JANAINA MIRANDA BEZERRA

Desempenho de antígenos nativo, recombinante e sintético, em testes imunoenzimáticos, para diagnóstico e prognóstico de pacientes com diferentes formas clínicas de hanseníase

**Tese apresentada a Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências**

**Programa de: Doenças Infecciosas e
Parasitárias**

Orientador: Prof. Dr. Antônio Walter Ferreira

SÃO PAULO

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Bezerra, Janaina Miranda

Desempenho de antígenos nativo, recombinante e sintético, em testes
imunoenzimáticos, para diagnóstico e prognóstico de pacientes com diferentes
formas clínicas de hanseníase / Janaina Miranda Bezerra. -- São Paulo, 2012.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: Antônio Walter Ferreira.

Descritores: 1.Hanseníase 2.Diagnóstico 3.ELISA 4.Western Blotting
5.Prognóstico 6.*Mycobacterium leprae*

USP/FM/DBD-293/12

"O senhor não daria banho em um leproso nem por um milhão de dólares? Nem eu. Somente por amor se pode dar banho em um leproso."

Madre Tereza de Calcutá

Dedico àquele que me enviou, ensinou e me sustentou em espírito e em verdade. Sei que esta conquista não é minha, mas dele para mim... daria para escrever um livro de como tudo isso aconteceu, de como os seus desígnios não falham, pelo contrário, se consolidam no tempo certo, da forma certa.

Vi sua mão em cada situação, em cada “anjo” que foi cuidadosamente escolhido para me ajudar... quantas vezes, achei que a escuridão tinha chegado e de repente, a sua luz acendia meu coração... uma nova esperança, sua fidelidade e graça me encorajavam a continuar... se eu fosse contar, quantas vezes, a distância parecia maior... quantas vezes pedi ao meu DEUS, força, coragem, consolo e tranquilidade para poder prosseguir nessa jornada.

Obrigada meu Pai, Aba Pai! Por todo cuidado, pelo testemunho que posso contar hoje e sei que levarei para sempre este ensinamento maior, o de confiar e amar a ti de todo o coração e sobre todas as coisas, porque todas elas foram criadas por ti e são para tua honra e glória.

“Quando Deus é o centro, todas as outras coisas tomam os seus devidos lugares!”

Ao meu esposo Celso e a minha filha Isabela,
por fazerem parte de um projeto maior, a construção de uma família cristã e pelo amor incondicional. **Obrigada meu amor,** minha alma gêmea, por ser pai, mãe e “dono de casa” nas minhas ausências. **Bebela,** minha flor, você é meu maior galardão. Amores da minha vida, obrigada pela paciência e compreensão.

Aos meus pais, Adeuvaldo e Maria de Deus,

pelo incentivo e presença diária na minha vida. Por me acompanharem desde o jardim de infância e serem exemplos a seguir. Anjos da minha vida, amo vocês. Obrigada por tudo!

Ao meu amigo e mestre, Antônio Walter Ferreira,

por ser exemplo de vida. Pela paciência, sabedoria, gentileza e orientação criteriosa. Sua determinação e forma de trabalho nos inspiram. Obrigada por me apoiar e estimular nos momentos difíceis dessa jornada. Sinto-me honrada, agraciada por DEUS por tê-lo como mestre e amigo. Nesses 10 anos de convívio, posso confessar que o Maranhão ficou muito perto de São Paulo!

AGRADECIMENTOS

Aos pacientes do Centro de Dermatologia Sanitária de Imperatriz que participaram voluntariamente deste estudo, pela colaboração e disponibilidade. Muito obrigada!

Aos funcionários do Centro de Dermatologia Sanitária de Imperatriz-MA, em especial ao Dr. Pedro Júlio, Enf. Francisco Cutrim, Nilza e Raimundinha, por me auxiliarem na coleta do material clínico e das informações dos pacientes e pelo carinho com que me receberam.

Ao Prof. Dr. John Spencer (Universidade do Estado do Colorado - USA) e ao Prof. Dr. Steven Reed (IDRI) pelo fornecimento dos antígenos utilizados neste trabalho e pela troca de informações.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Maranhão – FAPEMA, por apoiar o desenvolvimento deste trabalho e pelo suporte financeiro, por meio da concessão da bolsa de doutorado. Muito obrigada!

Aos meus irmãos, Dário e Karolinne, cunhados, Ângela e Marcone, e nossa princesa Ana Clara, por me apoiarem, pelos momentos de descontração e fortalecimento familiar.

À minha família marital, Carolina, Carla, Gustavo e ao nosso anjinho, Pedro, pelo apoio e incentivo, por me acolherem tão bem, principalmente, nos nossos maravilhosos finais de semana. Obrigada por auxiliarem no cuidado da Isabela principalmente, quando estive ausente, permitindo uma viagem mais tranquila.

À minha amiga e anjo de Deus, Kelly Kanunfre, por sua amizade, pelo apoio, por ser fundamental na realização deste trabalho. Tenho dito sempre, essa é sua segunda tese de doutorado, divido com você esta conquista! Obrigada por me acolher na sua casa, ouvir meus desabafos, me aconselhar e por estar tão presente na distância.

À Dra. Thelma Okay, Dra. Sandra do Lago Moraes, Dr. Guita Rubisnk Elefant, Dra. Carmem Arroyo Sanches, Dr. Ângelo Lindoso, Dr. Paulo Cutrin, pela troca de informações, apoio, carinho e incentivo.

Às minhas irmãs de alma, Carola, Kika e Ariadne, presentes que DEUS nos dá ao longo dos anos. Como é bom contar com vocês em todas as horas, como é bom de perto ou na distância, ouvir a voz, apoio e conselhos de amigas tão queridas e amadas.

Aos casais amigos do grupo franciscano, da Nossa Amada Paróquia de São Francisco de Assis, Juliano e Alessandra, Rafael e Panmalla, Polibio e Tânia, Manoel e Iraildes, Alcerte e Dulce, Nascimento e Elvira, Leandro e Rosimar, Railson e Raylanne, Edival e Olizete, sem vocês essa jornada teria sido muito

pesada! Em especial, ao nosso casal amigo e padrinho, Joaquim e Gardênia, que DEUS me enviou como anjos, me ajudaram literalmente a “voar” de Imperatriz para São Paulo durante todos esses anos. Não sei expressar minha gratidão!!

Aos amigos do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, em especial a Claudinha e Patricinha, pela delicadeza, humildade, meiguice e carinho. As amigas Edite, Lilian, Marcela, Cris, Edna, pelo apoio, convivência, carinho e pelos momentos descontração que vivemos.

Às eternas meninas do laboratório, Sandra Beck, Elaine Lemos, Fabi e Amandita, apesar de cada uma ter seguido rumos diferentes, em locais diferentes, tudo o que vivenciamos juntas nesse laboratório estará guardado com carinho.

Às colegas do laboratório, Flávia, Camila e Anita, pela convivência e amizade.

Aos funcionários e grupos de pesquisa do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo e a todos do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do IMTSP, pelo incentivo, colaboração e acolhimento desde a realização do meu mestrado.

Às secretárias da Pós Graduação, Vânia e Roseli, sempre tão solícitas e amáveis. Obrigada por me ajudarem a vencer a distância!

Muito Obrigada

“Se eu enxerguei mais longe do que os outros, foi porque me apoiei em ombros de gigantes”

Isaac Newton

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

Lista de tabelas

Lista de figuras

Lista de quadros

Resumo

Abstract

INTRODUÇÃO	1
1. Aspectos epidemiológicos e controle da hanseníase.....	2
2. Agente etiológico	8
3. Resposta imunológica do hospedeiro e aspectos clínicos	17
4. Diagnóstico	23
5. Justificativa	35
OBJETIVOS	37
MÉTODOS	39
1. Casuística	40
2. Aspectos éticos da pesquisa	43
3. Teste Imunoenzimático ELISA	43
4. WESTERN BLOTTING	48
5. “Receiver Operating Characteristic Curve” - CURVA ROC	52
6. Análise Estatística	53
RESULTADOS	54
1. ELISA antígeno recombinante LID-1	55
2. ELISA ND-O-BSA	61

3.	Associação dos resultados do ELISA LID-1 e ND-O-BSA e teste de Mitsuda	66
4.	Associação dos resultados do ELISA ND-O-BSA E ELISA LID-1 ..	67
5.	WESTERN BLOTTING	69
6.	Associação dos resultados dos testes ELISA E WESTERN BLOTTING	74
DISCUSSÃO		77
CONCLUSÃO		92
ANEXOS		94
REFERÊNCIAS		97
APÊNDICES		

LISTAS DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

BSA	albumina de soro bovino
CFP-10	culture filtrate protein 10”
CO	classificação operacional
Curva ROC	“Receiver Operating Characteristic Curve”
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ELISA	“Enzyme Linked Immunosorbent Assay” (ensaio imunoenzimático)
ESAT-6	“early secreted antigenic target 6”
HSA	albumina de soro humano
IDEAL	“Initiative for Diagnostic and Epidemiological Assay for Leprosy”
IFN - γ	Interferon gama
IL	Interleucina
Ig	Imunoglobulina
LAM	lipoarabinomana
LM	Lipomanana
LID -1	Leprosy IDRI Diagnostic – 1
MLCwA	Cell wall-associated proteins of <i>M. leprae</i>
MLLBP21	<i>Mycobacterium leprae</i> – Laminin binding protein 21
MLSA-LAM	“ <i>M. leprae</i> soluble antigen
MMP-I	Major Membrane Protein I
MMP-II	Major Membrane Protein II
ND-O-BSA	dissacarídeo natural-octil-BSA (PGL-I sintético)-
NR	Não reagente
NR	Não realizado
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	“Phosphate Buffer Saline” - solução salina tamponada com fosfato
PBS-Tw 20	PBS contendo Tween 20 0,05%
PIMs	Fosfatilinositol – manoside
PCR	“Polymerase Chain Reaction” (reação em cadeia da polimerase)

PGL-I	glicolípido fenólico-I
PNCH	Programa Nacional de Controle da Hanseníase
PQT	poliquimioterapia
QTF - G	QuantiFERON [®] - TB Gold
RIC	Resposta imune celular
R	Reagente
RNA	Ácido ribonucléico
SC	célula de Schwann
SDA	Dodecil sulfato de sódio
SINAN	Sistema de Informação de Agravos e Notificação
TGF- β 1	fator transformador do crescimento-beta1
Th1	Linfócito T helper 1
Th2	Linfócito T helper 2
TMB	tetrametilbenzidina
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
VPN	valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo
WB	Western Blotting
M	molar
mM	milimolar
mg	miligrama
mL	mililitro
μ L	microlitro
nm	nanômetro
μ g	micrograma
mm	milímetro
ng	nanograma
W	Watts
kDa	kiloDalton
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄	ácido sulfúrico

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Correlação entre a classificação de Madri e as classificações de Ridley & Jopling e da OMS.	23
Tabela 2	Resumo da detecção de imunoglobulinas em pacientes com hanseníase frente a diferentes antígenos, por ensaios imunoenzimáticos.	31
Tabela 3	Distribuição dos pacientes com hanseníase segundo critérios de classificação da doença.	41
Tabela 4	Interpretação do teste de acordo com a área sob a curva ROC.	53
Tabela 5	Resultados de sensibilidade, especificidade e valores preditivos, nos diferentes grupos estudados no ELISA LID-1.	59
Tabela 6	Resultados do ELISA – LID-1 e da baciloscopia do esfregaço de raspado intradérmico (BAAR) nos 50 pacientes com hanseníase.	60
Tabela 7	Resultados de sensibilidade, especificidade e valores preditivos, nos diferentes grupos estudados no ELISA ND-O-BSA.	63
Tabela 8	Resultados do ELISA ND-O-BSA associado ao resultado da baciloscopia do esfregaço intradérmico nos 50 pacientes com hanseníase.	65
Tabela 9	Resultados do ELISA LID-1 e ELISA ND-O-BSA associado ao resultado do teste de Mitsuda em pacientes com hanseníase.	66
Tabela 10	Associação dos resultados do ELISA ND-O-BSA e LID-1 nas amostras de soros de 61 pacientes com hanseníase nas diferentes formas clínicas.	68
Tabela 11	Associação dos resultados do ELISA ND-O-BSA e LID-1 nas 51 amostras de soros do Grupo Controle – residentes em área endêmica e não endêmica.	69
Tabela 12	Reatividade de anticorpos IgG para fração de 38kDa e regiões protéicas de <i>M. leprae</i> .	72

Tabela 13	Reatividade de anticorpos IgG para a fração e regiões protéicas de <i>M. leprae</i> presentes nas amostras de soros dos pacientes com diferentes formas clínicas de hanseníase.	74
Tabela 14	Resultados dos testes Western Blotting, ELISA-ND-O-BSA para pesquisa de anticorpos totais e ELISA LID-1 para pesquisa de anticorpos IgG nos grupos estudados.	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Modelo Esquemático do envoltório celular de <i>M. leprae</i> .	10
Figura 2	Densidades ópticas das amostras de soros estudadas, segundo os protocolos definidos.	56
Figura 3	Curva ROC para o antígeno recombinante LID-1 para pesquisa de anticorpos IgG anti- <i>M. leprae</i> .	57
Figura 4	Densidades ópticas das amostras de soros dos pacientes com hanseníase nas formas multibacilares (MB), paucibacilares (PB), indeterminada (I), grupo controle (Residentes em área endêmica - RAE e residentes em área não endêmica - RANE), pacientes com tuberculose pulmonar e contatos.	59
Figura 5	Densidades ópticas das amostras de soros de pacientes com hanseníase nas diferentes formas clínicas e indivíduos residentes em área não endêmica (RANE).	61
Figura 6	Curva ROC para o ELISA ND-O-BSA para pesquisa de anticorpos totais anti- <i>M. leprae</i> .	62
Figura 7	Densidades ópticas das amostras de soros dos pacientes com hanseníase nas formas multibacilares (MB), paucibacilares (PB), indeterminada (I), grupo controle (Residentes em área endêmica - RAE e residentes em área não endêmica - RANE), pacientes com TB pulmonar e contatos.	64
Figura 8	Eletroforese do extrato antigênico de <i>M. leprae</i> em gel de poliacrilamida 15%.	70
Figura 9	Western Blotting com soro reagente a 1/100.	71

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Variáveis técnicas utilizadas na padronização do ELISA com antígeno recombinante LID-1 para pesquisa de anticorpos IgG anti- <i>M. leprae</i> .	45
Quadro 2	Variáveis técnicas utilizadas na padronização do ELISA com antígeno sintético ND-O-BSA para pesquisa de anticorpos Ig total anti- <i>M. leprae</i> .	46

RESUMO

BEZERRA, JM. Desempenho de antígenos nativo, recombinante e sintético, em testes imunoenzimáticos, para diagnóstico e prognóstico de pacientes com diferentes formas clínicas de hanseníase. [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.124p.

