

Modlin RL 2010. The innate immune response in leprosy. *Curr Opin Immunol* 22: 48-54.

Moet FJ, Meima A, Oskam L, Richardus JH 2004. Risk factors for the development of clinical leprosy among contacts, and their relevance for targeted interventions. *Lepr Rev* 75: 310-326.

Monot M, Honore N, Garnier T, Zidane N, Sherafi D, Paniz-Mondolfi A, Matsuoka M, Taylor GM, Donoghue HD, Bouwman A, Mays S, Watson C, Lockwood D, Khamesipour A, Dowlati Y, Jianping S, Rea TH, Vera-Cabrera L, Stefani MM, Banu S, Macdonald M, Sapkota BR, Spencer JS, Thomas J, Harshman K, Singh P, Busso P, Gattiker A, Rougemont J, Brennan PJ, Cole ST 2009. Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. *Nat Genet* 41: 1282-1289.

Montoya D, Cruz D, Teles RM, Lee DJ, Ochoa MT, Krutzik SR, Chun R, Schenk M, Zhang X, Ferguson BG, Burdick AE, Sarno EN, Rea TH, Hewison M, Adams JS, Cheng G, Modlin RL 2009. Divergence of macrophage phagocytic and antimicrobial programs in leprosy. *Cell Host Microbe* 6: 343-53.

Montoya D, Modlin RL 2010. Learning from leprosy: insight into the human innate immune response. *Adv Immunol* 105: 1-24.

Moraes MO, Sarno EN, Almeida AS, Saraiva BC, Nery JA, Martins RC, Sampaio EP 1999. Cytokine mRNA expression in leprosy: a possible role for interferon-gamma and interleukin-12 in reactions (RR and ENL). *Scand J Immunol* 50: 541-549.

Mosi L, Williamson H, Wallace JR, Merritt RW, Small PL 2008. Persistent association of *Mycobacterium ulcerans* with West African predaceous insects of the family belostomatidae. *Appl Environ Microbiol* 74: 7036-7042.

Mosser DM, Edwards JP 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8: 958-969.

Moubasher AD, Kamel NA, Zedan H, Raheem DD 1998. Cytokines in leprosy, I. Serum cytokine profile in leprosy. *Int J Dermatol* 37: 733-740.

Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, Blumenschein W, McClanahan T, Kastelein RA, Sedgwick JD, Cua DJ 2003. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med* 198: 1951-1957.

Nath I, Vemuri N, Reddi AL, Bharadwaj M, Brooks P, Colston MJ, Misra RS, Ramesh V 2000. Dysregulation of IL-4 expression in lepromatous leprosy patients with and without erythema nodosum leprosum. *Lepr Rev* 71 Suppl: S130-137.

Neill MA, Klebanoff SJ 1988. The effect of phenolic glycolipid-1 from *Mycobacterium leprae* on the antimicrobial activity of human macrophages. *J Exp Med* 167: 30-42.

Nishimura M, Kwon KS, Shibuta K, Yoshikawa Y, Oh CK, Suzuki T, Chung TA, Hori Y 1994. Methods in pathology. An improved method for DNA diagnosis of leprosy using formaldehyde-fixed, paraffin-embedded skin biopsies. *Mod Pathol* 7: 253-256.

Oliveira RB, Ochoa MT, Sieling PA, Rea TH, Rambukkana A, Sarno EN, Modlin RL 2003. Expression of Toll-like receptor 2 on human Schwann cells: a mechanism of nerve damage in leprosy. *Infect Immun* 71: 1427-1433.

Oskam L, Slim E, Bühner-Sékula S 2003. Serology: recent developments, strengths, limitations and prospects: a state of the art overview. *Lepr Rev* 74: 196-205.

Palermo ML, Pagliari C, Trindade MA, Yamashitafuji TM, Duarte AJ, Cacere CR, Benard G 2012. Increased expression of regulatory T cells and down-regulatory molecules in lepromatous leprosy. *Am J Trop Med Hyg* 86: 878-883.

Pasare C, Medzhitov R 2004. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Microbes Infect* 6: 1382-1387.

Patrocinio LG, Goulart IM, Goulart LR, Patrocinio JA, Ferreira FR, Fleury RN 2005. Detection of *Mycobacterium leprae* in nasal mucosa biopsies by the polymerase chain reaction. *FEMS Immunol Med Microbiol* 44: 311-316.

Pedra JH, Cassel SL, Sutterwala FS 2009. Sensing pathogens and danger signals by the inflammasome. *Curr Opin Immunol* 21: 10-16.

PNDU. Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento 2011. Relatório do Desenvolvimento Humano de 2011.

PNDU. Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento. Disponível em: [http://www.pnud.org.br/atlas/ranking/IDH-M%2091%2000%20Ranking%20decrecente%20\(pelos%20dados%20de%20000\).htm](http://www.pnud.org.br/atlas/ranking/IDH-M%2091%2000%20Ranking%20decrecente%20(pelos%20dados%20de%20000).htm). Acesso em 20 de julho de 2012.

Raman VS, O'Donnell J, Bailor HR, Goto W, Lahiri R, Gillis TP, Reed SG, Duthie MS 2009. Vaccination with the ML0276 antigen reduces local inflammation but not bacterial burden during experimental *Mycobacterium leprae* infection. *Infect Immun* 77: 5623-5630.

Rambukkana A 2000. How does *Mycobacterium leprae* target the peripheral nervous system? *Trends Microbiol* 8: 23-28.

Rambukkana A 2001. Molecular basis for the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. *Curr Opin Microbiol* 4: 21-27.

Rambukkana A, Salzer JL, Yurchenco PD, Tuomanen EI 1997. Neural targeting of *Mycobacterium leprae* mediated by the G domain of the laminin-alpha2 chain. *Cell* 88: 811-821.

Rambukkana A, Yamada H, Zanazzi G, Mathus T, Salzer JL, Yurchenco PD, Campbell KP, Fischetti VA 1998. Role of alpha-dystroglycan as a Schwann cell receptor for *Mycobacterium leprae*. *Science* 282: 2076-2079.

Reece ST, Ireton G, Mohamath R, Guderian J, Goto W, Gelber R, Groathouse N, Spencer J, Brennan P, Reed SG 2006. ML0405 and ML2331 are antigens of *Mycobacterium leprae* with potential for diagnosis of leprosy. *Clin Vaccine Immunol* 13: 333-340.

Reveiz L, Buendia JA, Tellez D 2009. Chemoprophylaxis in contacts of patients with leprosy: systematic review and meta-analysis. *Rev Panam Salud Publica* 26: 341-349.

Ridley DS 1955. The bacteriological interpretation of skin smears and biopsies in leprosy. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 49: 449-452.

Ridley DS, Jopling WH 1966. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 34: 255-273.

Ridley MJ, Ridley DS 1983. The immunopathology of erythema nodosum leprosum: the role of extravascular complexes. *Lepr Rev* 54: 95-107.

Ringshausen FC, Schablon A, Nienhaus A 2012. Interferon-gamma release assays for the tuberculosis serial testing of health care workers: a systematic review. *J Occup Med Toxicol* 7: 6.

Roach DR, Bean AG, Demangel C, France MP, Briscoe H, Britton WJ 2002. TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. *J Immunol* 168: 4620-4627.

Roche PW, Britton WJ, Failbus SS, Neupane KD, Theuvenet WJ 1993. Serological monitoring of the response to chemotherapy in leprosy patients. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 61: 35-43.

Roche PW, Theuvenet WJ, Britton WJ 1991. Risk factors for type-1 reactions in borderline leprosy patients. *Lancet* 338: 654-657.

Rodrigues LC, Lockwood D 2011. Leprosy now: epidemiology, progress, challenges, and research gaps. *Lancet Infect Dis* 11: 464-470.

Sakaguchi S, Powrie F 2007. Emerging challenges in regulatory T cell function and biology. *Science* 317: 627-629.

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155: 1151-1164.

Sampaio LH, Sousa AL, Barcelos MC, Reed SG, Stefani MM, Duthie MS 2012. Evaluation of various cytokines elicited during antigen-specific recall as potential risk indicators for the differential development of leprosy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31: 1443-1451.

Sampaio LH, Stefani MM, Oliveira RM, Sousa AL, Ireton GC, Reed SG, Duthie MS 2011. Immunologically reactive *M. leprae* antigens with relevance to diagnosis and vaccine development. *BMC Infect Dis* 11: 26-37.

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

Sarno EN, Grau GE, Vieira LM, Nery JA 1991. Serum levels of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta during leprosy reactional states. *Clin Exp Immunol* 84: 103-108.

Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL 2006. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev* 19: 338-381.

Scollard DM, Gillis TP, Williams DL 1998. Polymerase chain reaction assay for the detection and identification of *Mycobacterium leprae* in patients in the United States. *Am J Clin Pathol* 109: 642-646.

Scott P 1993. IL-12: initiation cytokine for cell-mediated immunity. *Science* 260: 496-7.

Sehgal VN 2005. Lucio's phenomenon/erythema necroticans. *Int J Dermatol* 44: 602-605.

Sehgal VN, Rege VL, Reys M 1977. Correlation between clinical and histopathologic classification in leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 45: 278-280.

Shepard CC 1960. Acid-fast bacilli in nasal excretions in leprosy, and results of inoculation of mice. *Am J Hyg* 71: 147-157.

Silva EA, Iyer A, Ura S, Lauris JR, Naafs B, Das PK, Vilani-Moreno F 2007. Utility of measuring serum levels of anti-PGL-I antibody, neopterin and C-reactive protein in monitoring leprosy patients during multi-drug treatment and reactions. *Trop Med Int Health* 12: 1450-1458.

Smith WC 2000. Review of current research in the prevention of nerve damage in leprosy. *Lepr Rev* 71 Suppl: S138-44; discussion S145.

Spellberg B, Edwards JE, Jr. 2001. Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. *Clin Infect Dis* 32: 76-102.

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 2005. Identification of specific proteins and peptides in *Mycobacterium leprae* suitable for the selective diagnosis of leprosy. *J Immunol* 175: 7930-7938.

Spencer JS, Brennan PJ 2011. The role of *Mycobacterium leprae* phenolic glycolipid I (PGL-I) in serodiagnosis and in the pathogenesis of leprosy. *Lepr Rev* 82: 344-357.

Spencer JS, Kim HJ, Wheat WH, Chatterjee D, Balagon MV, Cellona RV, Tan EV, Gelber R, Saunderson P, Duthie MS, Reece ST, Burman W, Belknap R, Mac Kenzie WR, Geluk A, Oskam L, Dockrell HM, Brennan PJ 2011. Analysis of antibody responses to *Mycobacterium leprae* phenolic glycolipid I, lipoarabinomannan, and recombinant proteins to define disease subtype-specific antigenic profiles in leprosy. *Clin Vaccine Immunol* 18: 260-267.

Sreenivasan P, Misra RS, Wilfred D, Nath I 1998. Lepromatous leprosy patients show T helper 1-like cytokine profile with differential expression of interleukin-10 during type 1 and 2 reactions. *Immunology* 95: 529-536.

Stefani MM 2008. Challenges in the post genomic era for the development of tests for leprosy diagnosis. *Rev Soc Bras Med Trop* 41 Suppl 2: 89-94.

Stefani MM, Martelli CM, Gillis TP, Krahenbuhl JL 2003. In situ type 1 cytokine gene expression and mechanisms associated with early leprosy progression. *J Infect Dis* 188: 1024-1031.

Tabouret G, Astarie-Dequeker C, Demangel C, Malaga W, Constant P, Ray A, Honore N, Bello NF, Perez E, Daffe M, Guilhot C 2010. *Mycobacterium leprae* phenolglycolipid-1 expressed by engineered *M. bovis* BCG modulates early interaction with human phagocytes. *PLoS Pathog* 6: e1001159.

Talhari S, Neves RG 1997. Hanseníase. 3a.ed. Gráfica Tropical.

Truman R 2005. Leprosy in wild armadillos. *Lepr Rev* 76: 198-208.

Truman R, Fine PE 2010. 'Environmental' sources of *Mycobacterium leprae*: issues and evidence. *Lepr Rev* 81: 89-95.

Truman RW, Singh P, Sharma R, Busso P, Rougemont J, Paniz-Mondolfi A, Kapopoulou A, Brisse S, Scollard DM, Gillis TP, Cole ST 2011. Probable zoonotic leprosy in the southern United States. *N Engl J Med* 364: 1626-1633.

Van Beers SM, Hatta M & Klatser PR 1999. Patient contact is the major determinant in incident leprosy: implications for future control. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 67(2): 119-128.

Walker SL, Lockwood DN 2006. The clinical and immunological features of leprosy. *Br Med Bull* 77-78: 103-121.

Walker SL, Waters MF, Lockwood DN 2007. The role of thalidomide in the management of erythema nodosum leprosum. *Lepr Rev* 78: 197-215.

Walker SL, Lockwood DN 2008. Leprosy type 1 (reversal) reactions and their management. *Lepr Rev* 79: 372-386.

Walsh GP, Meyers WM, Binford CH, Gerone PJ, Wolf RH, Leininger JR 1981. Leprosy--a zoonosis. *Lepr Rev* 52 Suppl 1: 77-83.

Walsh GP, Meyers WM, Binford CH 1986. Naturally acquired leprosy in the nine-banded armadillo: a decade of experience 1975-1985. *J Leukoc Biol* 40: 645-56.

WHO - World Health Organization 1982. Chemotherapy of Leprosy for Control Programmes. *Report of a WHO Study Group no. 675*: 1-32.

WHO - World Health Organization 1988. Expert Committee on Leprosy. Sixth Report. *WHO Technical Report Series no.768*: 1-50.

WHO - World Health Organization 1991. Multi drug therapy for leprosy 1991. *WHO Bulletin* 69: 263–269.

WHO - World Health Organization 1998. Expert Committee on Leprosy. Seventh Report. *WHO Technical Report Series no. 874*:1-39.

WHO - World Health Organization 2000. Guide to Eliminate Leprosy as a Public Health Problem 14: 5-38.

WHO - World Health Organization 2005. Global leprosy situation 2005. *Wkly Epidemiol Rec* 80: 289–296

WHO - World Health Organization 2009. Enhanced Global Strategy for Further Reducing the Disease Burden due to Leprosy (Plan Period: 2011-2015) 3: 1-28.

WHO - World Health Organization 2010. Global leprosy situation 2010. *Wkly Epidemiol Rec* 85: 337-348.

WHO – World Health Organization 2012. Expert Committee on Leprosy 2012. *Technical Report Serie 968*: 1-72.

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

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

Wolf RH, Gormus BJ, Martin LN, Baskin GB, Walsh GP, Meyers WM, Binford CH 1985. Experimental leprosy in three species of monkeys. *Science* 227: 529-531.

Yamalkar SJ 2009. Leprosy - for medical practioners and paramedical workers. 8a edition. *Novartis Foundation*: 1-143.

Yamamura M, Uyemura K, Deans RJ, Weinberg K, Rea TH, Bloom BR, Modlin RL 1991. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science* 254: 277-9.

Yamamura M, Wang XH, Ohmen JD, Uyemura K, Rea TH, Bloom BR, Modlin RL 1992. Cytokine patterns of immunologically mediated tissue damage. *J Immunol* 149: 1470-1475.

Young DB, Buchanan TM 1983. A serological test for leprosy with a glycolipid specific for *Mycobacterium leprae*. *Science* 221: 1057-1059.

Zhang FR, Huang W, Chen SM, Sun LD, Liu H, Li Y, Cui Y, Yan XX, Yang HT, Yang RD, Chu TS, Zhang C, Zhang L, Han JW, Yu GQ, Quan C, Yu YX, Zhang Z, Shi BQ, Zhang LH, Cheng H, Wang CY, Lin Y, Zheng HF, Fu XA, Zuo XB, Wang Q, Long H, Sun YP, Cheng YL, Tian HQ, Zhou FS, Liu HX, Lu WS, He SM, Du WL, Shen M, Jin QY, Wang Y, Low HQ, Erwin T, Yang NH, Li JY, Zhao X, Jiao YL, Mao LG, Yin G, Jiang ZX, Wang XD, Yu JP, Hu ZH, Gong CH, Liu YQ, Liu RY, Wang DM, Wei D, Liu JX, Cao WK, Cao HZ, Li YP, Yan WG, Wei SY, Wang KJ, Hibberd ML, Yang S, Zhang XJ, Liu JJ 2009. Genomewide association study of leprosy. *N Engl J Med* 361: 2609-2618.