Apesar da Organização Mundial de Saúde (OMS) ter adotado medidas de controle, a hanseníase permanece como um problema social e de saúde pública em muitos países. O diagnóstico clínico e a baciloscopia permanecem como as principais ferramentas utilizadas para a classificação dos pacientes e definição da terapêutica a ser instituída. A identificação de novos antígenos de *M. leprae*, o desenvolvimento de novos métodos laboratoriais e melhorar o desempenho de testes sorológicos já existentes são prioridades para tentar atingir as metas da OMS programadas para o período de 2011-2015. Neste estudo avaliamos o desempenho diagnóstico dos antígenos glicolípido sintético ND-O-BSA para pesquisa de anticorpos totais e recombinante LID-1, para pesquisa anticorpos IgG por ELISA; e o perfil de reatividade de anticorpos IgG contra proteínas nativas de *M. leprae* por Western Blotting, em amostras de soros de pacientes de área endêmica com diferentes formas clínicas da doença. Nossos resultados mostraram que os testes ELISA ND-O-BSA e LID-1 auxiliaram na detecção de 70% dos pacientes multibacilares com baciloscopia negativa. O valor preditivo negativo foi de 94% para ambos os testes. A análise do Western Blotting mostrou que pacientes multibacilares possuem anticorpos IgG para a fração de 38kDa e região de 3,5kDa, esta reatividade não foi observada no grupo controle. Nosso estudo sugere a utilização do ELISA, com antígenos recombinante e sintético, na rotina diagnóstica; e que a fração de 38kDa e região de 3,5kDa, de antígeno nativo de *M. leprae*, são bons marcadores no diagnóstico de hanseníase e no prognóstico de pacientes com as formas borderline e indeterminada da doença.

Descritores: 1. Hanseníase 2. Diagnóstico 3. ELISA 4.
Western Blotting 5. Prognóstico 6. *Mycobacterium leprae*

ABSTRACT

BEZERRA, JM. Performance of native, recombinant and synthetic antigens by enzyme immunoassays for the diagnosis and prognosis of leprosy patients classified in the wide spectrum of the disease. [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2012.124p.

Although several control measures have been adopted by the World Health Organization, (WHO) leprosy continues to be a social and public health problem in many countries. Clinical diagnosis and acid-fast bacilli skin smear are the main tools used to classify patients and define therapy. According to the WHO program for 2011–2015, the identification of new *Mycobacterium leprae* antigens, the development of new laboratory methods and improved serological tests are the priorities. In the present study, we evaluated the diagnostic performance of the synthetic glycolipid antigen, ND-O-BSA, to detect total antibodies and the recombinant antigen LID-1 to detect IgG antibodies by ELISA and the IgG reactivity profile against native *M. leprae* proteins by Western blot in serum samples from leprosy patients classified in the wide spectrum of the disease. Our results showed that ND-O-BSA and LID-1 ELISA are able to detect the disease in 70% of multibacillary patients with negative skin smears. The negative predictive values were 94% for both tests. The Western blot analysis revealed that most multibacillary patients had IgG antibodies against the 38 kDa and 3.5 kDa regions; this reactivity was not observed in the control group. Our study suggests the use of ELISA, with recombinant or synthetic antigens, in routine diagnosis and that the 38 kDa fraction and the 3.5 kDa region, from native *M leprae* antigen, are good markers for the diagnosis of leprosy and its prognosis as shown for the borderline and indeterminate forms of the disease.

Descriptors: 1. Leprosy 2. Diagnosis 3. ELISA 4. Western
Blotting 5. prognosis 6. *Mycobacterium leprae*

INTRODUÇÃO

A hanseníase (Lepra, Doença de Hansen ou Morféia) é uma doença infecto-contagiosa crônica causada por *Mycobacterium leprae* que resulta em dano tecidual cutâneo e nervoso, lesões na pele, neuropatia periférica, anestesia e, dependendo do estado imunológico do paciente pode evoluir para deficiência e deformidades.

1. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E CONTROLE DA HANSENÍASE

A origem da hanseníase é, ainda, um ponto obscuro para os pesquisadores. Existem poucos registros, referências e discussões sobre o aparecimento da doença. Seus relatos perdem-se na pré-história e documentos antigos da humanidade, como os papiros egípcios, livros mosaicos e védicos, Avesta persa e nas tradições fenícias. As primeiras descrições da doença, foram encontradas na Índia e no Egito, datadas do século 7 a.C., onde a doença era conhecida como “Kushta”, em sânscrito (Cunha, 2002; Cunha, 2003).

No Antigo Testamento, em Levítico, capítulo 13, encontramos orientação sobre a hanseníase, seus sinais para identificação e cuidados em relação aos doentes, mas não achamos relatos que comprovassem a doença (Cunha, 2002; Cunha, 2003).

Na idade média, o que se sabia da hanseníase pode ser encontrado apenas nas informações dos manuscritos deixados pelos médicos da época, que afirmavam que o Egito detinha o maior número de casos. No entanto, Koelbing (1972) contestava dizendo que a doença era confundida com

outras doenças de pele existentes naquela época, como a filariose, sífilis e as demais dermatoses (Cunha, 2002).

Frohn (1933), Virchow (1860) e Hansen (1897) defendiam a teoria de que a hanseníase já existia na Europa na época da introdução do cristianismo e que se tornou endêmica na Idade Média (Cunha, 2002). A disseminação da doença era tida como consequência do crescimento da população e sua concentração no confinado espaço das cidades medievais, do movimento das Cruzadas e dos peregrinos (D'Haucourt, 1994; Rosen, 1994). O atraso na medicina gerava dificuldade na distinção com outras doenças dermatológicas, sendo então classificada como lepra verdadeira e lepra falsa (Cunha, 2002).

A partir do século XVII começou uma gradual desativação dos leprosários na Europa. Enquanto neste continente a doença tendia ao desaparecimento, mantinham-se os focos endêmicos na Ásia e na África e introduzia-se a doença no Novo Mundo, a partir das conquistas espanholas, portuguesas e da importação de escravos africanos (Serviço Nacional de Lepra, 1960; Eidt, 2004).

Nas Américas, a hanseníase deve ter chegado com migrantes europeus e africanos entre os séculos XVI e XVII (OMS, 1984). Na América do Sul, a doença teria sido trazida por colonos espanhóis e portugueses. Atualmente, todos os países sul-americanos, com exceção do Chile têm hanseníase (Opromolla, 2000; Eidt, 2004).

No Brasil, os primeiros casos da doença foram notificados no ano de 1600, na cidade do Rio de Janeiro, onde anos mais tarde, seria criado o

primeiro leprosário. Em decorrência do desenvolvimento das regiões e das novas colonizações, houve migração de doentes às mais diferentes regiões do território brasileiro. Estes focos, muito distantes um dos outros, correspondiam às cidades mais importantes economicamente (Brasil, 1989; Eidt, 2004).

A partir da década de 40, foi adotada a monoterapia com sulfonas, causando um grande impacto no tratamento da doença. No entanto, o surgimento de casos sulfono resistentes, a persistência bacilar e o abandono ao tratamento devido a sua longa duração levaram a OMS a recomendar, em 1982, um tratamento poliquimioterápico (PQT) baseado na associação das drogas dapsona, rifampicina e clofazimina, eficazes no tratamento individual nos programas de controle da hanseníase.

Em 1985, a OMS estimou que houvesse 12 milhões de pessoas com hanseníase no mundo, com prevalência de 12 por 10.000 habitantes. Na década 90, a OMS lançou uma campanha de erradicação da hanseníase, o “Plano Estratégico para Eliminação da Hanseníase 2000-2005”, tendo como meta até o ano de 2000, alcançar a prevalência de menos de 1 caso por 10.000 habitantes (WHO, 1991; Britton & Lockwood, 2004).

Em 2002, dos 122 países considerados endêmicos em 1985, 107 alcançaram a meta estipulada pela OMS, restando apenas 15 países com prevalência maior que 1 caso por 10.000 habitantes. Do total de casos notificados, 83% estavam concentrados em seis países: Índia, Brasil, Mianmar, Madagascar, Nepal e Moçambique, com prevalência média de 3,9 casos por 10.000 habitantes (WHO, 2002). Como resultado à política

adotada, mais de 11 milhões de pessoas com hanseníase foram curadas por poliquimioterapia, muitos sem qualquer deficiência física.

A redução no tempo do tratamento e a remoção dos registros de pacientes curados ou desistentes, mostrava um decréscimo na prevalência, porém na prática, o que se observava era que a detecção de novos casos continuavam aumentando (Britton & Lockwood, 2004).

O relatório do Fórum Internacional da Associação Técnica da hanseníase realizado em Paris (2002), mostrou que a demora ou ausência de diagnóstico de pacientes sintomáticos e a dificuldade de se diagnosticar contactantes era responsável pela continuidade da transmissão da doença.

Em outubro de 2003, foi realizado em Amsterdã um workshop patrocinado pela OMS/TDR onde pesquisadores de diversas instituições públicas e privadas criaram o IDEAL Consortium (Initiative for Diagnostic and Epidemiological Assay for Leprosy) com o objetivo de promover pesquisas e elaborar estratégias no desenvolvimento de novas ferramentas para o diagnóstico e identificação de novos marcadores moleculares para estudos epidemiológicos na hanseníase (Assefa et al, 2005).

Foram estabelecidas propostas para a implementação de métodos que permitiam a detecção da infecção e a presença de atividade de *M. leprae* em estágios iniciais no indivíduo, antes do aparecimento dos sinais clínicos característicos e transmissão da doença.

No ano de 2005, a OMS com intuito de implementar as ações de controle da doença, lançou o programa “Estratégia Global para Aliviar a Carga da Hanseníase e Manter as Atividades de Controle da Hanseníase”

para o período de 2006-2010, que resultou da evolução natural do Plano Estratégico, projetado para tratar dos desafios remanescentes e diminuir ainda mais a carga sanitária da doença.

No ano de 2008, 121 países do mundo notificaram hanseníase (WHO, 2008). O número de novos casos durante esse ano foi de 249.007, sendo que as maiores taxas foram reportadas na Índia e no Brasil. Do total de casos notificados, 94% estavam concentrados em 17 países que informaram detecção maior ou igual a 1.000 casos (OMS, 2009).

Dados da OMS (2010) mostraram que a “Estratégia Global 2006-2010”, baseada na detecção precoce de novos casos e tratamento com poliquimioterapia foi utilizada com sucesso. Por meio de suas ações de controle conseguiram reduzir importantes indicadores da gravidade da endemia, como o coeficiente de detecção de novos casos em menores de 15 anos que baixou de 6,07 em 2007 para 5,36 por 100.000 habitantes em 2010, representando uma redução de 11,7%, alcançando a meta de 10% de redução até o ano de 2011. No entanto, é válido ressaltar, que este valor é ainda considerado muito elevado (WHO, 2011).

Em 2010, 130 países do mundo notificaram casos de hanseníase e o número de novos casos foi de 228.474. Estes dados foram influenciados pelo número de casos notificados pela Índia com 126.800 e pelo Brasil com 34.894 casos (WHO, 2011).

A OMS e os Programas Nacionais de Controle da Hanseníase desenvolveram a “Estratégia Global Aprimorada 2011 - 2015”. Foi recomendado que serviços de qualidade fossem utilizados para a redução

do número de casos de hanseníase não apenas pela detecção precoce dos novos casos, mas também, pela redução da incapacidade, do estigma, da discriminação e a promoção da reabilitação social e econômica das pessoas afetadas (OMS, 2010).

Em agosto de 2010, foi realizado em Beijing na China, o sexto workshop do IDEAL Consortium (Initiative for Diagnostic and Epidemiological Assay for Leprosy) com o objetivo de integrar as informações da pesquisa que incluíam parceiros de instituições e programas de controle da hanseníase. Novas metas foram propostas para o grupo, dar continuidade com pesquisa de novas ferramentas diagnósticas e elaboração de um projeto de intervenção nos contatos de pacientes com hanseníase (Dockrell et al., 2011).

No Brasil, desde o ano de 2008, a maior ocorrência de casos tem sido registrada nas regiões Norte, Centro-Oeste e Nordeste. Os dados evidenciaram o comprometimento da região da Amazônia Legal em relação à hanseníase, como consequência das barreiras físicas e sociais que dificultam o acesso aos serviços de saúde (Brasil, 2008).

A coordenação do Programa Nacional de Controle da Hanseníase (PNCH) do Brasil assumiu como objetivo de saúde pública o controle da doença e deu prioridade, neste aspecto, ao acompanhamento epidemiológico do coeficiente de detecção de novos casos, optando por sua apresentação por 100.000 habitantes.

Dados do Ministério da Saúde (2008) mostraram que o coeficiente de detecção de novos casos em menores de 15 anos foi elevado

(6,07/100.000), demonstrando que existiam focos de transmissão ativa e contínua da doença e seu acompanhamento epidemiológico era relevante para o controle da hanseníase (WHO, 2008; Sistema de Informações de Agravos de Notificação do Ministério da Saúde, 2009).

Em 2010, o coeficiente de prevalência no Brasil alcançou 1,56 casos por 10 mil habitantes, com importantes variações regionais. Nos estados da região Norte, Centro-Oeste e em algumas regiões metropolitanas do Nordeste apresentavam coeficiente de detecção de novos casos em menores de 15 anos elevado (5,34/100.000hab), demonstrando que existia ainda, grande aglomeração de casos e indícios de transmissão ativa (WHO, 2010; WHO, 2011; Sistema de Informações de Agravos de Notificação do Ministério da Saúde, 2011).

O Ministério da Saúde embasado na “Implementação da Estratégia Global Aprimorada para Redução Adicional da Carga da Hanseníase de 2011- 2015” lançaram, as Diretrizes Operacionais Atualizadas. Foram mantidas as recomendações do plano sobre o diagnóstico precoce, redução dos casos com grau II de incapacidade e completa acessibilidade à terapêutica.

2. AGENTE ETIOLÓGICO

O agente etiológico da hanseníase foi identificado em 1973, pelo médico norueguês Gerhard Armauer Hansen e em sua homenagem foi

denominado de bacilo de Hansen (Foss, 1999 e Gomes, 2000). Pertence à ordem *Actinomycetales*, família *Mycobacteriaceae*, intracelular obrigatório, apresentando-se sob a forma de bacilo reto ou levemente encurvado, com extremidades arredondadas, medindo de 1,5 a 8 µm de comprimento e média de 0,3 µm de largura (Rastogi, et al., 2001; Goulart et al, 2002).

Desde a sua identificação, o bacilo até hoje não foi cultivado em meios artificiais. Sua inoculação foi conseguida pela primeira vez por Charles Shepard em 1960, em coxim de pata de camundongo, obtendo lesão localizada típica da doença de Hansen.

A parede celular do *M. leprae*, possui propriedades comuns as outras micobactérias, membrana plasmática rígida, composta por peptidoglicano e arabinoglicano, camada intermediária (composta de ácidos micólicos) e uma camada externa (composta de vários lipoglicanos, polissacarídeos livres, glicolipídeos e fosfolipídeos). Outros componentes, como lipoarabinomana (LAM), Lipomanana (LM), Fosfatilinositol – manoside (PIMs), fator corda (Dimicolato de Trealose), sulfolipídeos e proteínas estão associados a este arranjo físico que é ainda pouco estudado (Draper et al, 1987; Vissa & Brennan, 2001) (Figura 1).

PIMs – Fosfatilinositol Manosídeo; PGL-I – Glicolípido fenólico; TMM – Monomicolato de Trealose; LAM – Lipoarabinomanana; PDIM – Dimicocerosate Fitiocerosol; LM – Lipomanana.

Figura 1 - Modelo Esquemático do envoltório celular de *M. leprae*. Adaptado de Vissa & Brennan, 2001.

Kirchheimer & Storrs (1971) conseguiram infectar tatus (*Dasypus novemcinctus* - Linnaeus, 1758), comumente conhecido como tatu de nove bandas, a única espécie nativa dos Estados Unidos. Verificou-se comprometimento de pele, nervos periféricos, medula óssea, fígado, baço, linfonodos, pulmões, meninges e olhos. Desde então, *M. leprae* obtido a partir de tatus infectados experimentalmente e criados em cativeiro, têm sido a principal fonte de antígenos para pesquisas, vacinas em ensaios e realização dos testes cutâneos. Com este aporte antigênico, foi possível o início dos estudos que visaram caracterizar os componentes antigênicos do bacilo.

Um dos primeiros antígenos específicos de *Mycobacterium leprae* a ser isolado e caracterizado foi o glicolípido fenólico-I (PGL-I) (Brennan & Barrow, 1980), sendo considerado o principal glicolípido antigênico do bacilo. O antígeno PGL-I é composto por um trissacarídeo único, o 3,6-di-O-metila- β -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3-di-O-metila- α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-3-O-metila- α -L-ramnopiranosose (Hunter et al., 1982). Está envolvido na imunogenicidade e patogenicidade da infecção por *M. leprae*, induzindo grande produção de anticorpos (Hunter & Brennan, 1981).

O principal determinante antigênico de PGL-I é a última parte que contém carboidratos (di- e trissacarídeo) da molécula. Utilizando anticorpos monoclonais para analisar o determinante antigênico de PGL-I foi mostrado que a remoção do resíduo de açúcar terminal resulta na perda de ligação entre a maioria de anticorpos, enquanto a remoção de ácidos graxos de cadeia longa da molécula não fez efeito na ligação de anticorpos (Bührer-Sékula, 2008).

A síntese química do último dissacarídeo, considerado um epítopo antigênico específico, e sua conjugação à albumina de soro bovino (BSA) ou humano (HSA) seja de forma direta ou por meio de ligantes (radicais octil ou fenol), permitiu sua produção em larga escala e melhor aplicação que o PGL-I nativo (Bührer-Sékula, 2008; Spencer et al., 2011).

A caracterização dos antígenos protéicos do bacilo iniciou-se com o desenvolvimento de anticorpos monoclonais murinos contra *M. leprae*. Em 1984, a OMS organizou um grupo de trabalho visando à caracterização de suas especificidades e padrões de reação. Entre os 22 monoclonais

estudados, provenientes de seis diferentes laboratórios, foram encontrados 10 específicos para o *M. leprae*, que reagem contra o PGL-I, assim como contra antígenos de 200, 65, 55, 36, 18 e 12 kDa (Engers et al., 1985).

Em 1985, foi construída a biblioteca genômica de *Mycobacterium leprae* em vetor de expressão λ gt11, utilizando anticorpos monoclonais identificando genes de diversas proteínas, entre elas, as de pesos moleculares de 65, 36, 28, 18 e 12 kDa (NERLAND et al., 1978).

O seqüenciamento completo do genoma do *M. leprae* revelou extensa redução evolutiva, com perda de mais da metade dos genes funcionais de *M. tuberculosis*, os quais foram substituídos por genes inativos ou pseudogenes (Cole et al., 2001; Britton & Lockwood, 2004). A manutenção de um conjunto mínimo de genes pode ser a explicação para algumas características de *M. leprae*, tais como a incapacidade de ser cultivado em meio artificial, o longo tempo de duplicação e altíssima especificidade por seus alvos celulares, macrófagos e células de Schwann (Prevedello & Mira, 2007; Britton & Lockwood, 2004).

Posteriormente, foram identificados genes de proteínas que possuíam a capacidade de estimular a proliferação de células T, importantes para a proteção contra o *M. leprae*, medidos através da secreção de interferon gama (IFN- γ) e proliferação de linfócitos. Dentre estas, estão as proteínas de 70kDa, 30/31kDa, 15kDa e 10kDa (Mendonça-Lima et al., 1991; Thole et al., 1992; Sekar, B., 2007; Goulart et al., 2008).

Entre as diversas proteínas da micobactéria, as mais estudadas são aquelas envolvidas com a patogenia da doença e as que são reconhecidas

por anticorpos de pacientes com hanseníase. Entre as mais estudadas estão:

- A) GRoes – pertencentes a família das proteínas de choque térmico ou proteínas de estresse (10 a 12 kDa). Apresentam um papel importante na adaptação da micobactéria às variações do microambiente. Têm sua síntese aumentada quando o bacilo é exposto à alta temperatura e outros fatores de estresse como radicais de oxigênio e etanol. Possui mais de 90% de homologia com *M. tuberculosis*, apresentando uso limitado em reagentes para laboratório (Sekar, 2007).
- B) Proteína rica de serina - 45kDa – foi descrita como antígeno específico de *M. leprae*, possuindo epítomos para células T, no entanto, têm sido demonstrada homologia com *M. tuberculosis* (Vega-Lopez et al., 1993).
- C) Antígeno 85B – pertence ao complexo antigênico 85 (30-32kDa) - são proteínas externas da parede celular, subdividem-se em 85A, B e C que apresentam diferentes graus de ligação com a fibronectina. São imunodominantes e sugere-se que estejam envolvidas no processo de ligação da micobactéria à receptores de superfície específicos dos macrófagos.
- D) MMP I (“Major Membrane Protein I”) – o gene que codifica a proteína de 35kDa foi identificado, isolado e caracterizado em 1995. Este trabalho demonstrou que a proteína apresenta epítomos específicos para as células T e que possui homologia com o *M.*

avium e não com complexo *M. tuberculosis* (Winter et al., 1995; GOULART et al., 2008).

- E) MMP II (“Major Membrane Protein II”) – foi inicialmente identificada como maior proteína nativa do *M. leprae*, com massa molecular de 380kDa, apresentando um resíduo central de feroxidase conservado entre as espécies de *M. tuberculosis*, *M. leprae* e *M. avium*. A homologia entre elas foi 86% (Sekar, 2007).
- F) CFP-10 (10kDa) e ESAT-6 (6kda) - proteínas de baixa massa molecular, já descritas como proteínas secretadas de *M. tuberculosis*, foram também identificadas no *M. leprae*. Os genes que codificam estas proteínas estão localizados na região RD1, um após o outro, assim como no *M. tuberculosis*. A homologia destas proteínas (ESAT-6 e CFP-10) com *M. tuberculosis* foi de 36% e 40%, respectivamente. Tem sido demonstrado que essas proteínas são reconhecidas por células B e T, sendo capazes de gerar forte resposta imune, comprovada pela detecção de interferon - gama (IFN- γ) em indivíduos exposto ao *M. leprae*, como também, produção de anticorpos na fase inicial, em que a bactéria está metabolicamente viável, podendo ser utilizado tanto para detecção precoce da infecção, como para monitoramento da terapêutica (Geluk et al., 2002; Geluk et al., 2004, Spencer et al., 2002; Spencer et al., 2004; Parkash, 2011).

Com a disponibilidade das sequências do genoma completo de *M. leprae* e de outras micobactérias, têm sido possível aplicar conceitos de genômica e bioinformática para a identificação de peptídeos e proteínas específicas, incluindo proteínas secretadas ou de superfície, como também, pode ser realizada análise *in silico* de proteínas para o estudo de epítomos de células - T que possam ser úteis no diagnóstico de pacientes com hanseníase nas diferentes formas clínicas (Araoz et al., 2006; Imtech: PROPRED. [<http://www.imtech.res.in/raghava/propred/>; Cole et al., 2001]).

Em relação as proteínas recombinantes de *M. leprae*, diferentes estudos têm avaliado sua imunoreatividade em pacientes e controles. As proteínas recombinantes, ML 0308, ML 0405 e ML 2331 foram as mais reativas, sendo que outras, como a ML 0678, ML 0757, ML 2177, ML 2244 e ML 2498 demonstraram ser fortes epítomos de células B quando testadas em pacientes com tuberculose, contactantes e pacientes com hanseníase do Mali e de Bangladesh (Araoz et al., 2006; Reece et al., 2006; Sampaio et al., 2011).

As proteínas recombinantes ML 2331, ML 0405TR, ML 2055 e ML 0091 foram avaliadas por ELISA com amostras de soros provenientes do Brasil e das Filipinas. Destas, duas proteínas (ML 0405 e ML 2331) identificaram especificamente pacientes com a forma multibacilar (BL e LL), reforçando o diagnóstico sorológico feito por PGL-I (Reece et al., 2006). Em seguida, o mesmo grupo de pesquisadores realizaram a construção da fusão das duas proteínas recombinantes (ML 2331 e ML 0405Tr) denominada de LID -1 ("Leprosy IDRI Diagnostic – 1") (Duthie et al. 2007).

A proteína ML 0405 com massa molecular de 40,7kDa, possui 63% de homologia com *M. tuberculosis*, segundo Reece et al. (2006). Existe uma probabilidade desta proteína estar localizada na membrana da micobactéria. O gene ML 2331 codifica uma proteína possivelmente secretada (ML 2331), constituída de 256 aminoácidos, com massa molecular de 26,5kDa, possui 82% de homologia com *M. tuberculosis*. As funções de ambas as proteínas não foram descritas na literatura (Reece et al., 2006; Duthie et al., 2007).

Duas novas frações do *M. leprae* foram descritas obtidas a partir da parede celular do bacilo denominadas de MLSA-LAM ("*M. leprae* soluble antigen") e a MLCwA ("cell wall-associated proteins of *M. leprae*) este último possuindo maior imunogenicidade por conter antígenos GroEL 65-kDa. Ambos estão sendo avaliados como testes cutâneos induzindo a produção de IFN- γ por células mononucleares do sangue periférico de pacientes com hanseníase tuberculóide do Paquistão (Dockrell et al., 1996; Sekar, 2007; Goulart & Goulart, 2008).

Estudo realizado por Weir et al. (1999) demonstraram que as frações MLSA-LAM e MLCwA, após passarem por processo de extração de lipídeos imunossupressores (lipoarabinomanana- LAM, lipomanana - LM, fosfolípidios como PIMS - fosfatidilinositol manosídeo) (Kaplan et al., 1987; Moura & Mariano, 1997), eram altamente imunogênicas, sendo necessários estudos *in vivo* para avaliar sua aplicação como reagentes no diagnóstico de infecção por *M. leprae*.

3. RESPOSTA IMUNOLÓGICA DO HOSPEDEIRO E ASPECTOS CLÍNICOS

O contato com *M. leprae* ocorre principalmente pelas vias aéreas superiores acarretando infecções subclínicas em um grande número de pessoas expostas (Gallo et al., 2005).

A demonstração da presença de DNA do bacilo em mucosa de pacientes e de seus contactantes, corroborou com a ideia de que a infecção latente ocorre freqüentemente e de que o nariz é a principal porta de entrada e saída de *M. leprae* (Almeida et al., 2004).

Investigações preliminares também indicaram a presença de DNA de *M. leprae* em amostras de sangue de pacientes e contactantes (Araújo et al., 2006). A presença de DNA de *M. leprae* no sangue de pessoas sadias fornece adicionais evidências epidemiológicas que o caminho da transmissão do *M. leprae* pode não ser apenas pelas vias aéreas superiores, podendo indicar possível transmissão através do sangue. Esta hipótese foi corroborada por relatos de casos, em áreas não endêmicas em que a hanseníase foi adquirida após transplante de órgãos (Modi et al., 2003; Launius et al., 2004).

Algumas estratégias foram descritas com o objetivo de elucidar as bases moleculares do controle da susceptibilidade do hospedeiro ao *M. leprae*. Aceita-se atualmente que conjuntos diferentes de genes modificam a susceptibilidade à doença em pelo menos dois momentos distintos, a saber: (i) no controle da infecção per se, isto é, a doença independentemente de

sua forma de manifestação clínica; e (ii), uma vez o indivíduo infectado, na definição das diferentes formas clínicas da doença (Prevedello & Mira, 2007).

A maioria das pessoas infectadas não desenvolvem a doença. Após o contato, o período de incubação pode variar de meses a 30 anos, sendo a média estimada em 4 anos para as formas tuberculóides e 10 anos para as formas lepromatosas da doença (Noordeen, 1994). Este longo período de incubação contribui para a transmissão da hanseníase, pois antes mesmo da manifestação clínica dos sintomas, o indivíduo já é um transmissor potencial (Martins, 2006).

Vários mecanismos têm sido propostos para a ligação do bacilo com as células humanas (células de Schwann) podendo ser de forma direta, entre adesinas bacterianas, antígenos micobacterianos de superfície (PGL-1 e MLLBP21 - *Mycobacterium leprae* – Laminin binding protein 21) e receptores da célula hospedeira, especialmente o componente proteico presente na lâmina basal que cobre a célula de Schwann (SC) denominado α -dístroglicano (Rambukkana, 1998; Ng et al., 2000; Scollard et al., 2006; Spencer & Brennan, 2011).

A ligação pode ser também de forma indireta, identificou-se uma glicoproteína que se liga por opsonização à superfície do *M. leprae*, a qual, por sua vez, se liga a um receptor da superfície da célula de Schwann, promovendo a penetração do bacilo no interior da célula (Rambukkana et al., 1997; Rambukkana, 1998).