9. ANEXOS

9.1 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE

INSTITUTO LAURO DE SOUZA LIMA

CAIXA POSTAL 3021 – CEP: 17034-971 – BAURU – SP – BRASIL
FONE: 55 14 3103-5852 – 3103-5856
FAX: 55 14 3103-5914 – 3103-5856

COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA

CT.: C.E.P. nº 012/2009

Bauru, 19 de Fevereiro de 2009

Ilmo. Sr. Dr.
Marcos da Cunha Lopes Virmond

Prezado Senhor

O projeto de pesquisa intitulado “Caracterização epidemiológica e clínica e avaliação de estratégias de intervenção em duas áreas endêmicas de hanseníase”, protocolo nº. 172/09, foi apreciado neste Comitê de Ética em Pesquisa, recebeu parecer favorável e foi considerado APROVADO na reunião de 19/02/2009.

Aproveitamos a oportunidade para reiterar nossos protestos do mais elevado apreço.

Atenciosamente



Dra Ida Maria Foschiani Dias Baptista

Vice - Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

Instituto Lauro de Souza Lima

9.2 Artigo

Seroreactivity to new *Mycobacterium leprae* protein antigens in different leprosy-endemic regions in Brazil

Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

doi: 10.1590/S0074-02762012000900017

Running title: Leprosy Serology

Title: Seroreactivity to new *Mycobacterium leprae* protein antigens in different leprosy endemic regions in Brazil.

Author's names:

Emerith Mayra Hungria¹; Regiane Morillas de Oliveira¹; Ana Lúcia Osório Maroclo de Souza¹; Maurício Barcelos Costa¹; Vânia Nieto Brito de Souza²; Eliane Aparecida Silva²; Fátima Regina Vilani Moreno²; Maria Esther Salles Nogueira²; Maria Renata Sales Nogueira Costa²; Sônia Maria Usó Ruiz Silva²; Samira Bühner-Sékula¹; Steven G. Reed³; Malcolm S. Duthie³ and Mariane Martins de Araújo Stefani¹.

Institutional affiliations: ¹ Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás. Rua 235 esquina com 1a Avenida, Setor Universitário, sala 335, Goiânia, GO, 74605050, Brasil. email: mstefani@iptsp.ufg.br

² Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, SP, Brasil

³ Infectious Disease Research Institute, IDRI, Seattle, WA, USA.

Key words: Leprosy, diagnosis, serology

Sponsorships: DECIT/ CNPq, Heiser Foundation for TB and Leprosy, NY, USA.

Summary

New *Mycobacterium leprae* protein antigens can contribute to improved serologic tests for leprosy diagnosis/classification and multidrug-therapy/MDT monitoring. This study describes seroreactivity to *M. leprae* proteins among participants from three highly endemic leprosy areas in Brazil: central-western- Goiânia/Goiás (n=225), Rondonópolis/Mato Grosso (n=764); northern- Prata Village/Pará (n=93). ELISA tests were performed to detect IgG to proteins (92f, 46f, LID-1, ML0405, ML1213) and IgM to phenolic-glycolip-I (PGL-I). Multibacillary leprosy-MB had similar positivity rates to PGL-I versus proteins, however some anti PGL-I negatives had antibodies to proteins suggesting that adding protein antigen to PGL-I can enhance sensitivity to MB leprosy. In Mato Grosso, different degrees of seroreactivity were observed ranking from MB, former patients after MDT, paucibacillary leprosy-PB, household contacts-HHC and endemic control-EC groups. Seroreactivity of PB patients was low in Goiás and Mato Grosso. HHC from different endemic sites had similar IgG antibody responses to proteins. Both 46f, 92f were not recognized by most tuberculosis patients, EC and HHC within Goiás, an area of high BCG vaccination coverage. Low positivity in EC and HHC was observed in Pará and Mato Grosso. Our results provide evidence for the development of an improved serologic test that could be widely applicable for MB leprosy in Brazil.

Introduction

In field conditions the diagnosis and classification of leprosy is based on clinical manifestations of the disease and up to now specific and sensitive tests to detect *Mycobacterium leprae* infection are not commercially available. The development of diagnostic tests for leprosy needs to take into account the wide spectrum of clinical manifestations for which there is an inverse correlation between the bacterial index (BI) and the cell-mediated immunity (CMI). The leprosy spectrum comprises multibacillary patients (MB) (lepromatous-LL and borderline lepromatous-BL) who develop strong humoral responses, but weak CMI to *M. leprae*. At the other pole, PB patients (tuberculoid- TT and borderline tuberculoid-BT) develop robust CMI but weak or no humoral immunity to *M. leprae* (reviewed in Scollard et al. 2006). Between these polar forms, immunologically unstable patients, with less effective CMI, develop borderline leprosy forms (borderline tuberculoid-BT, borderline-borderline-BB or borderline lepromatous-BL). In leprosy endemic countries, household contacts of MB patients (HHC) are at increased risk of developing leprosy and can present both CMI and humoral response indicating either protective immunity or priming of the immune system by repeated exposure to leprosy bacilli (Bühner-Sékula et al. 2003; Fine et al. 1997; Sampaio et al. 2011). Therefore based on the diverse immunological profiles observed within leprosy spectrum, and among exposed contacts, a combination of serologic tests with assays based on CMI responses against *M. leprae* antigens will likely be required for the detection of most forms of leprosy (Stefani 2008).

The thirty years of implementation of multidrug therapy (MDT) for leprosy led to a significant decline in prevalence but incidence is now stable and at high levels in many countries, indicating that active transmission is still going on (WHO WER 2011). In Brazil, great achievements in public health assistance and economic development have

taken place in recent years (Barreto et al. 2011). However, leprosy remains an important public health problem with 34.894 new cases reported in 2010 (WHO WER 2011). Brazil presents significant levels of inequality and regional differences in leprosy detection with the highest rates being reported in the northern and central-western regions (39.98 and 33.92 per 100.000 population respectively) (Ministério da Saúde 2011). For treatment decisions a simplified classification system based on the number of skin lesions was proposed: PB present less than 6 skin lesions and MB present 6 or more skin lesions. Different MDT regimens are used to treat PB and MB leprosy (WHO 1991) therefore any laboratory test that could aid the differentiation/classification of PB and MB patients may have an important impact for patients' management by public health.

The best evaluated serologic test for leprosy is based on the detection of IgM antibodies to the phenolic glycolipid I (PGL-I), a membrane component exclusive to *M. leprae* (Bührer-Sékula et al. 1998). Several studies have shown that anti PGL-I positivity reflects the bacillary load: most MB patients are seropositive while the majority of PB patients are seronegative (Young et al. 1983; Bührer-Sékula et al. 2003). Although of limited application for the diagnosis of all leprosy clinical forms, anti PGL-I serology has been suggested as an important adjunct tool for the differentiation of PB and MB leprosy (Bührer-Sékula et al. 2000; Bührer-Sékula et al. 2007). More recently, in the post genomic era, data regarding the seroreactivity to novel *M. leprae* protein antigens have been generated in various populations worldwide. Similar to anti PGL-I serology, the presence of IgG antibodies to protein antigens reflects the leprosy spectrum and the bacillary load: most MB patients have high IgG titers but few PB patients are responsive (Spencer et al. 2005; Geluk & Ottenhoff 2006; Reece et al. 2006; Araoz et al. 2006a; Araoz et al. 2006b; Duthie et al. 2007; Geluk et al. 2009; Duthie et al. 2010; Geluk et al. 2010). A significant decay in specific antibody responses occurs after MDT suggesting

that serology may be useful to monitor MDT (Silva et al. 2007; Duthie et al. 2011). Despite abundant new information, the serologic reactivity to other novel *M. leprae* antigens, including new fusion proteins remains to be shown (Duthie et al. 2008a; Duthie et al. 2010). Either in combination with or exclusive from PGL-I, these new protein antigens represent candidates for the development of improved serologic tests with enhanced specificity and sensitivity for leprosy diagnosis/classification and MDT monitoring.

A sensitive, specific, simple and robust diagnostic test that could be widely used in the field in leprosy endemic regions irrespective of the ethnic/genetic background of the population would be the ideal solution. However, distinct HLA alleles which are differently distributed among populations can interfere with the immunological reactivity to these proteins and this represents a potential limitation for the widespread implementation of such tests (Geluk et al. 2009). In this regard, this study describes the serologic evaluation of two new *M. leprae* fusion antigens and extends testing of four *M. leprae* recombinant antigens to large panels of leprosy patients and controls with diverse ethnic backgrounds recruited in highly endemic regions for leprosy in Brazil.

Material and Methods

Study area demographics

This study included a total of 1.072 participants recruited in three different leprosy endemic settings in Brazil: Goiânia/Goiás, Rondonópolis/Mato Grosso and Prata Village/Pará (Figure 1). These three settings have different human development index (HDI) which results from a combination of life expectancy at birth, mean years of schooling and gross national income per capita, considering that the highest HDI score worldwide is 1.0.

Main features of recruitment sites are: 1. Goiânia city (1.256.514 inhabitants; HDI=0.832) located in Goiás State, central-western Brazil (IBGE 2010); 2. Rondonópolis city (195.476 inhabitants; HDI=0.791) located in Mato Grosso State, central-western Brazil, considered a hyperendemic area for leprosy (MS 2009); 3. “Vila do Santo Antônio do Prata/ “Prata Village” (population around 2.000 inhabitants) located in Igarapé-Açu municipality (35.843 inhabitants; HDI=0.67) in Pará State/Amazonian basin, northern Brazil (IBGE 2010).

Rondonópolis is one of the eleven municipalities prioritized for leprosy control due to the increase both in newly diagnosed individuals younger than 15 years ($\geq 10/100.000$ inhabitants in 2009) and in grade 2 disability at diagnosis (MS 2009). “Vila de Santo Antônio do Prata/ Prata Village” is a former leprosy colony created in 1920 and although compulsory isolation ended in 1962, this population has remained isolated. This site is one of several “hot pockets” of leprosy within Pará State, where a preliminary assessment indicated 12.82% leprosy prevalence (Lázaro et al. 2011). Leprosy is known to be related to social and material inequalities (Kerr-Pontes et al. 2004) and the Prata Village (lowest HDI among the study sites) presented the highest leprosy prevalence among the three settings tested.

Brazil has a multi-racial population comprising a confluence of descendants of native Indians, Portuguese colonizers and West African slaves, and more recently, additional European, Arab and Japanese immigrants. The population in Goiás State is composed mainly of persons that declare themselves as white or mixed white and black. In contrast, mixed white and black individuals are the main group (>70%) in Pará State and black Afro descendants from slaves represent a substantial component of its population (IBGE 2010). Pará and Mato Grosso are also among the states with the highest concentration of native Brazilian Indians, with around 30.000 Indian individuals from more than 30 different ethnicities in Pará State.

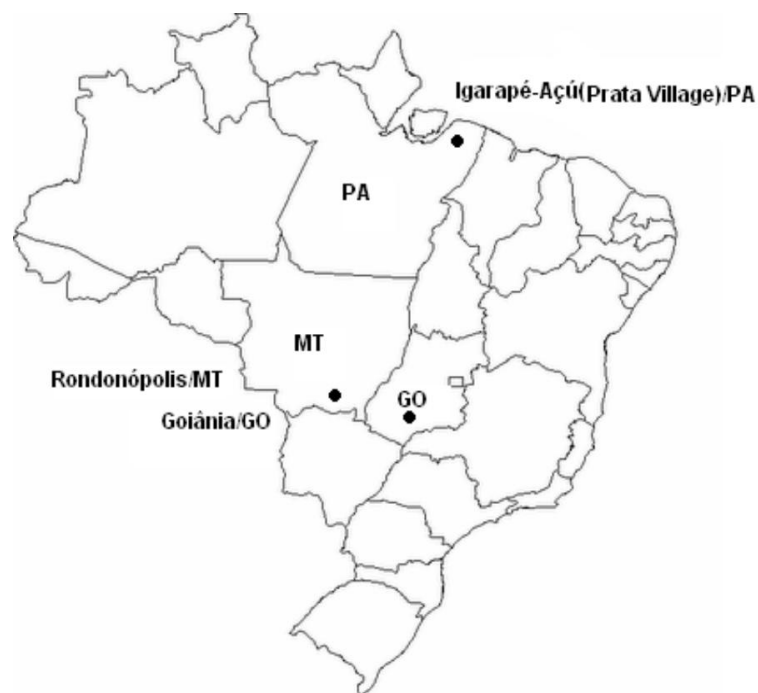


Figure 1: Geographical localization of the three Brazilian leprosy endemic study areas: Igarapé-Açu/ Prata Village/PA, northern region, Rondonópolis/MT and Goiânia/GO in central-western region.

Study groups

In this study all newly diagnosed leprosy patients were classified according to Ridley and Jopling criteria considering clinical, bacilloscopic and histopathology data. All participants signed an informed consent before blood collection, sera samples were stored at -20°C and sent to IPTSP/UFG where all serological tests were performed. In each site participants from both sexes and of any age range were included. Serum samples were collected from 2006 to 2010.

Participants from Goiás State were recruited at the main outpatient clinic (Centro de Referência em Diagnóstico e Terapêutica, Goiânia/GO) and included the following study groups: A. Newly diagnosed untreated leprosy patients (PB, n=45; MB, n=45); B. Healthy household contacts of MB leprosy patients (HHC, n=45) defined as healthy individuals who have shared the same house as the index case for at least 6 months; C. Healthy endemic controls (EC, n=45) who had no previous tuberculosis diagnosis or known contact with leprosy patients; D. Pulmonary tuberculosis (TB) patients with confirmed bacillioscopy, seronegative for HIV-1/2 and under specific therapy for at least 3 months (TB, n = 45).

Study groups from Rondonópolis/MT included: A. Newly diagnosed untreated leprosy patients (n=151; 58 MB/ 93 PB) recruited at “Centro de Dermatologia Jardim Guanabara”; B. Healthy household contacts of MB leprosy patients (HHC, n=192); C. Healthy endemic controls (EC, n=282); D. Individuals previously diagnosed with MB leprosy that completed MDT from 1990 to 2006 (Post MDT, n=139).

Study groups from Prata Village were: A. Healthy household contacts of MB leprosy patients (HHC, n=36); B. Previously diagnosed MB leprosy patients that completed MDT between 1990 and 2006 (Post MDT, n=47).

Detection of antibodies to *M. leprae* antigens

Serum IgG antibodies to *M. leprae* protein antigens were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The seroreactivity of the di-fusion protein LID-1 and the recombinant ML0405 protein, both previously described by our group as immunogenic and capable of inducing specific responses among leprosy patients (Reece et al. 2006; Duthie et al. 2007), as well as the seroreactivity of two novel *M. leprae* fusion proteins (46f, a di-fusion of the ML0568 and ML0405 proteins and 92f, a tri-fusion of the ML2028, ML2346 and ML1862 proteins) was evaluated. The previously described, non-immunogenic ML1213 recombinant protein was used as a negative control (Reece et al. 2006). In brief, polysorp 96-well plates (Corning Costar, NY, USA) were coated with 2 µg/ml of each individual recombinant protein at 4°C and blocked with PBS/Tween-20 with 1% BSA. Serum samples diluted 1/200 in 0.1% BSA were added in duplicates and incubated for 2 hours at RT. Plates were washed and incubated with HRP-conjugated with anti-human IgG (Southern Biotech, Birmingham, AL). After washings, reactions were developed with peroxidase color substrate (KPL, Gaithersburg, MD, USA) and quenched by the addition of 1N H₂SO₄. The corrected optical density (OD) of each well at 450 nm was read using a Multiskan Ex microplate reader (Thermo Scientific, USA). Based on previous data, the threshold for positive responses was calculated as 2 x standard deviation (SD) of the OD of sera from healthy endemic controls, such that samples with OD > 0,3 were considered positive (Duthie et al. 2007). The specificity of the response was defined by low (<10%) recognition by sera from TB patients and EC. Results are expressed as the mean OD of duplicates.

Serum IgM antibodies to *M. leprae* phenolic glycolipid (PGL-I) were similarly detected by ELISA. Polysorp 96-well plates (Nunc, Roskild, Denmark) were coated with 0.01µg/ml NT-P-BSA, the trisaccharide synthetic analog of PGL-I conjugated to BSA

(kindly provided by Dr Fujiwara, Nara University, Japan), and blocked with PBS-1% BSA. Serum samples diluted 1/300 in 1% BSA were tested in duplicates either with NT-P-BSA or BSA-coated wells. After incubation and washings, HRP-conjugated to anti-human IgM (Immuno Chemicals, St. Louis, Missouri, USA) was added. After incubation and washings, peroxidase color substrate (KPL, Gaithersburg, MD, USA) was added and the reaction was quenched by the addition of 2.5N H₂SO₄. The OD was read at 450 nm using a Multiskan Ex microplate reader (Thermo Scientific, USA).

Statistical analyses

GraphPad Prism (version 5) and MS Excel (2007) were used for the calculation of the median, mean values of OD and for dot blot graphics. Statistical significance was assessed by Kruskal-Wallis one way analysis of variance for comparison of multiple groups and by Mann-Whitney for comparison between two groups. Results were considered statistically significant when *p*-values < 0.05 were obtained.