A resposta imunológica ao *M. leprae* determina a evolução da infecção e, também, a forma clínica da hanseníase (Lockwood & Bryceson,

1998; Sieling & Modlin, 1994; Rodrigues & Lockwood, 2011). Os linfócitos T e macrófagos têm um papel importante na identificação e resposta aos antígenos do *M. leprae*. Esta reação é desencadeada quando os macrófagos fagocitam o *M. leprae*, passando a produzir as citocinas (Interferon gama e IL-12) que atuam sobre os linfócitos T, particularmente CD4+, ativando-os para a produção de suas próprias citocinas, como a interleucina-2 (IL-2) (Sarno & Sampaio, 1996; Modlin, 1995). Os macrófagos, os linfócitos CD4+ e as células Natural Killer produzem o INF- γ , a principal citocina responsável pelo mecanismo bactericida dentro do macrófago parasitado.

Foi demonstrado em modelos murinos de infecção intracelular, que a resposta imune é regulada pelas subpopulações de células T (Th1 e Th2), tendo função imuno-reguladora especificamente mediada por citocinas (Mosmann et al., 1986; Goulart et al., 2002).

Quando as células T produziam interleucina 2 (IL-2) e IFN- γ , perfil Th1, aumentavam a imunidade mediada por células. No entanto, quando as citocinas IL-4, IL-5 e IL-10, perfil Th2, eram produzidas, contribuíam para uma ineficácia da resposta imune celular, com falha na ativação do macrófago e aumento da resposta humoral (Goulart et al., 2002).

O balanço entre os dois padrões de resposta Th1 e Th2 determina a forma clínica da doença e sua patogênese (Goulart et al., 2002; Sieling & Modlin, 1994). A partir da liberação das citocinas (IL-2 e IFN- γ) as células Th1 aumentam a imunidade celular, ativam macrófagos, promovem auto-ativação e estimulam a expansão clonal da célula T - antígeno específico, resultando na doença menos agressiva ou cura espontânea.

Ao contrário, as células Th2 ativam a resposta humoral, produzem as interleucinas IL-4, IL-5 e IL-10, as quais inibem os macrófagos, formando as células de Virchow (Weir, 2000). A IL-4 possui papel na diferenciação e mudança de classe de imunoglobulinas de células B, bem como habilidade para estimular proliferação da resposta Th2. Como consequência, nesses indivíduos ocorreria uma infecção progressiva e o aparecimento das formas mais graves da doença (Sieling et al., 1993).

Há evidências de que os macrófagos dos doentes com a forma lepromatosa possuem uma deficiência específica na lise dos bacilos quando comparados com os macrófagos dos doentes com hanseníase tuberculóide e de indivíduos saudáveis. Experimentos com culturas de macrófagos demonstraram que componentes da estrutura do *M. leprae*, destacando-se o PGL-1, deprimiam a produção de TNF- α nas células dos indivíduos saudáveis, suprimindo a imunidade celular (Birdi & Antia, 1989; Britton, 1993; Goulart et al., 2002).

Além disso, a disfunção dos linfócitos T e macrófagos pode ser decorrente de uma anergia clonal ou supressão ativa (Modlin & Bloom, 1993; Nations et al., 1998), como também, o bacilo parece ter mecanismos para escapar da resposta imunológica do hospedeiro.

A manifestação inicial da doença pode ser a forma clínica indeterminada (I), onde a resposta do hospedeiro é insuficiente. Neste caso, pode evoluir para cura espontânea (75% dos casos) ou desenvolver a doença.

A imunidade celular, expressa na resistência à infecção pelo *M. leprae*, tem como método básico na sua avaliação o teste de Mitsuda. Apesar dos progressos nas pesquisas, o teste de Mitsuda ainda permanece como método importante na avaliação imunológica da doença (Foss, 1999; Goulart et al., 2002).

As características imunológicas das formas espectrais da hanseníase incluem pacientes tuberculóides paucibacilares caracterizados por elevada resposta imune celular (RIC) do Tipo Th1 com produção IFN- γ e baixos títulos de anticorpos. As formas lepromatosas multibacilares apresentam altos títulos de anticorpos e RIC específica baixa ou ausente (Scollard et al., 2006).

O teste cutâneo de Mitsuda é positivo em pacientes com a forma clínica tuberculóide (TT), doença localizada caracterizada por poucos bacilos e lesões limitadas, as citocinas produzidas protegem o hospedeiro da doença e contra a disseminação do bacilo (Goulart et al., 2002).

O teste de Mitsuda é negativo nos pacientes com a forma clínica lepromatosa (LL), considerada o pólo de extrema suscetibilidade ao *M. leprae*, no qual ocorre proliferação disseminada do bacilo resultando em lesões de pele difusamente distribuídas e está associada a uma potente resposta humoral sem proteção significativa (Souza, 1997; Goulart et al., 2002).

Entre as formas polares situam-se as formas instáveis da doença, com amplo espectro de manifestações clínicas denominada de borderline (Foss, 1999).

Entre as diferentes classificações existentes, a classificação de Madri (1953), considerou características clínicas da doença, aspectos bacteriológicos, histológicos e imunológicos definindo grupos polares e estáveis, tuberculóide (T) e lepromatoso (L); grupo transitório e inicial, a forma indeterminada (I); e grupo instável e intermediário, a forma borderline (B) (Sousa, 1997; Araújo, 2003). A classificação espectral proposta por Ridley - Jopling (1966), levou em consideração os critérios já descritos, adotando subgrupos espectrais, tuberculóide-tuberculóide (TT), borderline-tuberculóide (BT), borderline-bordeline (BB), borderline-lepromatoso (BL) e lepromatoso-lepromatoso (LL).

O critério de classificação operacional (CO) recomendado pela Organização Mundial de Saúde (2000) para fins de terapêutica, levou em consideração o número de lesões cutâneas e se disponível, o resultado da baciloscopia do esfregaço de raspado intradérmico. Pacientes com até cinco lesões são classificados como paucibacilares (PB) e pacientes que apresentem seis ou mais lesões, são classificados como multibacilares (MB) (WHO, 1994; WHO, 1997).

Na Tabela 1, mostramos a correlação entre a classificação de Madri e a classificação de Ridley-Jopling e Operacional.

TABELA 01 - Correlação entre a classificação de Madri e a de Ridley & Jopling e da OMS.

MADRI	Indeterminada	Tuberculóide	Boderline	Virchoviana
Ridley & Jopling	TT		BT* BB BL	LL
OMS	PAUCIBACILARES		MULTIBACILARES	

TT: Tuberculóide-tuberculóide; ***BT:** Borderline-tuberculóide, embora apresente características da forma paucibacilar, operacionalmente tem sido classificada como multibacilar; **BB:** Borderline-borderline; Borderline-lepromatoso e **LL:** Lepromatoso-lepromatoso

4. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico precoce e a introdução do tratamento específico são importantes para reduzir as fontes de transmissão e para prevenir doença grave com incapacitação.

O diagnóstico da hanseníase é clínico e está baseado na identificação de alguns dos três sinais cardinais, hipopigmentação ou manchas avermelhadas com alteração de sensibilidade, espessamento de nervos periféricos e encontro de BAAR (bacilos álcool ácido resistentes) em esfregaços de raspados intradérmicos (baciloscopia) e/ou biópsias de lesões de pele (Brasil, 1994; Sousa, 1997; WHO, 1998).

O exame histopatológico das lesões e a determinação do índice bacteriológico auxiliam na definição da forma clínica dentro do espectro da doença. Entretanto, esses testes não fazem parte da rotina nos serviços de saúde pública e não são incluídos nos programas de controle de hanseníase em países endêmicos (Stefani, 2008).

4.1 Métodos de detecção e identificação de *M. leprae*

4.1.1 Baciloscopia e Histopatológico

A baciloscopia avalia a quantidade dos bacilos vivos e mortos nos esfregaços de lesões cutâneas corados pelo método de Ziehl-Neelsen. O sistema mais completo é a escala logarítmica de Ridley, constituindo a média dos índices dos esfregaços (Ridley & Jopling, 1966; WHO, 2002). O resultado do índice baciloscópico (IB) é representado da seguinte forma:

IB = 0: não ha bacilos em nenhum dos 100 campos examinados

IB = (1+): um a dez bacilos, em 100 campos examinados

IB = (2+): um a dez bacilos, em dez campos examinados (11 – 99 bacilos em 100 campos)

IB = (3+): dez bacilos, em media, em cada campo examinado

IB = (4+): 100 bacilos, em media, em cada campo examinado

IB = (5+): 1000 bacilos, em media, em cada campo examinado

IB = (6+): mais de 1000 bacilos, em media, em cada campo examinado.

A pesquisa de bacilos álcool ácido resistentes no esfregaço de raspado intradérmico apresenta alta especificidade, mas a sensibilidade pode variar de 40 a 70%, em pacientes com baixa carga bacilar. Embora seja uma técnica relativamente simples e de fácil execução, está relacionada a inúmeras dificuldades operacionais e baixa confiabilidade, tais como:

profundidade do corte, quantidade do tecido removido, tamanho e espessura do esfregaço (Opromolla, 2000; Summary of the Report of The International Leprosy Association Technical Forum, 2002; Britton & Lockwood, 2004).

O exame histopatológico de lesão de pele pode auxiliar o diagnóstico (especialmente quando é evidenciada agressão neural), classificação das formas clínicas e na caracterização dos fenômenos reacionais (Sampaio & Rivitti, 2002; Stefani, 2008).

Algumas pesquisas realizadas em diversos países mostraram a concordância variando de 29,7 - 89,0% entre o diagnóstico clínico e o critério histopatológico baseado em Ridley-Jopling (Sehgal et al., 1977; Dubey et al., 1981; Jerath & Desai, 1982; Mcdougall et al., 1987; Bathia et al., 1993; Kumar et al., 1996; Job et al., 1997; Singh et al., 2000; Moorthy et al., 2001; Teixeira et al., 2005).

No entanto, o exame histopatológico, apresenta algumas limitações, uma vez que nem sempre indica a presença do bacilo em pacientes com sintomatologia característica, além do mais, biópsias realizadas em margens opostas da mesma lesão, ou mesmo de lesões diferentes, apresentam discrepâncias morfológicas. Desta forma, não é considerado padrão-ouro (Hardas & Lele, 1981; Cree et al., 1988; Moschella, 2004).

4.1.2 Biologia Molecular

As metodologias tradicionais, baciloscopia e histopatologia, apresentam dificuldade em detectar bacilos álcool ácidos resistentes nos

estágios iniciais da hanseníase e a descoberta de seqüências espécie-específicas no genoma de *Mycobacterium leprae* introduziu os testes baseados em DNA e RNA como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Esta técnica tem sido usada com sucesso para detectar pequenas quantidades de bacilos em tecidos (Donoghue et al., 2001), quantificação e determinação da viabilidade do bacilo em sítios específicos por meio da detecção de DNA ou RNA, fornecendo importante informação sobre a infecção e transmissão de *M. leprae*, efetividade da PQT, como também na atividade transcricional do bacilo (RNA) (Chae et al., 2002; Bezerra, et al., 2006).

As variações na sensibilidade da PCR ocorrem em consequência dos diferentes iniciadores, tamanhos de fragmentos amplificados e técnicas de amplificação utilizadas (Donoghue et al., 2001; Kang et al., 2003; Williams et al., 2003; Groathouse et al., 2006; Martinez et al., 2006; Phetsuksiri et al., 2006; Goulart et al., 2007).

Alguns relatos têm demonstrado boas perspectivas em relação a detecção de *M. leprae* por PCR em diferentes amostras (pele, sangue, nervos, swabs bucal e nasal) de pacientes com hanseníase e seus contactantes (de Wit et al., 1991; de Wit et al., 1993; Rafi et al., 1994; Donoghue et al., 2001; Torres et al., 2003; Patrocínio et al., 2005; Bezerra et al., 2006). A tecnologia da PCR trouxe um grande avanço na detecção de *M. leprae*, no entanto, sua sensibilidade é limitada quando a amostra clínica colhida possui de 1 a 5 bacilos (Ramaprasad et al., 1997).

Várias regiões-alvo têm sido usadas para amplificação e, a sensibilidade da reação da PCR para *M. leprae* em pacientes com formas paucibacilares tem aumentado, mas ainda possui grande variação (40 a 80%) (Donoghue et al., 2001; Goulart et al., 2007; Stefani, 2008).

A técnica de nested PCR aplicada em amostras de biópsias de tecido humano e animal, apresentou limite de detecção de 3 fg de DNA genômico de *M. leprae*. Embora realizada em um curto período de tempo, deve ser avaliada com cautela, uma vez que a contaminação nesta metodologia é frequente (Plikaytis et al., 1990).

Em amostras clínicas de pacientes que possuíam resultado de histopatológico negativo, a PCR em tempo real sistema TaqMan apresentou melhor sensibilidade na detecção de DNA do *M. leprae* que a PCR convencional (Martinez et al., 2006). Entre os marcadores nucleicos utilizados na metodologia da PCR em tempo real, três têm apresentado resultados significantes, como RLEP3, 85-B e 16S rRNA (Goulart & Goulart, 2008).

Abordagens que incluem a amplificação de seqüências gênicas específicas de *M. leprae* através da PCR têm sido igualmente empregadas como suporte para o diagnóstico da forma neural pura da hanseníase (Dayal et al., 2005; Bezerra da Cunha et al., 2006). Entretanto, o alto custo e a sofisticada tecnologia, são entraves para sua incorporação no diagnóstico de rotina na hanseníase, permanecendo ainda como importante instrumento de pesquisa para auxiliar a compreender a epidemiologia da doença (Martins, 2006).

4.2 Métodos Imunológicos

4.2.1 Pesquisa de anticorpos

Os primeiros testes sorológicos para pesquisa de anticorpos na hanseníase foram realizados utilizando-se preparações com antígenos brutos e de outras micobactérias. Vários testes foram padronizados, como, fixação de complemento, hemaglutinação, radioimunoensaio e ensaio imunoenzimático (Melson, 1983; Daniel & Debanne, 1987). Embora esses testes não fossem específicos, eles possibilitaram estudo da infecção em pacientes com hanseníase.

Esses testes apresentavam baixa sensibilidade, elevada reação cruzada e disponibilidade limitada dos antígenos restringindo o uso desses ensaios a pequenos estudos epidemiológicos, prevalência de infecção e transmissão da doença (Cho et al. 1984; Fujiwara et al., 1984).

Hunter & Brennan (1981), após a utilização de antígenos sonificados de *M. leprae*, iniciaram a identificação e purificação de antígenos específicos e em 1981, descobriram o glicolípido fenólico 1 (PGL-1).

A infecção experimental em tatus possibilitou estudos que visavam à identificação de antígenos espécie-específicos de *M. leprae* e até os dias atuais, tem sido a fonte de antígenos para pesquisas, vacinas e realização de testes cutâneos.

Desde a identificação do PGL-I nativo, novos neoglicolípideos foram produzidos, como o monossacarídeo-octil-BSA (M-O-BSA), dissacarídeo-

BSA (D-BSA) (Gigg et al., 1985), dissacarídeo natural-octil-BSA (ND-O-BSA) (Chatterjee et al., 1986), trissacarídeo natural-fenol-BSA (NT-P-BSA) e o dissacarídeo natural-octil-HSA (ND-O-HSA) (Fujiwara et al., 1987).

Nesses trabalhos, os anticorpos IgM estiveram relacionados às formas clínicas e atividade da doença (Brennan & Barrow, 1980; Oskam et al., 2003). Também foi verificada queda dos antígenos PGL-I circulantes (Cho et al., 2001) e dos anticorpos anti-PGL-I após início da terapêutica (Douglas et al., 2004; Bühner-Sékula, 2008).

Com base no PGL-I nativo e seus derivados semi-sintéticos, vários ensaios sorológicos foram desenvolvidos (ELISA, hemaglutinação passiva, aglutinação de partícula de gelatina e testes rápidos – MLFlow e ML-ICA) para detectar a presença de anticorpos das classes IgM, IgG e IgA. No entanto, na sua maioria esses testes são aplicáveis às formas multibacilares com soropositividade de 80 a 100%, tendo pouca relevância para aqueles com as formas paucibacilares e formas indeterminadas com soropositividade de 30 a 60% (Bühner et al., 1998; Oskam et al., 2003; Goulart & Goulart, 2008; Parkash et al., 2008; Stefani, 2008; Spencer et al., 2011).

Os testes anti-PGL-I têm sido úteis como indicadores prognósticos em contatos de pacientes multibacilares, sendo estimado que aqueles que possuem sorologia positiva possuem até 8 vezes mais risco de desenvolver sintomas clínicos em comparação à aqueles com sorologia negativa (Moet et al., 2004; Goulart et al., 2008).

Os estudos sorológicos, pós-genômicos, procuraram identificar proteínas específicas ou peptídeos sintéticos de *M. leprae* que possam de

forma isolada ou associada ao PGL-1, aumentar a especificidade e especialmente a sensibilidade nas formas paucibacilares. Na Tabela 2 apresentamos um resumo dos ensaios imunoenzimáticos que avaliaram diversos antígenos para a pesquisa de diferentes classes de imunoglobulinas.

TABELA 2 – Resumo da detecção de imunoglobulinas em pacientes com hanseníase frente a diferentes antígenos, por ensaios imunoenzimáticos.

Gene/ Antígenos	EIE	Classe de Ig	Referências
Gene ML0008, ML0126, ML1057 e ML2567	ELISA	IgG	Spencer et al., 2005
Gene ML 0050/ML 0049, ML 0091, ML 0317, ML 0405, ML 0568, ML1213, ML 2028, ML 2055, ML 2655, ML 0097, ML1812, ML 2331, ML 2496	BLOT	IgG	Reece et al., 2006
Glicolípido Sintético (NDOHSA)		IgM	
Genes ML 0091 (23.7kDa), ML 0405 (25.3kDa), ML 1633 (57kDa), ML 2055 (29.5kDa), ML 2331 (26.5 kDa), ML 2346 (33.9kDa), ML 1556 (96.6kDa)	ELISA	IgG	Duthie et al, 2007
Glicolípido Sintético (NDO-BSA)		IgM	
144 proteínas recombinantes investigadas, entre elas, os genes ML0405, ML2331	ELISA	IgG	Duthie et al., 2008
Fusão de proteínas ML0050-0049 (ESAT-6 and CFP10), LID-1 (fusão ML0405 e ML 2331)	Testes rápidos (DPP e FL)		
Glicolípido Sintético (NDO-BSA)		IgM	
Gene ML0022, ML0051, ML0098, ML0176, ML0276, ML0393, ML0405, ML0489, ML0491, ML0540, ML0810, ML0811, ML0840, ML1383, ML1556, ML1632, ML1181, ML1481, ML1633, ML1685, ML2028, ML2044, ML2055, ML2203, ML2331, ML2346, ML2358, ML2380, ML2541, ML2603, ML2629, ML2655 e ML2659	ELISA	IgG	Sampaio et al., 2011
Fusão de proteínas recombinantes (LID-1)		IgM	
Glicolípido Sintético (NDO-BSA)			
Gene ML1877 (43.7kDa), ML0841 (35kDa), ML2028 - Ag85B (34.8kDa), ML2038 (18.2kDa), ML0050 - CFP-10 (10.9kDa), ML0380 – GroES (10.8kDa)	ELISA	IgG	Spencer et al., 2011
Antígenos solúveis do <i>M. leprae</i> -MLSA	BLOT	IgM	
LAM		Ig total	
Glicolípido Sintético (NDO-BSA)			
Antígeno 45kDa, ESAT-6 (ML 0049) e CFP-10 (ML 0050)	ELISA	IgG	Parkash, 2011
PGL-I		IgM	
Glicolípido Fenólico 1 (PGL-I)	ELISA	IgM	Lobato, et al., 2011
Glicolípido Fenólico sintético (ND-O-HSA)	Teste rápido (ML FLOW)		

EIE: Ensaio imunoenzimático; **FL:** fluxo lateral, teste rápido utilizando o glicolípido sintético NT-P-BSA; **DPP:** teste rápido utilizando dois antígenos (glicolípido sintético NT-P-BSA e LID-1).

Além das pesquisas de anticorpos (ELISA e testes imunocromatográficos) para o diagnóstico da hanseníase, a tecnologia de microarranjos tem sido outra estratégia na identificação de antígenos recombinantes ou isolados da parede celular ou da membrana de *M. leprae*, mostrando que existem diferentes padrões na resposta imune humoral entre pacientes tuberculóides e lepromatosos (Groathouse et al., 2006).

Os diferentes padrões sorológicos observados entre os pacientes com hanseníase podem estar relacionados a diferenças no HLA (Prevedello & Mira, 2007), ou em diferenças antigênicas entre cepas do *M. leprae* (Stefani, 2008).

4.2.2 Teste de Mitsuda

O teste de intradermoreação de Mitsuda (1919) baseia-se na resposta imunológica do indivíduo por reação de hipersensibilidade tardia, de alta especificidade, frente ao *M. leprae*, inoculado por via intradérmica, com desenvolvimento de resposta celular após 4 semanas. É um teste auxiliar na classificação de pacientes portadores de hanseníase dos grupos indeterminados e boderlines. O seu valor é prognóstico e não diagnóstico.

O teste é considerado positivo quando houver uma lesão granulomatosa igual ou maior que 5 mm (Mitsuda, 1919; Gaylord & Brenann, 1987).

Atualmente o teste de Mitsuda não é recomendado para aplicação rotineira nos serviços de diagnóstico, uma vez que o resultado positivo

evidencia o amadurecimento do sistema imunológico celular após o estímulo de *M. leprae*, como também por outras micobactérias, representando a capacidade de defesa do hospedeiro (Opromolla, 2000; Talhari et al., 2006).

4.2.3 Detecção e Quantificação de Interferon gama (IFN- γ)

A resposta imune celular para *M. leprae* tem sido avaliada por testes *in vitro* com células T, baseados na sua estimulação com antígenos específicos e produção da citocina IFN- γ . Antígenos recombinantes, como, GroES (10kDa), 18kDa, 35kDa, 45 kDa, hsp65, 70kDa e complexo 85 (30/31kDa) foram avaliados, no entanto, apresentaram limitações quanto a reatividade cruzada com outras micobactérias, principalmente quando foram aplicados em regiões que possuem em sua rotina a vacinação com BCG, grande exposição a micobactérias ambientais e áreas endêmicas de tuberculose (Stefani, 2008; Spencer et al., 2011).

A exemplo do que ocorreu com na tuberculose, os antígenos CFP-10, ESAT-6 e Tb.7.7 também foram avaliados no diagnóstico de pacientes com hanseníase, apresentando limitação quando aplicados em áreas de alta endemicidade de tuberculose (Spencer et al., 2002; Geluk et al., 2002; Geluk et al., 2004; Ferrara et al., 2006; Pai et al., 2006).

Análises genômicas comparativas entre micobactérias *in silico*, empregando-se ferramentas de bioinformática, identificou genes/proteínas específicas do *M. leprae* (Geluk, et al., 2005; Spencer et al., 2005; Geluk et al., 2008).

Em resumo, existe uma limitação na utilização do IGRAs (“Interferon-Gamma Release Assays”) para o diagnóstico da hanseníase, por ter sido observada produção de IFN- γ em contatos de pacientes com hanseníase e controles de áreas endêmicas (Geluk et al., 2009; Sampaio et al., 2011). Como maioria dos contactantes não evoluíram para a doença, a utilidade do teste para fins de prognóstico também permanece questionada.

5. JUSTIFICATIVA

Apesar dos avanços científicos observados nos últimos anos no campo da patologia clínica e medicina laboratorial, o diagnóstico laboratorial da hanseníase continua sendo feito por procedimentos e métodos pouco sensíveis e pouco específicos.

Para alcançarmos as metas propostas pela OMS é necessário que novas ferramentas diagnósticas sejam postas em prática. O diagnóstico precoce do doente e a instituição rápida de terapêutica específica são fundamentais para o controle da doença com vista a sua possível erradicação.

Nos últimos anos tivemos um progresso relativo no diagnóstico sorológico da hanseníase com a introdução de novos antígenos naturais, sintéticos e recombinantes. Os resultados apresentados na literatura, embora promissores, ainda não permitem concluir sobre a diferenciação laboratorial das formas clínicas da hanseníase associada às evidências clínicas, nem tão pouco melhorar o desempenho dos testes nas fases iniciais da doença.

Neste estudo mesmo não fazendo parte do grupo do IDEAL Consortium, procuramos atender os objetivos propostos em 2003 e ratificado em 2010, avaliando o desempenho diagnóstico dos antígenos LID-1 (“Leprosy IDRI Diagnostic – 1”) para pesquisa de anticorpos IgG e glicolípídeo sintético ND-O-BSA para pesquisa de anticorpos totais por

ELISA em amostras de soros de pacientes com diferentes formas clínicas da doença, contactantes de pacientes com hanseníase e grupo controle de indivíduos residentes em áreas endêmicas e não endêmicas.

Também procuramos por Western Blotting (WB), baseados na experiência acumulada do laboratório, identificar marcadores imunológicos com potencial de diagnóstico e prognóstico da hanseníase, utilizando o extrato antigênico de *M. leprae*.

OBJETIVOS

GERAL

Verificar o desempenho de diferentes antígenos de *M. leprae* na detecção de anticorpos específicos, por testes imunoenzimáticos, em amostras de soros de pacientes com diferentes formas clínicas da hanseníase.

ESPECÍFICOS

1. Avaliar a sensibilidade, especificidade e valores preditivos do ELISA –LID-1 e ELISA – NDO BSA nos diferentes grupos estudados;
2. Associar os resultados entre os ELISA, com baciloscopia e teste intradérmico de Mitsuda;
3. Aplicar o método de Western Blotting (WB) com antígeno sonificado de *M. leprae*, para pesquisa de anticorpos IgG, identificando potenciais marcadores imunológicos para fins de diagnóstico e prognóstico;

MÉTODOS

1. CASUÍSTICA

Grupo I: Pacientes com hanseníase (N=61)

Durante o período de dezembro de 2009 à dezembro de 2010 foram colhidas amostras de sangue de pacientes com hanseníase independente da idade, sexo e grupo étnico, atendidos no Centro de Dermatologia Sanitária de Imperatriz - MA. Todas as amostras de soros foram colhidas antes do início da terapêutica específica.

Os pacientes foram diagnosticados por exames clínicos-dermatológicos e testes laboratoriais, pesquisa de bacilos álcool ácido resistentes (BAAR) em esfregaço de raspado intradérmico e/ou biópsias de lesões de pele e teste de Mitsuda, quando disponível. Os pacientes foram classificados em: Indeterminados (8), tuberculóide-tuberculóide (11), borderline-tuberculóide (15), borderline-boderline (5), borderline-lepromatosa (10), lepromatosa-lepromatosa (12). O número de lesões e o índice baciloscópico (IB) do esfregaço de raspado intradérmico foram usados para determinar a classificação operacional (CO), paucibacilares (28) e multibacilares (33).

Na tabela 03 apresentamos a distribuição dos pacientes por critérios de classificação espectral da doença e classificação operacional proposta em 1982 e recomendada pela OMS em 2000 (WHO, 1982; Norman et al., 2004).

TABELA 03 – Distribuição dos pacientes com hanseníase segundo critérios de classificação da doença

Classificação espectral da hanseníase	Classificação Operacional	N
Lepromatoso - Lepromatoso (LL)	MB	12
Boderline - Lepromatoso (BL)	MB	10
Boderline - Boderline (BB)	MB	05
Boderline -Tuberculóide (BT)	MB	06
Boderline -Tuberculóide (BT)	PB	09
Tuberculóide -Tuberculóide (TT)	PB	11
Indeterminado (I)	PB	08
TOTAL		61

A idade média dos pacientes foi de 40 anos (mínima de 8 anos e máxima de 90 anos) , sendo 41 pacientes do sexo masculino e 20 do sexo feminino. Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes são apresentados no Anexo A.

GRUPO II: Contactantes (N=30)

Foram colhidas 30 amostras de sangue de indivíduos que entraram em contato com pacientes com hanseníase não tratada e, diagnosticados no Centro de Dermatologia Sanitária de Imperatriz – MA. Foram considerados contactantes, aqueles que residiram com o paciente nos últimos cinco anos.

GRUPO III: Pacientes com tuberculose pulmonar (N=20)

Foram utilizadas 20 amostras de soros de pacientes com tuberculose pulmonar ativa, armazenadas no Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

Grupo IV: Grupo Controle

Indivíduos residentes de área não endêmica (RANE=21)

Foram utilizadas 21 amostras de soros de indivíduos do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, que informaram não terem contato com pacientes com hanseníase, sejam eles parentes ou não, e que não apresentavam no momento da inclusão no estudo, qualquer sintoma clínico da doença.

Indivíduos residentes de área endêmica (RAE=30)

Foram colhidas 30 amostras de sangue de voluntários da Universidade Federal do Maranhão - UFMA, que informaram não terem tido contato com pacientes com hanseníase, sejam eles parentes ou não, e que não apresentavam no momento da inclusão no estudo, qualquer sintoma clínico da doença.

2. ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

Todos os indivíduos incluídos no estudo foram informados sobre os aspectos científicos da pesquisa de forma clara e simples e da necessidade de se colher sangue por punção intravenosa.

Também foi assegurado que se algum indivíduo se recusasse a participar do estudo, não seria discriminado dentro da Instituição de Saúde e que todas as informações obtidas serviriam apenas ao propósito da pesquisa, sendo confidenciais.