Ethical Issues

This study was approved by the following boards: “Comitê de Ética em Pesquisa Humana e Animal do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás” (protocol #4862), “Comissão Nacional de Ética Pesquisa/ CONEP/Brazil” (protocol #12962) and the Ethics Committee from “Instituto Lauro de Souza Lima” (protocol #172/09). For participants below 18 years of age, the informed consent form was either signed by one of the parents or by the legal guardian.

Results

Seroreactivity to novel *M. leprae* fusion proteins

Serologic reactivity to the novel *M. leprae* fusion proteins 46f and 92f was assessed among 225 participants from Goiânia/Goiás State, across five groups (MB, PB,

HHC, EC and TB, 45 individuals per group; Figures 2A and 2B). MB patients comprised 16 LL, 9 BL and 20 BB forms (median BI= 4), with a median age of 52 years and a majority of males. PB patients consisted of 16 TT and 29 BT patients, with a median age of 41 years and a majority of females. In the HHC and EC groups the median ages were 35 and 27 years, respectively, and similar proportions of males and females were included. Among TB patients, the median age was 36 years and most were male. Coverage with BCG vaccination is high in Goiânia/GO and this was reflected in each study group. BCG scars were detected in 84.4% (38/45) TB patients, 89% PB leprosy (40/45), 80% (36/45) MB leprosy, 100% HHC and 97.8% (44/45) EC.

Regarding 46f antigen (Figure 2A), most MB leprosy patients (86.6%, 39/45) had detectable IgG antibodies (median OD= 1.33 ranging from 0.17 to 2.31) and 33.3% (15/45) of PB leprosy were seroreactive (median OD= 0.23 range 0.16-0.73). Serological recognition by HHC, EC and TB was low, ranging from 3% in EC (median OD=0.14) to 5% in HHC (median OD=0.24), 4% TB (median OD=0.29).

The serologic reactivity to 92f (Figure 2B) was statistically different among MB, PB, TB, EC, HHC ($p<0.0001$). Most MB leprosy patients were seroreactive (64.4%, 29/45), (median OD= 0.36, range 0.13-1.75) and 22.2% (10/45) of PB patients were positive (median OD=0.18, range 0.11-0.78). Unlike the 46f proteins which demonstrated an even distribution of responses, the 92f fusion demonstrated a clear division into positive and negative responses in the MB group. Recognition by HHC, TB and EC ranged from 4-8% however at low median ODs: HHC=0.17, TB=0.17 and EC=0.16.

In these groups, positivity to anti PGL-I serology was 84% for MB leprosy (38/45, OD range 0.08-2.76) and 9% for PB leprosy (4/45, OD range 0-0.95). Antibodies to PGL-I were detected in 4% TB patients (2/45, OD range 0-0.30), in 2% EC (1/45, OD range 0.02-0.31) and 7% HHC (3/45, OD range 0-0.53) (Figure 2C).

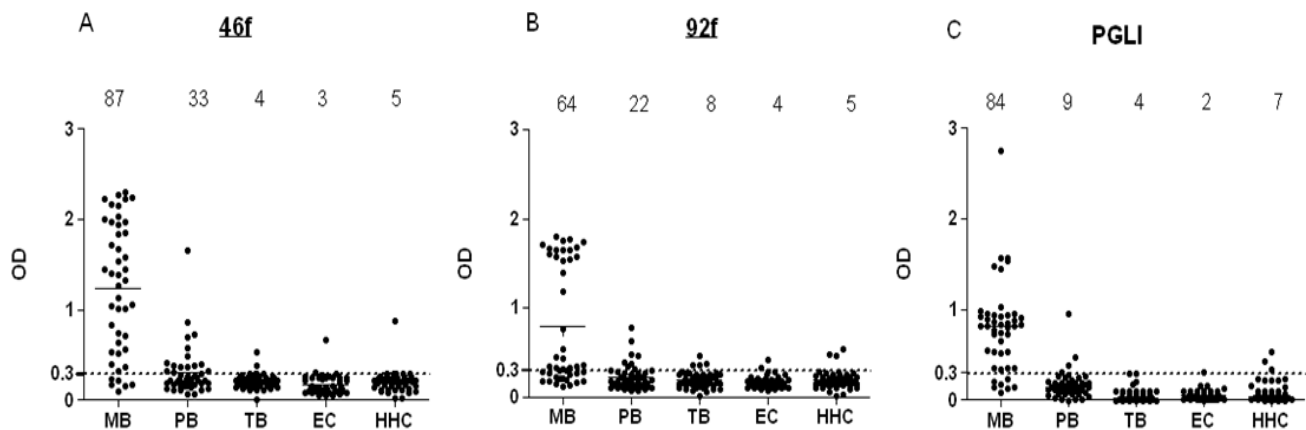


Figure 2: Antibody responses in Goiânia. Serologic reactivity to: A. 46f protein; B. 92f protein; C. PGL I. Newly diagnosed untreated multibacillary (MB) and paucibacillary leprosy patients (PB), tuberculosis patients (TB), endemic controls (EC) and house hold contacts of MB patients (HHC) from Goiânia/Goiás, central western Brazil. IgG antibodies to *M. leprae* protein antigens (92f, 46f) and IgM antibodies to PGL-I were detected by ELISA tests. OD=optical density. Each point represents the mean OD of duplicates of an individual serum sample and the median OD value of each group is represented by the horizontal line. The traced horizontal line is the cut off (OD>0.3). The number above each data set is the percent positive responses.

Expanded serologic testing to *M leprae* proteins: Rondonópolis/MT

To expand both the number and geographic distribution of participants analyzed, we tested sera from 764 individuals recruited in Rondonópolis/MT, one of the eleven municipalities prioritized for leprosy control (MS 2009). In Rondonópolis/MT, most MB and PB leprosy patients were males and were older than HHC and EC. Post MDT

participants had a median age of 53 years. ML0405, LID-1 and 46f were recognized by over 80% of the MB patients (Figure 3). The highest positivity was observed against LID-1 protein (89%, Figure 3A). The median OD for LID-1 was 1.60, for ML0405 was 1.81 and for 46f was 1.26 ($p < 0.0001$ versus EC). In this MB group, the rate of positivity to 92f was lower compared to the other proteins assessed (59%) (median OD= 0.43, range 0.05-2.66). Most MB patients from Rondonópolis (83%, 48/58) were also positive for anti-PGL-I serology (median OD=0.74, range 0.03-1.55).

Low levels of both IgG antibodies to *M. leprae* proteins and IgM antibodies to PGL-I were observed among the 93 PB patient sera from Rondonópolis/MT (Figure 3C). Regarding seropositivity to protein antigens, 7-16% of PB patients were responsive, with the highest positivity rate detected to 92f protein (16%, 15/93, median OD= 0.13, range 0.01-0.98). The positivity to PGL-I among PB patients was 8% (7/93, median OD=0.03, range 0.01-0.51). Table 1 summarizes positivity rates in ELISA tests and OD details for LID-1 fusion protein and PGL-I antigen among untreated MB and PB leprosy patients from Rondonópolis.

Table 1: Positive responses to LID-1 and PGL-I antigens among multibacillary and paucibacillary leprosy patients from Rondonópolis/MT, Brazil.

	% Positivity	MB	PB
LID-1		89%	7%
median OD (range)		1.6 (0.03- 3.0)	0.11 (0.01-0.8)
PGL-I		83%	8%
median OD (range)		0.74 (0.03-1.55)	0.03 (0.01-0.51)

The positivity rate for all antigens was low among HHC and EC. For HHC, positivity to different *M. leprae* proteins ranged from 4% to 7%, with the highest positivity to 92f protein while 3% were anti PGL-I positive. EC had higher positivity rate for anti-PGL-I (9%) than to *M. leprae* proteins (around 3%) (Figures 3D and 3E).

In agreement with previous observations indicating that antigen-specific responses wane upon treatment (Duthie et al. 2011), the seroreactivity of previously diagnosed MB leprosy that completed MDT 4 to 20 years prior to testing (n=139) was lower than observed among unmatched, untreated MB patients with reactivity ranging from 17% to 45% (Figure 3B). In the post MDT group, the median ODs to protein antigens were also lower than those observed for untreated MB leprosy patients: 0.25 for LID-1, 0.20 to ML0405, 0.28 to 46f and 0.24 to 92f. Around 14% individuals post MDT were anti-PGL-I positive (median OD= 0.03). In order to check the effect of time post MDT in the decline of antibody levels to protein antigens among previously diagnosed MB leprosy from Rondonopolis, participants were stratified according to the number of years post-treatment: 4-5 years n=27; 6-10 years n=70; 11-15 years n=38 and 16-20 n=4. No

correlation was observed between the number of years post-treatment and seroreactivity to proteins tested (Kruskal Wallis $p>0.05$, data not shown).

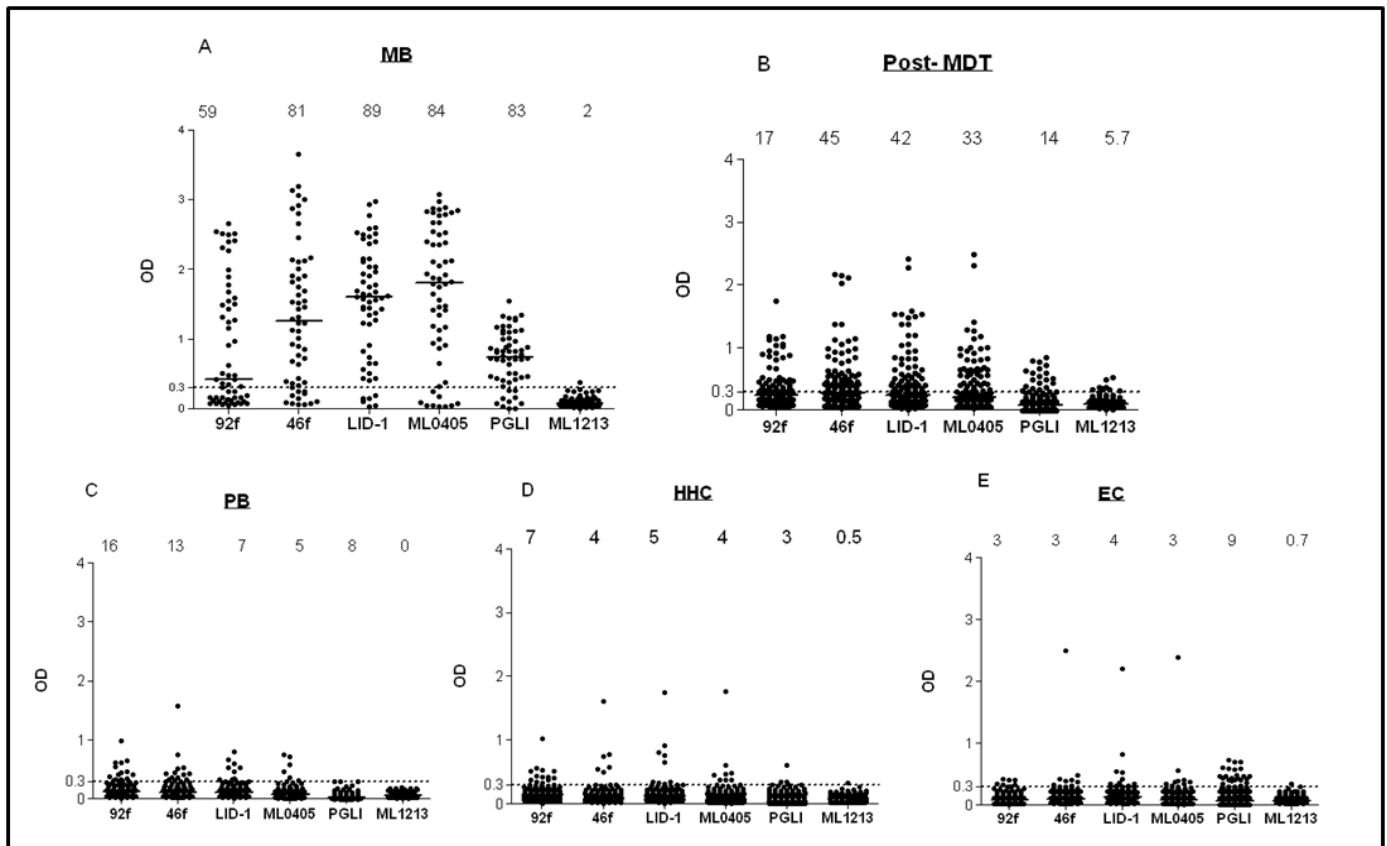


Figure 3: Serologic reactivity to *M. leprae* protein antigens- 92f, 46f, LID-1, ML0405 PGL-I and ML1213 among participants from Rondonópolis/MT: A. Newly diagnosed untreated multibacillary leprosy patients (MB, n=58); B. Post MDT (n=139) individuals previously diagnosed as MB leprosy that received MDT in the past; C. Newly diagnosed untreated paucibacillary (PB, n=93); D. House hold contacts of MB patients (HHC, n=192); E. Endemic controls (EC, n=282). IgG antibodies to *M. leprae* protein antigens and IgM antibodies to PGL-I were detected by ELISA. Each point represents the mean optical density (OD) of duplicates of each individual serum sample. The median OD value of each group is represented by the horizontal line and the traced line represents the cut off (OD>0.3). The number above each data set is the percent positive responses.

Serologic reactivity among participants from “Prata Village/PA”.

Seroreactivity of 83 participants from Prata Village/PA, a former leprosy colony that remains a leprosy “hot pocket” (Lázaro et al. 2011), was assessed. Post MDT individuals were older than HHC (median age of 46 and 23 years, respectively) and both groups included similar numbers of males and females. The positivity rate in individuals from Prata Village that had leprosy and had completed MDT (n=47) in the past (4 to 20 years ago) ranged from 33% to 50% (35% to LID-1, 50% to 46f, 33% to ML0405 and 50% to 92f) (Figure 4A). In this post MDT group, 8% were positive for anti PGL-I serology. While 11% HHC were anti PGL-I positive, a low (3-8%) to absent response to *M. leprae* proteins was observed in this group (Figure 4B).

The effect of time post MDT in the seroreactivity to protein antigens in individuals previously diagnosed as MB leprosy from Prata was assessed by the stratification according to the number of years post-treatment: 4-5 years n=5; 6-10 years n=32; 11-20 n=10. No correlation was observed between the number of years post-treatment and antibody levels to proteins (Kruskal Wallis $p>0.05$, data not shown).

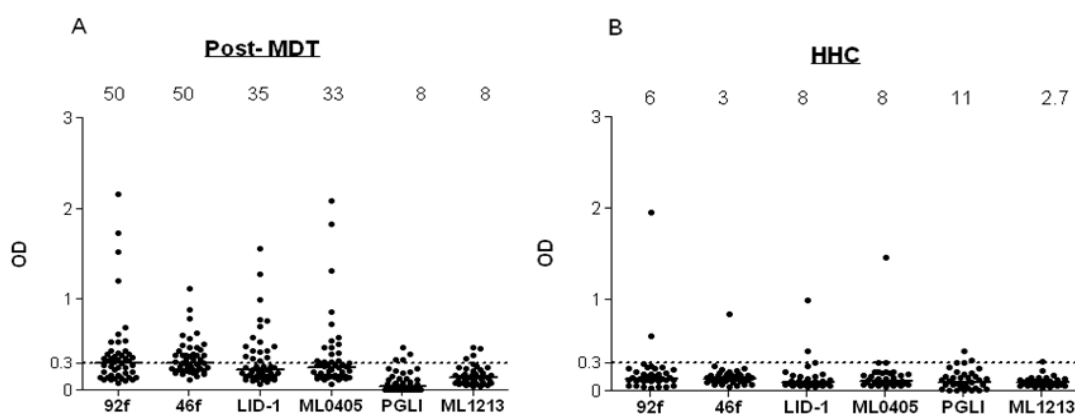


Figure 4: Serologic reactivity to *M. leprae* protein antigens- 92f, 46f, LID-1, ML0405, PGL-I and ML1213 among participants from Prata/PA. A. Post MDT (n=47) individuals previously diagnosed as MB leprosy that received MDT in the past; B. Household contacts of MB patients (HHC, n=36). IgG antibodies to *M. leprae* protein antigens and IgM antibodies to PGL-I were

detected by ELISA. Each point represents the mean optical density (OD) of duplicates of each individual serum sample. The median OD value of each group is represented by the horizontal line and the traced line represents the cut off (OD>0.3). The number above each data set is the percent positive responses.