As amostras de sangue foram colhidas dos indivíduos somente após assinatura do termo de consentimento (Apêndice). O estudo foi aprovado pelo Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e Comissões de Ética do Hospital das Clínicas de São Paulo (HC-SP) - CAPPesq, sob protocolo 0361/10.

3. TESTE IMUNOENZIMÁTICO ELISA

3.1 Antígenos

- **Antígeno Recombinante LID-1:** foi gentilmente cedido pelo Dr. Steven G. Reed, IDRI (Infectious Disease Research Institute). A metodologia descrita para obtenção desse antígeno foi descrita por Duthie et al., 2007.

- **Antígeno Dissacarídeo Natural-Octil-BSA (ND-O-BSA):** foi gentilmente cedido pelo Dr. John Spencer, Universidade do Estado do Colorado. A porção dissacarídica do PGL-I (determinante antigênico) foi sintetizada e conjugada à soro albumina bovina (BSA) por um ligante, radical octil (O) gerando o PGL sintético denominado de ND-O-BSA. A metodologia descrita para obtenção desse antígeno foi descrita por Zhang et al., 2010.

3.2 Fase Sólida

Foram utilizadas placas de poliestireno de fundo plano (Nunc – DENMARK), sensibilizadas com 100µl/cavidade do antígeno recombinante LID-1 (1µg/ml) e ND-O-BSA (0,5 e 2µg/ml) diluídos em tampão carbonato/bicarbonato 0.06M pH 9.6 incubadas por 2 horas a 37°C e em seguida por 18 horas a 4°C. A solução antigênica foi retirada por inversão das placas e 200µl da solução bloqueadora foi adicionada em cada cavidade. Seguiu-se nova incubação de 2 horas a 37°C. Posteriormente, as placas foram lavadas por 3 vezes com PBS – Tween 20 0.05% seguidas de duas lavagens com água destilada. As placas foram colocadas em estufa 37°C por 4 horas para secar. Em seguida, acondicionadas individualmente em embalagens de alumínio com agente dessecante, seladas e mantidas a 4°C até o momento do uso.

3.2.1 Teste Imunoenzimático ELISA com antígeno Recombinante LID-1

Variáveis do teste imunoenzimático com antígeno recombinante LID-1 para pesquisa de anticorpos IgG anti - *M. leprae* foram baseadas em estudos prévios realizados em nosso laboratório para outros sistemas ELISA e em artigos científicos (Reece et al., 2006; Duthie et al., 2007). No quadro 1 apresentamos as variações estudadas (Protocolo A e B).

QUADRO 1 – Variáveis técnicas utilizadas na padronização do ELISA com antígeno recombinante LID-1 para pesquisa de anticorpos IgG anti-*M.leprae*

Variáveis	Protocolo A	Protocolo B
Suporte Sólido	Placas Polysorp	Placas Polysorp
Concentração Antigênica	1µg/mL	1µg/mL
Solução de Bloqueio	Solução de BSA 1% em PBS-Tw20	Solução de leite desnatado 5% em PBS
Diluição dos soros	1/100	1/100
Diluyente de Amostra	Solução de BSA 1% em PBS-Tw20	Solução de leite desnatado 5% em PBS
Tempo de Incubação das amostras de soros	45 minutos a 37°C	45 minutos a 37°C
Diluição do Conjugado Enzimático	1/10.000	1/10.000
Tempo de Incubação com conjugado Enzimático	45 minutos a 37°C	45 minutos a 37°C
Lavagens das placas	5 vezes com PBS-Tw20 0,05%	5 vezes com PBS-Tw20 0,05%
Solução Cromógena e Tempo para Revelação	Tetrametilbenzidina – TMB/H ₂ O ₂ por 15 minutos em TA	Tetrametilbenzidina – TMB/H ₂ O ₂ por 15 minutos em TA
Bloqueio da Reação	H ₂ SO ₄ 2N	H ₂ SO ₄ 2N
Leitura da Reação	450nm	450nm

3.2.2 Teste Imunoenzimático ELISA com antígeno Dissacarídeo Natural-Octil-BSA (ND-O-BSA)

Para padronização do teste imunoenzimático com antígeno glicolípido sintético para pesquisa de anticorpos totais anti-*M. leprae* foram estudadas as variáveis como, concentração antigênica para a sensibilização, diluente e diluição das amostras de soros, baseadas em metodologias descritas nos artigos científicos pertinentes (Duthie et al., 2007; Spencer et al., 2011). No quadro 2 estão definidas as variáveis dos dois protocolos propostos (Protocolo A e B).

QUADRO 2 – Variáveis técnicas utilizadas na padronização do ELISA com antígeno sintético ND-O-BSA para pesquisa de anticorpos Ig total anti-*M. leprae*

Variáveis	Protocolo A	Protocolo B
Suporte Sólido	Placas Maxisorp	Placas Maxisorp
Concentração Antigênica	2µg/ml	0,5 µg/ml
Solução de Bloqueio	Solução de BSA 1% em PBS – Tw20	Solução de BSA 1% em PBS – Tw20
Diluição dos soros	1/50	1/200
Diluyente de Amostra	Leite desnatado 2% em PBS-Tw20 0,05%	Solução de BSA 1% em PBS-Tw20
Tempo de Incubação das amostras de soros	2 horas a TA	2 horas a TA
Diluição do Conjugado Enzimático	1/5000	1/5000
Tempo de Incubação com conjugado Enzimático	2 horas a TA	2 horas a TA
Lavagens das placas	5 vezes com PBS-Tw20 0,05%	5 vezes com PBS-Tw20 0,05%
Solução Cromógena e Tempo para Revelação	Tetrametilbenzidina – TMB/H ₂ O ₂ por 15 minutos em TA	Tetrametilbenzidina – TMB/H ₂ O ₂ por 15 minutos em TA
Bloqueio da Reação	H ₂ SO ₄ 2N	H ₂ SO ₄ 2N
Leitura da Reação	450nm	450nm

3.3 DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG anti - *M. leprae* PARA O ANTÍGENO RECOMBINANTE LID-1

As placas de poliestireno Polysorp NUNC sensibilizadas com a concentração adequada do antígeno recombinante LID-1 foram incubadas com 100µl de amostras de soros diluídos a 1/100. Após incubação por 45 minutos a 37°C em câmara úmida as amostras de soros foram retiradas e as placas lavadas por cinco vezes com PBS – Tw 20 0,05%. O conjugado enzimático, anti – IgG - peroxidase, foi adicionado (100µl/cavidade) na diluição de 1/10.000. O título do conjugado foi baseado em estudos anteriores realizados em nosso laboratório. Após incubação de 45 minutos a 37°C em câmara úmida, um novo ciclo de lavagens foi realizado. Em seguida foi adicionado 100µl/cavidade da solução cromogênica TMB/H₂O₂, incubando-se a placa por 15 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A reação enzimática foi interrompida com a adição de 50µl de ácido sulfúrico 2N e a leitura realizada em 450nm em leitor de placas Titertek Multiskan MMC/340.

3.4 DETECÇÃO DE ANTICORPOS TOTAIS anti - *M. leprae* PARA O ANTÍGENO ND-O- BSA

As placas de poliestireno Maxisorp NUNC sensibilizadas com ND-O-BSA foram incubadas com 100µl de soro diluídos a 1/50 e 1/200. Após

incubação por 2 horas em temperatura ambiente em câmara úmida, as amostras de soros foram descartadas por inversão das placas e após lavagens por cinco vezes com PBS-Tween 20 0,05%, foi adicionado o conjugado enzimático anti-Ig total (100µl/cavidade) nas diluições de 1/1.000 e 1/5000. Após incubação por 2 horas em temperatura ambiente em câmara úmida, novo ciclo de lavagens foi realizado. Em seguida foram adicionados 100µl/cavidade da solução cromogênica de TMB/H₂O₂. As placas foram incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A reação enzimática foi interrompida com a adição de 50µl de ácido sulfúrico 2N e a leitura realizada em 450nm em leitor de placas Titertek Multiskan MMC/340.

4. WESTERN BLOTTING

4.1 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRIAMIDA (SDS-PAGE) E WESTERN BLOTTING

4.1.1 Antígeno

O extrato antigênico de *M. leprae* foi obtido a partir de tatus infectados experimentalmente e criados em cativeiro, foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. John Spencer, Universidade do Estado do Colorado.

4.1.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS - PAGE)

As frações protéicas do extrato antigênico de *M. leprae*, foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), como descrito por Laemmli (1970). O extrato antigênico foi estudado nas concentrações de 5µg, 3 µ e 2µg por milímetro de gel, diluído em tampão de amostra 5X concentrado (Tris-HCl 0,5 M pH6,8; SDS 1%, glicerol 10%; 2-mercaptoetanol 14,4mM e azul de bromofenol 0,01% como indicador final de corrida) e fervido a 100°C por 5 minutos, imediatamente antes da aplicação no gel. O extrato antigênico foi aplicado inicialmente no gel utilizando-se um molde com cavidades múltiplas de 5 milímetros com espaçador de 1 milímetro. Após a definição da concentração do extrato antigênico, passamos a utilizar pente preparatório de 80 mm de largura por 0,7 mm de espessura.

O gel de poliacrilamida de separação foi preparado com acrilamida/bisacrilamida na concentração final de 15%, Tris-HCl 1,5M pH 8,8 e o gel de empilhamento com acrilamida/bisacrilamida na concentração final de 5% Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, ambos contendo 0,1% de SDS. A eletroforese foi realizada em tampão de corrida (solução de Tris 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1%) aparelho Mini-Protean III® (Bio-Rad), inicialmente a 60 volts até o empilhamento do extrato antigênico no início do gel de separação, por aproximadamente 30 minutos. Após este período, a voltagem foi aumentada e mantida em 120 Volts até o final da corrida, quando o corante indicador atingiu o final do gel de separação.

O padrão de massa molecular utilizado foi o Novex[®] Sharp Standard (Invitrogen Technology, nº LC5800), pré-corado, compreendendo proteínas entre 3,5 a 260 kDa. As massas moleculares e cores foram definidas pelo fabricante.

4.1.3 Coloração do gel de poliacrilamida pelo Comassie Blue

Para verificação da separação protéica do extrato antigênico de *M. leprae* após corrida eletroforética, o gel foi colocado em um recipiente plástico sob agitação constante e adicionou-se solução corante à base de Comassie Brilliant Blue. Em seguida, retirou-se o corante e acrescentou-se a solução descorante. Para remoção do excesso de corante, o gel foi lavado com água destilada sob agitação constante.

4.1.4 Transferência para membrana de nitrocelulose

As frações protéicas separadas no gel de poliacrilamida foram transferidas por eletrofores para membrana de nitrocelulose de 0,45 µm (Bio Rad nº162 - 0115n) segundo técnica descrita por Towbin, et al., 1979. A transferência úmida foi realizada por 18 horas a 20 volts, em aparelho Mini Protean III[®] (Bio-Rad).

Após a transferência as membranas foram bloqueadas por 15 minutos, à temperatura ambiente, com solução de leite desnatado 5% em PBS 0,01 M

pH 7,2 acrescido de Tw 20 a 0,05% (PBS-Tw). Em seguida, colocadas para secar, entre folhas de papel toalha, por 12 horas. Posteriormente, foram cortadas em fitas de 4 mm, numeradas e armazenadas em tubos de vidro com agente dessecante a 4 °C, até sua utilização nos testes.

4.1.5 Tempo de incubação das amostras de soros

As fitas contendo as frações protéicas de *M. leprae* foram incubadas, inicialmente com soro reagente e não reagente, diluídos a 1/50 em PBS-Tw20 0,05% contendo leite desnatado 0,5%, em por 2 horas em temperatura ambiente e 18 horas a 4°C, sob agitação constante.

4.1.6 Western Blotting

Fitas de nitrocelulose foram incubadas separadamente com soros reagentes e não reagentes, para anticorpos anti - *M. leprae*, diluídos a 1/50 em PBS-Tw20 contendo leite desnatado 0,5%, por 18 horas a 4°C. Após a incubação, as fitas foram lavadas com PBS-Tw20 por seis vezes por cinco minutos cada. Para a detecção dos anticorpos, foi adicionado conjugado enzimático anti-IgG humana-peroxidase, diluído a 1/500 no mesmo diluente do soro e incubado por duas horas a temperatura ambiente. Novo ciclo de lavagem com PBS-Tw20 foi realizado e a reação foi revelada com solução cromogênica composta de 3 mg de 4-cloro- α -naftol (Sigma Chemical C., St. Louis, MO, USA), em 10 mL de metanol. Para cada 2 mL da solução

cromógena acrescentou-se 10 mL de PBS e 4 µL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2 30 volumes). Após 15 minutos ao abrigo da luz, as fitas foram lavadas com água destilada. Todas as incubações foram realizadas sob agitação constante. As fitas foram colocadas para secar ao abrigo da luz e analisadas conforme o perfil imunológico de reatividade para as diferentes frações protéicas. A massa molecular das frações protéicas foi estimada levando-se em consideração o padrão de massa molecular utilizado.

5. “RECEIVER OPERATING CHARACTERISTIC CURVE” (CURVA ROC)

Os diferentes pontos de corte (cut-off) onde são discriminados os indivíduos doentes dos não doentes resultam em diferentes índices de sensibilidade e especificidade de um teste.

A curva ROC é construída a partir dos diferentes pontos de corte de um teste. Para cada ponto de decisão é colocada no eixo das ordenadas à taxa de verdadeiros positivos (sensibilidade) e no eixo das abscissas à taxa de falsos positivos ($1 - \text{especificidade}$). A curva ROC permite o estudo do ponto de corte ideal para obterem-se os melhores índices de sensibilidade e especificidade de um teste, pois visa a melhor definição da região onde existe sobreposição de dados quando são colocados em gráficos os resultados obtidos de amostras de indivíduos doentes e sadios (Metz, 1978; Zwerg & Campbell, 1993).

O critério de decisão para a curva ROC varia entre 0 a 100%. Estes valores são resultantes do cálculo da área sob a curva.

Na tabela 04 apresentamos a interpretação do teste de acordo com a área da curva ROC.

TABELA 04 – Interpretação do teste de acordo com a área sob a curva ROC

Área sob a curva ROC (%)	Interpretação do teste
90 – 100	Excelente
80 – 90	Muito bom
70 – 80	Bom
60 – 70	Regular
50	Ruim

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística será realizada utilizando os programas Sigma Stat (Jandel Scientific) versão 1.0 e Prisma versão 5.0. Os níveis de significância dos testes serão fixados aceitando um erro tipo 1 de 5% ($\alpha = 0,05$). A correlação entre índice baciloscópico e densidade ópticas obtidas no ELISA foram feitas pelo método de Pearson e a análise estatística dos resultados obtidos no ELISA ND-O-BSA e LID-1 e o teste de Mitsuda foram feitas pelo método de McNemar's.