Discussion

The results from this study demonstrate that the evaluation of the serologic reactivity to new *M. leprae* antigens among distinct populations from a highly endemic country with a multi racial population is a robust strategy to identify potential antigen targets for the development of new serologic tests for leprosy. More recently several *M. leprae* protein antigens that are recognized by antibodies of leprosy patients have been described (Spencer et al. 2005; Geluk & Ottenhoff 2006; Reece et al. 2006; Araoz et al. 2006a; Araoz et al. 2006b; Duthie et al. 2007; Geluk et al. 2009; Duthie et al. 2010; Geluk et al. 2010). However, the screening phase is not concluded yet since the generation of new fusion protein antigens, expands the possibilities of new antigens to be tested. Our group has described in specific populations new protein antigens, including fusion proteins, suitable for the development of improved serologic tests for leprosy. The cell mediated immune responses to 46f and 92f *M. leprae* fusion proteins tested in this study were previously described (Duthie et al. 2008b; Sampaio et al. 2011). In the current study we describe the humoral responses to 46f and 92f *M. leprae* fusion proteins. Moreover their serologic reactivity was validated in an expanded population with distinct ethnic backgrounds recruited in two highly endemic regions in Brazil. Our results are encouraging as they provide evidence for the development of an improved serologic test that could be widely applicable for leprosy in Brazil.

Our results indicate that adding a protein antigen to PGL-I in the composition of a serologic test can enhance sensitivity of a serologic test to MB leprosy. Although

among MB leprosy very similar rates of positivity were detected to PGL-I versus LID-1, ML0405 and 46f proteins, some MB leprosy patients with negative anti PGL-I serology had antibodies that recognized *M. leprae* proteins. Five out of 10 MB leprosy patients seronegative to anti PGL-I (OD range 0- 0.26) were responsive to LID-1, and 4 of these patients had antibodies to ML0405, 46f and 92f. Thus, in theory, the positivity rate in MB leprosy could increase from 83% to 91% by a combination of the LID-1 antigen and PGL-I.

In this survey when different study groups from one endemic site were screened (e.g., Rondonópolis, Figures 3A-E) quite different degrees of seroreactivity were observed. MB patients were the most responsive followed by post MDT, PB, HHC and EC groups. In MB and PB leprosy patients this ranking of serologic response likely reflects the bacillary load. Among uninfected controls this probably reflects the higher level of exposure in contacts than in healthy endemic controls.

A previous study among Brazilian individuals followed for five months during MDT (Duthie et al. 2011) showed a more pronounced decline in the antibody titers to proteins than to PGL-I. In our study, the median ODs for PGL-I among post-MDT groups from Rondonópolis and Prata were lower resulting in lower positivity levels compared to LID-1 (14% PGL-I vs 42% LID-1 in Rondonópolis; 8% PGL-I vs 35% LID-1 in Prata), suggesting that anti PGL-I antibodies declined more over time. However, the median OD for LID-1 among MB patients was almost twice as high as the median OD for PGL-I (1.6 vs 0.74), and the positivity for PGL-I in this group was lower than to LID-1 (83% vs 89%) which might account for the much lower percentage of PGL-I positivity among post-MDT individuals. Moreover, discrepancies observed in the decline of antibody levels in these two studies could be attributed to the use of different PGL-I antigens (NDO-BSA vs NT-P-BSA), differences in ELISA assays

including cut off points and differences in the study populations tested in the two studies.

This previous study (Duthie et al. 2011) also showed in a Venezuelan post-MDT group uniformly low responses to LID-1 and ML0405 protein antigens and in a few individuals the high serological response post MDT was associated with irregular or shorter treatment. Compared to this previous study, we have found relatively higher seropositivity levels after treatment. In our study the number of years post-treatment did not negatively correlate with seropositivity levels and we do not have enough background to infer incorrect treatment nor relapse among seropositive post MDT individuals. Since our study was not designed to evaluate the effect of time upon antibody responses, analyses of individuals against an entire group, where the magnitude of response is variable, could be misleading and could not be appropriate for determining outcome. In order to analyse the effect of time on the decay of antibody levels post MDT, individual patient serological responses need to be monitored at different time points during and after MDT.

Potential cross-reactivity is an important consideration when new antigens are screened for diagnostic purposes, particularly for countries with high incidence of TB, high BCG vaccination coverage and high levels of exposure to nonpathogenic environmental mycobacteria (Geluk et al. 2005; Araoz et al. 2006b). To avoid this, several investigators have focused on the selection and evaluation of *M. leprae* antigens based on the lack of sequence homology with proteins from other mycobacteria. Using this method, antigens that have no homologue in *Mycobacterium tuberculosis* or other known mycobacteria have been selected for further analysis as diagnostic candidates for leprosy (Geluk et al. 2005, Spencer et al. 2011). Several groups, including our own, have, however, demonstrated that *in silico* predictions of sequence homology with other

mycobacteria does not clearly predict cross-reactivity in field conditions (Geluk et al. 2005; Sampaio et al. 2011). Despite possessing homology with proteins from other mycobacterial species, the new *M. leprae* fusion proteins described here were not recognized by the great majority of EC, TB and HHC within Goiás State, an area of high BCG vaccination coverage. Low rates of responses among EC and HHC were also observed in different areas of endemicity for leprosy in Pará and Mato Grosso. At this point we cannot exclude the possibility that the few positive responses among EC and TB could be due to either cross-reactivity with environmental mycobacterial antigens or coinfection with *M. leprae*.

Another important issue to consider in the screening of genes or protein/peptide antigens for wide diagnostic purposes is the presence of amino acid motifs predicting high-affinity binding to multiple HLA class II molecules. This would increase the chances of antigen recognition by T cells from different immunogenetic backgrounds facilitating antibody production. Screening studies of immunoreactivity to new *M. leprae* protein antigens have tested patients and controls with different immunogenetic backgrounds from Brazil (Goiás, Bahia and Minas Gerais, Rio de Janeiro States), Philippines, Korea, Mali, Bangladesh (Araoz et al. 2006a; Araoz et al. 2006b; Duthie et al. 2007; Geluk et al. 2009; Duthie et al. 2010; Geluk et al. 2010, Duthie et al. 2011). The widespread screening of *M. leprae* proteins and peptides to identify sequences that are immunogenic in the context of multiple HLA alleles can indicate antigens suitable for a diagnostic test that would have the greatest utility in different geographical regions. Further analyses of patients with different backgrounds, such as HLA typing, could provide additional insight into the impact of ethnic background for seroreactivity to different antigens.

One important issue about the detection of IgG antibodies to *M. leprae* proteins

refers to their possible capacity to detect early infection. It is well known that untreated MB patients can shed and spread viable bacteria by the airways and HHC are recognized to have a higher risk of developing clinical leprosy than contacts of PB patients (Fine et al. 1997). A specific and sensitive serologic test that could indicate asymptomatic infection would have a positive impact for public health reducing both transmission sources by prompt treatment and physical disabilities due to late diagnosis. Positive anti PGL-I serology among MB patients and HHC has been described as a risk factor for leprosy, however this does not always correlate with leprosy development (Bührer-Sékula et al. 2003; Cho et al. 2001; Oskam & Bührer-Sékula, 2003). We observed similar IgG positivity among HHC from Mato Grosso, Goiás and Pará . These results again suggest that a combination of antigens to detect leprosy specific responses could be best suited to identify asymptomatic infection and predict disease progression.

The results of our study, together with data from other groups, indicate that newly identified *M. leprae* antigens may contribute to the development of a serologic test with an improved ability to identify *M. leprae* infection. In this regard, the development of rapid protein-based serological tests to detect specific IgG should complement the PGL-I test that detects IgM antibodies and could be used in non-specialized settings as a point of care test in field conditions. Finally, the discovery of *M. leprae* protein antigens that can be recognized across different ethnic backgrounds within a highly endemic setting demonstrates that new laboratory tools are being described that could contribute to leprosy control programs.

Acknowledgements

The authors thank Greg Ireton, Jeff Guderian, Raodoh Mohamath and Ayesha Misquith (IDRI, USA) for the production of high quality recombinant proteins. We are also thankful to Dr. Tsuyoshi Fujiwara (Nara University, Japan) for generously providing the NT-P-BSA antigen. Hungria EM and Oliveira RM were supported by scholarships from the National Council for Technological and Scientific Development/CNPq and from the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel/CAPES respectively (Brazil); Stefani MMA is a recipient of a fellowship from CNPq (grant # 310582/2011-3). We are grateful to the patients and staff of the “Centro de Referência em Diagnóstico e Terapêutica” in Goiânia/GO for their cooperation and support during recruitment.

References

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 2006a. Towards an immunodiagnostic test for leprosy. *Microbes Infect* 8: 2270-2276.

Araoz R, Honore N, Cho S, Kim JP, Cho SN, Monot M, Demangel C, Brennan PJ, Cole ST 2006b. Antigen discovery: a postgenomic approach to leprosy diagnosis. *Infect Immun* 74: 175-182.