RESULTADOS

1. ELISA ANTÍGENO RECOMBINANTE LID-1

Na figura 2 apresentamos os resultados obtidos no teste ELISA utilizando o antígeno recombinante LID-1 na concentração de 1µg/mL avaliando diferentes soluções bloqueadoras durante a etapa de sensibilização das microplacas e diluentes de amostras e do conjugado enzimático, conforme descrito no Quadro 1 da metodologia.

Utilizamos sete amostras de soros de pacientes com hanseníase nas diferentes formas clínicas, seis amostras de soros de indivíduos residentes de área não endêmica e cinco amostras de soros de pacientes com tuberculose pulmonar. As amostras de soros foram diluídas a 1/100 e o conjugado anti-IgG humana-peroxidase diluído a 1/10.000.

Figura 2 – Densidades ópticas das amostras de soros estudadas, segundo os protocolos definidos. A = bloqueio 1% BSA em PBS-Tw 20 0,05% e diluente 0,1% BSA em PBS-Tw 20 0,05%; B = bloqueio 5% leite desnatado em PBS-Tw 20 0,05% e diluente 2% leite desnatado em PBS-Tw 20 0,05%.

Verificamos que as condições estipuladas no protocolo B apresentaram resultados satisfatórios, permitindo diferenciar as amostras de soros dos pacientes com hanseníase com baixa reatividade das amostras de soros dos indivíduos residentes de área não endêmica. Avaliando as cinco amostras de soros dos pacientes com tuberculose pulmonar, apenas uma permaneceu com elevada densidade óptica. Este protocolo também apresentou menor coloração de fundo (“back-ground”), sendo o escolhido para a realização do ELISA com o antígeno recombinante LID-1.

Aplicamos o ELISA com antígeno recombinante LID-1 nas amostras de soros dos pacientes com hanseníase com diferentes formas clínicas e

nas amostras de soros do grupo controle (indivíduos residentes de área endêmica e não endêmica).

1.1. DETERMINAÇÃO DO LIMIAR DE REATIVIDADE

Utilizando as densidades ópticas obtidas no ELISA-LID-1 nas amostras de soros de pacientes com hanseníase (n=61) e nas amostras de soros do grupo controle residentes em área endêmica e não endêmica (n=51) foi construída a curva ROC (“Receiver Operating Characteristic curve”) para determinação do limiar de reatividade do teste.

O ponto de corte na D.O. de 0,153 apresentou melhores índices de sensibilidade de 66% e especificidade de 92%, com área abaixo da curva de 89% (Figura 3).

Figura 3 – **Curva ROC para o antígeno recombinante LID-1 para pesquisa de anticorpos IgG anti-*M. leprae***: A indicação gráfica mostra a densidade óptica de 0,153 onde se obteve máxima sensibilidade e menor número de resultados falso-positivos (1-Especificidade)

Para verificarmos o desempenho do ELISA LID-1 nas diferentes formas clínicas da doença, agrupamos os 61 pacientes levando-se em consideração a classificação operacional da doença e baciloscopia: pacientes multibacilares (LL, BL, BB e BT), pacientes paucibacilares (BT, TT), total de 53 pacientes. Os oito (8) pacientes que apresentavam a forma indeterminada (I) foram analisados separadamente.

Nos pacientes com as formas multibacilares (LL, BL, BB, BT) a sensibilidade do teste foi de 91% (30/33). Nas formas paucibacilares a sensibilidade foi de 45% (9/20). Apenas um paciente com a forma indeterminada da doença apresentou densidade óptica acima do limiar de reatividade.

Entre as amostras de soros provenientes de indivíduos contactantes (n=30), uma apresentou reatividade no ELISA LID-1, com D.O. de 0,812 superior ao limiar de reatividade.

O ELISA – LID-1 foi aplicado em amostras de soros de pacientes com tuberculose pulmonar (n=20), apresentando especificidade de 85% (17/20). Na tabela 5, apresentamos os resultados obtidos no ELISA LID-1.

Tabela 5 – Resultados de sensibilidade, especificidade e valores preditivos, nos diferentes grupos estudados no ELISA LID-1

Grupos de estudo	S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)
Formas multibacilares (BT, BB, BL, LL)	91 (30/33)	-	89	94
Formas paucibacilares (BT, TT)	45 (09/20)	-	69	81
Grupo controle – RAE	-	95 (20/21)	-	-
Grupo controle – RANE	-	90 (27/30)	-	-
Tuberculose pulmonar	-	85 (17/20)	-	-

RAE: Residentes de área endêmica; RANE: residentes de área não endêmica S: sensibilidade; E: especificidade; VPP: valor preditivo positivo e VPN: valor preditivo negativo

Na figura 4 apresentamos as densidades ópticas obtidas das amostras de soros dos diferentes grupos estudados frente ao antígeno recombinante LID-1.

Figura 4 – Densidades ópticas das amostras de soros dos pacientes com hanseníase nas formas multibacilares (MB), paucibacilares (PB), indeterminada (I), grupo controle (Residentes em área endêmica - RAE e residentes em área não endêmica - RANE), pacientes com tuberculose pulmonar e contatos.

1.2 ASSOCIAÇÃO DOS RESULTADOS DO ELISA LID-1 E BACILOSCOPIA

Na tabela 6 apresentamos os resultados do ELISA LID-1 para pesquisa de anticorpos IgG em 50 amostras de soros de pacientes com hanseníase nas formas multibacilares (BT, BB, BL e LL) e paucibacilares (BT, TT) que realizaram baciloscopia do esfregaço do raspado intradérmico (BAAR).

Tabela 6 – Resultados do ELISA – LID-1 e da baciloscopia do esfregaço de raspado intradérmico (BAAR) nos 50 pacientes com hanseníase.

	Formas multibacilares (n=31)		Formas paucibacilares (n=19)		
ELISA	BACILOSCOPIA		BACILOSCOPIA		TOTAL
	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	
POSITIVO	21	7	0	9	37
NEGATIVO	0	3	1	9	13
TOTAL	21	10	1	18	50

Nos pacientes com as formas multibacilares que apresentavam baciloscopia negativa (n=10), o ELISA LID-1 para pesquisa de anticorpos IgG foi reagente para sete pacientes (70%). Nos pacientes com as formas paucibacilares, o ELISA LID-1 para pesquisa de anticorpos IgG foi reagente para nove pacientes (50%).

2. ELISA ND-O-BSA

No ELISA ND-O-BSA para pesquisa de anticorpos totais dois protocolos foram estudados, conforme descrito no Quadro 2 da metodologia. Foram utilizadas 26 amostras de soros de pacientes com hanseníase com diferentes formas clínicas e seis amostras de soros de indivíduos residentes em área não endêmica. Os resultados são apresentados na figura 5.

Figura 5 – Densidades ópticas das amostras de soros de pacientes com hanseníase nas diferentes formas clínicas e indivíduos residentes em área não endêmica (RANE). A = Protocolo 1; B = Protocolo 2

Pelos resultados obtidos optamos por trabalhar com o protocolo A que mostrou resultados de densidades ópticas entre os indivíduos residentes de área não endêmica menor que os obtidos no protocolo B.

2.1 DETERMINAÇÃO DO LIMIAR DE REATIVIDADE

Para melhor definição do limiar de reatividade do teste foi construída Curva ROC para o ELISA utilizando as densidades ópticas das amostras de soros do grupo controle, indivíduos residentes em área não endêmica (n=21) e área endêmica (n=30) e amostras de soros dos pacientes com hanseníase nas diferentes formas clínicas da doença (n=61).

O limiar de reatividade da reação foi definido na D.O. de 1,140, com sensibilidade de 74% e especificidade de 98%. A área abaixo da curva foi de 89% (Figura 6).

Figura 6 - Curva ROC para o ELISA ND-O-BSA para pesquisa de anticorpos totais anti-*M. leprae*: A indicação gráfica representa a densidade óptica onde se obteve máxima sensibilidade (Se) e menor número de resultados falso-positivos (1-E).

Na tabela 7 apresentamos os resultados obtidos no ELISA ND-O-BSA nos diferentes grupos analisados.

Tabela 7 – Resultados de sensibilidade, especificidade e valores preditivos, nos diferentes grupos estudados no ELISA ND-O-BSA.

Grupos de estudo	S %	E %	VPP %	VPN %
Formas multibacilares (BT, BB, BL, LL)	91 (30/33)	-	97	94
Formas paucibacilares (BT, TT)	60 (12/20)	-	92	86
Grupo controle – ERA	-	95 (20/21)	-	-
Grupo controle – RANE	-	100 (30/30)	-	-
Tuberculose pulmonar	-	70 (14/20)	-	-

RAE: Residentes de área endêmica; RANE: residentes de área não endêmica S: sensibilidade; E: especificidade; VPP: valor preditivo positivo e VPN: valor preditivo negativo

Três pacientes com a forma indeterminada da doença apresentaram resultado positivo. Entre as amostras de soros provenientes de indivíduos contactantes de pacientes com hanseníase (n=30), 20 apresentaram reatividade no ELISA ND-O-BSA.

Na figura 7 mostramos as densidades ópticas obtidas nas amostras de soros dos diferentes grupos estudados frente ao antígeno ND-O-BSA.

Figura 7 – Densidades ópticas das amostras de soros dos pacientes com hanseníase nas formas multibacilares (MB), paucibacilares (PB), indeterminada (I), grupo controle (Residentes em área endêmica - RAE e residentes em área não endêmica - RANE), pacientes com TB pulmonar e contatos.

2.2 ASSOCIAÇÃO DOS RESULTADOS DO ELISA ND-O-BSA E BACILOSCOPIA

Na tabela 8 apresentamos os resultados do ELISA ND-O-BSA para pesquisa de anticorpos totais em 50 amostras de soros de pacientes com hanseníase nas formas multibacilares (BT, BB, BL e LL) e paucibacilares (BT, TT) que realizaram baciloscopia do esfregaço do raspado intradérmico (BAAR).

Tabela 8 – Resultados do ELISA ND-O-BSA associado ao resultado da baciloscopia do esfregaço intradérmico nos 50 pacientes com hanseníase

Formas multibacilares (n=31)			Formas paucibacilares (n=19)		
ELISA	BACILOSCOPIA		BACILOSCOPIA		
	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
POSITIVO	21	7	1	11	40
NEGATIVO	0	3	0	7	10
TOTAL	21	10	1	18	50

Nos pacientes com as formas multibacilares que apresentavam baciloscopia negativa (n=10), o ELISA ND-O-BSA para pesquisa de anticorpos totais foi reagente para sete pacientes (70%). Nos pacientes com as formas paucibacilares com baciloscopia negativa (n=18), o ELISA ND-O-BSA para pesquisa de anticorpos totais foi reagente para onze pacientes (61%) e um paciente paucibacilar com baciloscopia positiva foi reagente no ELISA ND-O-BSA.

Os resultados dos índices baciloscópicos apresentaram correlação com a reatividade das amostras de soros dos pacientes com hanseníase ($R^2 = 0,3$; $p < 0,001$ – método de Pearson).

3. ASSOCIAÇÃO DOS RESULTADOS DO ELISA LID-1 E ND-O-BSA E TESTE DE MITSUDA

Na tabela 9 apresentamos a associação dos resultados de 48 pacientes que realizaram o teste de Mitsuda e ELISA LID-1 para pesquisa de anticorpos IgG e ELISA ND-O-BSA para pesquisa de anticorpos totais.

Tabela 9 – Resultados do ELISA LID-1 e ELISA ND-O-BSA associado ao resultado do teste de Mitsuda em pacientes com hanseníase

		Formas Multibacilares		Formas Paucibacilares	
		Teste de Mitsuda		Teste de Mitsuda	
ELISA		P	N	P	N
LID	R	08	18	04	03
	NR	01	02	09	03
ND-O-BSA	R	09	17	07	04
	NR	00	03	06	02
TOTAL		09	20	13	06

P: positivo; N: negativo; R: reagente; NR: não reagente

Dos 29 pacientes com formas multibacilares, 20 apresentavam teste de Mitsuda negativo e destes, 18 (90%) e 17 (85%) possuíam teste LID-1 e ND-O-BSA reagente, respectivamente. Entre os nove pacientes que apresentavam teste de Mitsuda positivo, nove (100%) foram reagentes no ELISA LID-1 e oito (89%) foram reagentes para o ELISA ND-O-BSA.

Dos 19 pacientes com as formas paucibacilares, 13 apresentavam teste de Mitsuda positivo e destes, 04 (31%) foram reagentes no teste LID-1 e 07 (54%) no ELISA ND-O-BSA. Dos 06 pacientes que apresentavam teste de Mitsuda negativo, três foram reagentes no ELISA LID-1 e quatro no ELISA ND-O-BSA.

Análise estatística dos resultados obtidos no ELISA ND-O-BSA e o teste de Mitsuda mostraram concordância (Teste de McNemar's, $p = < 0,001$). E entre o ELISA LID-1 e o teste de Mitsuda não mostraram concordância.

4. ASSOCIAÇÃO DOS RESULTADOS DO ELISA ND-O-BSA E ELISA LID-1

Na tabela 10 associamos os resultados do ELISA ND-O-BSA e LID-1 nas amostras de soros dos pacientes com hanseníase nas diferentes formas clínicas da doença.

Tabela 10 - Associação dos resultados do ELISA ND-O-BSA e LID-1 nas amostras de soros de 61 pacientes com hanseníase nas diferentes formas clínicas.

ELISA		MULTIBACILARES				PAUCIBACILARES			TOTAL
ANTÍGENOS									
ND-O-BSA	LID-1	LL	BL	BB	BT	I	BT	TT	
R	R	11	10	04	03	00	04	01	33
NR	NR	00	00	00	01	04	01	03	09
R	NR	00	00	01	01	03	01	06	13
NR	R	01	00	00	01	01	03	01	07
TOTAL		12	10	05	06	08	09	11	61

R = reagente; NR = não reagente; LL – lepromatosa-lepromatosa; BL – borderline-lepromatosa; BB – borderline-borderline; BT – borderline – tuberculóide; TT – tuberculóide-tuberculóide; I – indeterminada

Observamos que 85% (28/33) das formas multibacilares foram reagentes para os dois testes simultaneamente, resultando no valor preditivo positivo de 100% e valor preditivo negativo de 91%. Se considerarmos pelo menos um teste reagente, 97% (32/33) e 71% (20/28) das amostras de soros dos pacientes multibacilares e paucibacilares, respectivamente, foram reagentes. Neste caso, o valor preditivo positivo seria 91% e o valor preditivo negativo de 84%.