Barreto ML, Teixeira MG, Bastos FI, Ximenes RAA, Barata RB, Rodrigues LC 2011. Successes and failures in the control of infectious diseases in Brazil: social and environmental context, policies, interventions, and research needs. *Lancet* 377: 1877-1889.

Bührer-Sékula S, Hamerlinck FF, Out TA, Bordewijk LG, Klatser PR 2000. Simple dipstick assay for semi-quantitative detection of neopterin in sera. *J Immunol Methods* 238: 55-58.

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

Bührer-Sékula S, Smits HL, Gussenhoven GC, van Leeuwen J, Amador S, Fujiwara T, Klatser PR, Oskam L 2003. Simple and fast lateral flow test for classification of leprosy patients and identification of contacts with high risk of developing leprosy. *J Clin Microbiol* 41: 1991-1995.

Bührer-Sékula S, Visschedijk J, Grossi MA, Dhakal KP, Namadi AU, Klatser PR, Oskam L 2007. The ML flow test as a point of care test for leprosy control programmes: potential effects on classification of leprosy patients. *Lepr Rev* 78: 70-79.

Cho SN, Cellona RV, Villahermosa LG, Farjado TT, Balagon MVF, Abalos RM, Tan EV, Walsh GP, Kim JD, Brennan PJ 2001. Detection of phenolic glycolipid I of *Mycobacterium leprae* in sera from leprosy patients before and after start of multidrug therapy. *Clin Diagn Lab Immunol* 8:138–142.

Duthie MS, Goto W, Ireton GC, Reece ST, Cardoso LP, Martelli CM, Stefani MM, Nakatani M, de Jesus RC, Netto EM, Balagon MV, Tan EV, Gelber RH, Maeda Y, Makino M, Hoft D, Reed SG 2007. Use of protein antigens for early serological diagnosis of leprosy. *Clin Vaccine Immunol* 14: 1400-1408.

Duthie MS, Hay MN, Morales CZ, Carter L, Mohamath R, Ito L, Oyafuso LK, Manini MI, Balagon MV, Tan EV, Saunderson PR, Reed SG, Carter D 2010. Rational design and evaluation of a multiepitope chimeric fusion protein with the potential for leprosy diagnosis. *Clin Vaccine Immunol* 17: 298-303.

Duthie MS, Ireton GC, Kanaujia GV, Goto W, Liang H, Bhatia A, Busceti JM, Macdonald M, Neupane KD, Ranjit C, Sapkota BR, Balagon M, Esfandiari J, Carter D, Reed SG 2008a. Selection of antigens and development of prototype tests for point-of-care leprosy diagnosis. *Clin Vaccine Immunol* 15: 1590-1597.

Duthie MS, Goto W, Ireton GC, Reece ST, Sampaio LHS, Grassi AB, Sousa ALM, Martelli CMT, Stefani MMA, Reed EG 2008b. Antigen-specific T-cell responses of leprosy patients. *Clin Vaccine Immunol* 15: 1659- 1665.

Duthie MS, Hay MN, Rada EM, Convit J, Ito L, Oyafuso LKM, Manini MIP, Goulart IMB, Lobato J, Goulart LR, Carter D, Reed SG 2011. Specific IgG antibody responses may be used to monitor leprosy treatment efficacy and as recurrence prognostic markers. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 10: 1257-1265.

Fine PE, Sterne JA, Ponnighaus JM, Bliss L, Sauj J, Chihana A, Munthali M, Warndorff DK 1997. Household and dwelling contact as risk factors for leprosy in northern Malawi. *Am J Epidemiol* 146: 91–102.

Geluk A, Ottenhoff TH 2006. HLA and leprosy in the pre and postgenomic eras. *Hum Immunol* 67: 439-445.

Geluk A, Spencer JS, Bobosha K, Pessolani MC, Pereira GM, Banu S, Honore N, Reece ST, Macdonald M, Sapkota BR, Ranjit C, Franken KL, Zewdie M, Aseffa A, Hussain R, Stefani MM, Cho SN, Oskam L, Brennan PJ, Dockrell HM 2009. From genome-based in silico predictions to ex vivo verification of leprosy diagnosis. *Clin Vaccine Immunol* 16: 352-359.

Geluk A, Klein MR, Franken KL, van Meijgaarden KE, Wieles B, Pereira KC, Bühner-Sékula S, Klatser PR, Brennan PJ, Spencer JS, Williams DL, Pessolani MC, Sampaio EP, Ottenhoff TH 2005. Postgenomic approach to identify novel *Mycobacterium leprae* antigens with potential to improve immunodiagnosis of infection. *Infect Immun* 73: 5636-5644.

Geluk A, van der Ploeg-van Schip JJ, van Meijgaarden KE, Commandeur S, Drijfhout JW, Benckhuijsen WE, Franken KL, Naafs B, Ottenhoff TH 2010. Enhancing sensitivity of detection of immune responses to *Mycobacterium leprae* peptides in whole-blood assays. *Clin Vaccine Immunol* 17: 993-1004.

IBGE [database on the Internet] -Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo 2010. [accessed 10 February 2012]. Available from: <http://www.ibge.gov.br/estadosat>

Kerr-Pontes LR, Montenegro AC, Barreto ML, Werneck GL, Feldmeier H 2004. Inequality and leprosy in northeast Brazil: an ecological study. *Int J Epidemiol* 33: 262-9.

Lázaro FP, Werneck RI, Marcket CCO, Cobat A, Prevedello FC, Pimentel RP, Macedo GMM, Eleutério MAM, Vilar G, Abel L, Xavier MB, Alcais A, Mira MT 2010. A major gene controls leprosy susceptibility in a hyperendemic isolated population from north of Brazil. *J Infect Dis* 201: 1598-1605.

MS/SVS- Ministério da Saúde/ Secretaria de Vigilância em Saúde 2011. [accessed by 2 february 2012]. Relatório de Situação Goiás. Available from: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/12_Goiás_final.pdf

MS/SVS-Ministério da Saúde/ Secretaria de Vigilância em Saúde 2009. [accessed by 5 february 2012]. Relatório de Situação Mato Grosso. Available from: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/005_mt_relatorio_de_situacao.pdf

Oskam L, Slim E, Bühner-Sékula S 2003. Serology: recent developments, strengths, limitations and prospects: a state of the art overview. *Lepr Rev* 74:196–205.

Reece ST, Ireton G, Mohamath R, Guderian J, Goto W, Gelber R, Groathouse N, Spencer J, Brennan P, Reed SG 2006. ML0405 and ML2331 are antigens of *Mycobacterium leprae* with potential for diagnosis of leprosy. *Clin Vaccine Immunol* 13: 333-340.

Sampaio LH, Stefani MM, Oliveira RM, Sousa AL, Ireton GC, Reed SG, Duthie MS 2011. Immunologically reactive *M. leprae* antigens with relevance to diagnosis and vaccine development. *BMC Infect Dis* 11: 26.

Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL 2006. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev* 19: 338-381.

Silva EA, Iyer A, Ura S, Lauris JR, Naafs B, Das PK, Vilani-Moreno F 2007. Utility of measuring serum levels of anti-PGL-I antibody, neopterin and C-reactive protein in monitoring leprosy patients during multidrug treatment and reactions. *Trop Med Int Health* 12: 1450–1458.

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 2005. Identification of specific proteins and peptides in *Mycobacterium leprae* suitable for the selective diagnosis of leprosy. *J Immunol* 175: 7930-7938.

Spencer JS, Kim HJ, Wheat WH, Chatterjee D, Balagon MV, Cellona RV, Tan EV, Gelber R, Saunderson P, Duthie MS, Reece ST, Burman W, Belknap R, Kenzie WRM, Geluk A, Oskam L, Dockrell HM, Brennan PJ 2011. Analysis of antibody responses to *Mycobacterium leprae* phenolic glycolipid I, lipoarabinomannan, and recombinant proteins to define disease subtype-specific antigenic profiles in leprosy. *Clin Vaccine Immunol* 2: 260–267.

Stefani MMA 2008. Challenges in the post genomic era for the development of tests for leprosy diagnosis. *Rev Soc Bras Med Trop* 41 suppl II : 89-94.

WHO- World Health Organization 1991. Multi drug therapy for leprosy 1991. *WHO Bulletin* 69: 263-269.

WHO - World Health Organization 2010. Global leprosy situation 2010. *Wkly Epidemiol Rec* 85: 337-348.

Young DB, Buchanan TM 1983. A serological test for leprosy with a glycolipid specific for *Mycobacterium leprae*. *Science* 221: 1057-1059.