Na tabela 11 apresentamos os resultados da associação do ELISA ND-O-BSA e LID-1 nas amostras de soros do grupo controle.

Tabela 11 - Associação dos resultados do ELISA ND-O-BSA e LID-1 nas 51 amostras de soros do Grupo Controle – residentes em área endêmica e não endêmica.

ELISA ANTÍGENOS		Grupos Controles		TOTAL
ND-O-BSA	LID-1	Área endêmica	Área não endêmica	
R	R	00	00	00
NR	NR	30	17	44
R	NR	00	01	01
NR	R	01	03	04
TOTAL		30	21	51

R = reagente; NR = não reagente

Podemos verificar que nenhuma amostra de soro do grupo controle foi reagente para os dois testes. Considerando essa análise, o valor preditivo positivo foi 100%.

5. WESTERN BLOTTING

5.1 CONCENTRAÇÃO DO EXTRATO ANTIGÊNICO DE *M. leprae*

O fracionamento protéico do extrato antigênico de *M. leprae* foi realizado por SDS-PAGE utilizando-se gel de corrida na concentração de 15%. As concentrações do extrato antigênico de 5, 3 e 2µg/mm do gel foram avaliadas (Figura 8). Pela melhor definição das bandas protéicas na corrida

eletroforética optamos por trabalhar com a concentração de 3 μ g/mm de gel.

Figura 8. Eletroforese do extrato antigênico de *M. leprae* em gel de poliacrilamida 15%. **1** - concentração de 2 μ g/mm; **2** - Concentração de 3 μ g/mm. **3** - Concentração de 5 μ g/mm PM - Padrão de massa molecular em KiloDaltons (kDa).

5.2 WESTERN BLOTTING

Avaliamos a frequência de reconhecimento de anticorpos IgG presentes nas amostras de soros dos grupos estudados, para as diferentes frações protéicas do extrato antigênico de *M. leprae*. As frações protéicas entre 68 e 3,5kDa foram reconhecidas por anticorpos IgG. A maior

frequência de reconhecimento foi para a fração de 38kDa e as regiões de 30, 16, 6 e 3,5kDa (Figura 9).

Figura 9 – Western Blotting com soro reagente a 1/100. **PM** – Padrão de massa molecular. **1**- Reatividade de anticorpos IgG para a fração de 38kDa e regiões de 30, 16, 6 e 3,5kDa presentes em amostra de soro de paciente com a forma multibacilar (LL).

Na tabela 12 são apresentados os resultados da pesquisa de anticorpos IgG para a fração protéica de 38kDa e regiões de 30, 16, 6 e 3,5kDa nos diferentes grupos estudados.

Tabela 12 – Reatividade de anticorpos IgG para fração de 38kDa e regiões protéicas de *M. leprae*.

Grupos de Estudo		FRAÇÃO 38KDa	REGIÃO 30KDa	REGIÃO 16KDa	REGIÃO 6KDa	REGIÃO 3,5KDa
CONTROLE - RANE	21	0 (0%)	10 (48%)	1 (5%)	8 (38%)	0 (0%)
CONTROLE - RAE	30	0 (0%)	24 (80%)	9 (30%)	14 (47%)	0 (0%)
CONTACTANTES	30	1 (3,3%)	28 (93%)	14 (47%)	15 (50%)	0 (0%)
TUBERCULOSE PULMONAR	20	2 (10%)	19 (95%)	11 (55%)	13 (65%)	2 (10%)
FORMA INDETERMINADA	8	1 (13%)	7 (87%)	3 (38%)	3 (38%)	(0%)
HANSENÍASE	53	28 (53%)	50 (94%)	39 (74%)	35 (66%)	14 (26%)

RANE: Residentes em área não endêmica; **RAE:** residentes em área endêmica

A fração de 38kDa e região de 3,5kDa foram as mais reconhecidas pelos anticorpos IgG nas amostras de soros dos pacientes com hanseníase do que nas amostras de soros dos outros grupos analisados. Observamos que entre as 51 amostras de soros do grupo controle (RANE e RAE), 14 (27%) não apresentaram nenhuma reatividade no Western Blotting. As 37 amostras de soros que apresentaram reatividade possuíam anticorpos IgG para as regiões de 30, 16 e/ou 6kDa.

Entre as 30 amostras de soros dos indivíduos contactantes, 28 (93%) apresentaram anticorpos IgG para a região de 30kDa, 14 (47%) apresentaram anticorpos IgG para a região de 16kDa e 15 (50%) apresentaram reatividade para a região de 6kDa. Para a fração de 38kDa,

apenas uma amostra de soro de indivíduo contactante apresentou reatividade.

Nos grupos de contactantes, pacientes com tuberculose pulmonar ativa e de pacientes com hanseníase nas formas paucibacilares, as regiões de 30, 16 e 6kDa foram as mais reconhecidas pelos anticorpos IgG. A fração de 38kDa e região de 3,5kDa foram reconhecidas com maior frequência nas amostras de soros do grupo de pacientes com hanseníase com as formas multibacilares.

Considerando as formas clínicas da hanseníase, entre os 27 pacientes com formas multibacilares (LL, BL, BB), 24 apresentaram reatividade dos anticorpos IgG para a fração de 38kDa (86%) e 13 (37%) para a região de 3,5kDa. Esses pacientes que apresentavam anticorpos IgG para a região de 3,5kDa também apresentavam reatividade para a fração de 38kDa. Entre os seis pacientes multibacilares com a forma borderline-tuberculóide (BT), três apresentavam anticorpos IgG para a fração de 38kDa.

Entre os 20 pacientes com as formas paucibacilares (BT e TT), um paciente com a forma boderline-tuberculóide apresentou anticorpos IgG para a fração de 38kDa e outro para a região de 3,5kDa. Os demais pacientes apresentaram anticorpos IgG para as regiões entre 30, 16 e/ou 6kDa.

Dos oito pacientes com a forma indeterminada, um apresentou reatividade de anticorpos IgG para a fração de 38kDa. Os resultados são apresentados na tabela 13.

Tabela 13– Reatividade de anticorpos IgG para a fração e regiões protéicas de *M. leprae* presentes nas amostras de soros dos pacientes com diferentes formas clínicas de hanseníase.

Hanseníase	N	Fração e regiões protéicas				
		38kDa	30kDa	16kDa	6kDa	3,5kDa
MB	LL	12	11	12	11	7
	BL	10	9	11	10	9
	BB	5	4	5	4	2
	BT	6	3	6	5	6
PB	BT	9	1	8	5	8
	TT	11	0	9	3	2
	I	8	1	7	3	3
TOTAL		61	29	57	42	38

MB: Multibacilares; **PB:** Paucibacilares; **LL** = Lepromatoso-lepromatoso; **BL** = Boderline-lepromatoso; **BB**= Boderline-boderline; **BT**= Boderline-tuberculóide; **TT**= Tuberculoíde-tuberculóide; **I**= Indeterminada; **kDa**: kilodaltons

6. ASSOCIAÇÃO DOS RESULTADOS DOS TESTES ELISA E WESTERN BLOTTING

Considerando como critério de positividade no Western Blotting a reatividade de anticorpos IgG presentes nas amostras de soros dos pacientes para a fração de 38kDa e a positividade em um dos testes ELISA, apresentamos na tabela 14 os resultados do Western Blotting, ELISA-ND-O-BSA para pesquisa de anticorpos totais e ELISA LID-1 para pesquisa de anticorpos IgG nos diferentes grupos estudados.

Tabela 14 - Resultados dos testes Western Blotting, ELISA-ND-O-BSA para pesquisa de anticorpos totais e ELISA LID-1 para pesquisa de anticorpos IgG nos grupos estudados.

WB 38kDa	ELISA		PACIENTES			GRUPOS			
	ND-O-BSA	LID-1	MB (n=33)	PB (n=20)	Total (n=53)	RANE (n=21)	RAE (N=30)	TB (n=20)	Contatos (n=30)
R	R	R	25	01	26	00	00	00	01
NR	NR	NR	01	04	05	17	27	11	10
R	NR	NR	00	00	00	00	00	02	00
R	R	NR	02	00	02	00	00	00	00
R	NR	R	00	00	00	00	00	00	00
NR	R	R	03	04	07	00	00	02	02
NR	NR	R	02	04	06	03	01	01	00
NR	R	NR	00	07	07	01	02	04	17

R = reagente; **NR** = não reagente; **RANE** = indivíduos residentes em área não endêmica; **RAE** = indivíduos residentes em área endêmica; **TB** = pacientes com tuberculose pulmonar

Dos 33 pacientes multibacilares, 25 foram reagentes nos três testes sorológicos e dois foram reagentes no ELISA ND-O-BSA e Western Blotting, totalizando 82% (27/33) de sensibilidade. Um paciente apresentou resultado não reagente nos três testes sorológicos, três foram reagentes nos dois ELISA e dois pacientes foram reagentes no teste ELISA LID-1.

Dos 20 pacientes paucibacilares, um foi reagente e quatro apresentaram resultado não reagente nos três testes sorológicos, quatro foram reagentes nos dois ELISA e os outros 11 pacientes possuíam resultado reagente em pelo menos um dos testes ELISA. Observamos que dos 20 pacientes paucibacilares, 16 (80%) apresentaram resultado positivo em pelo um teste sorológico.

Dos 51 indivíduos do grupo controle (RANE e RAE), 44 (86%) foram não reagentes nos três testes sorológicos e sete indivíduos foram reagentes em um dos ELISA realizados, todavia nenhum deles apresentou anticorpos IgG para a fração de 38kDa.

Dos 20 pacientes com tuberculose pulmonar, 11 (55%) foram não reagentes nos três testes sorológicos, dois foram reagentes somente no Western Blotting, sete foram reagentes em um dos ELISA realizados.

Dos 30 indivíduos contactantes de pacientes com hanseníase, 10 possuíam os três testes sorológicos não reagentes, dois foram reagentes nos dois testes ELISA e 17 foram reagentes apenas no teste ELISA ND-O-BSA. Um contactante apresentou resultado reagente nos três testes.

DISCUSSÃO

Apesar dos avanços da ciência e das novas descobertas dos historiadores a origem da hanseníase continua obscura e baseada em poucos relatos que datam do século 7 a.C. Com o passar dos anos, a doença foi sendo melhor avaliada mas até hoje, apesar da sua importância social é tida como uma doença negligenciada de países em desenvolvimento.

As tentativas de controle para erradicação falharam ao longo dos anos e o que se observa é a doença sendo detectada em diversos países do mundo, com altas taxas de incidência, principalmente entre jovens, o que indica que esta ocorrendo uma transmissão ativa e contínua.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) apresentou um relatório informando que em 2010 haviam sido detectados 228.274 novos casos de hanseníase. Na América Latina a doença está presente em todos os países, com exceção do Chile, onde está erradicada. O Brasil liderou o número de casos com 34.894. O país que apresentou o maior número de casos foi à Índia com 126.860.

Embora a doença tenha classificação bem definida, baseada em critérios clínicos, imunológicos e bacteriológicos, o diagnóstico para cada fase clínica é difícil, principalmente em áreas rurais, onde o conhecimento sobre a doença e o manejo do paciente doente é precário, resultando em tratamento tardio por 2 anos ou mais. Devido ausência de um exame considerado padrão-ouro para o diagnóstico da doença, para fins de tratamento, a OMS recomendou a classificação operacional (CO) baseada

no número de lesões dos pacientes. No entanto, a confiabilidade desse critério tem sido questionada, uma vez que pacientes com índice baciloscópico positivo e menos de cinco de lesões podem ser classificados como multibacilares (WHO, 1997; Croft et al., 1998; Oskam et al., 2003). Por outro lado, existe uma tendência a superestimar lesões únicas como formas paucibacilares e dificuldade de entender formas multibacilares (borderline) apresentando múltiplas lesões com perda de sensibilidade. Assim, a indefinição de pacientes com formas multibacilares talvez seja a grande responsável pela continuidade na disseminação da doença (Lobato et al., 2011).

O controle da doença tem sido objeto de estudos da OMS, que tem procurado motivar pesquisadores e empresas para reunirem esforços buscando alternativas que possam ser usadas para conhecer melhor a doença, diminuindo o risco de sua transmissão com tratamento rápido e eficaz.

Em outubro de 2003, foi realizado em Amsterdã, Holanda, um workshop patrocinado pela OMS/TDR onde pesquisadores de diversas instituições públicas e privadas criaram o IDEAL Consortium (Initiative for Diagnostic and Epidemiological Assay for Leprosy) com o objetivo de promover pesquisas e elaborar estratégias no desenvolvimento de novas ferramentas para o diagnóstico e identificação de novos marcadores moleculares para estudos epidemiológicos da hanseníase (Assefa et al, 2005).

Neste sentido, uma das prioridades do IDEAL foi estabelecer propostas para a melhoria de métodos de diagnóstico que permitam a detecção da infecção e a atividade de *M. leprae*, em estágios iniciais no indivíduo, antes do aparecimento dos sinais clínicos característicos e transmissão da doença. Uma das metas para os testes sorológicos foi identificar e avaliar antígenos recombinantes e melhorar a sensibilidade dos testes sorológicos que utilizam o antígeno PGL-I. Desde então, o glicolípídeo sintético, ND-O-BSA tem sido avaliado em regiões com diferentes níveis de endemicidade da doença, devido variações de sensibilidade e especificidade.

Em 2010, o grupo do IDEAL reunido em Beijing na China, no sexto workshop, discutiu os progressos observados na redução do número de casos no mundo, a baixa resistência a drogas usadas na poliquimioterapia (PQT) e a não diminuição de novos casos na maioria dos países. Concluiu que a transmissão será contínua para os próximos 5 a 20 anos. Ainda foi discutida a necessidade de novas ferramentas para o diagnóstico, principalmente em estágios iniciais da doença para se evitar o dano neural e deficiências subsequentes. Um dos pontos discutidos pelo IDEAL nessa reunião foi à formatação e industrialização de um reagente semelhante ao Quantiferon TB GOLD (QTF - G[®]) e a continuidade dos estudos da sorologia baseados nas experiências do IDRI (Infectious Disease Research Institute) (Dockrell et al., 2011).

O método do QTF - G[®] tem sido utilizado com relativo sucesso no diagnóstico da tuberculose, principalmente na tentativa de substituir o teste intradérmico e na avaliação das formas latentes da doença.

Duas frações protéicas de *M. leprae*, MLSA-LAM e MLCwA foram avaliadas como potenciais candidatas ao teste por induzir a produção de IFN- γ por células mononucleares do sangue periférico em pacientes com hanseníase tuberculóide, residentes no Paquistão (Dockrell et al., 1996).

Weir et al. (1999) demonstraram que as frações MLSA e MLCwA, após passarem por processo de extração de lipídeos imunossupressores, eram altamente imunogênicas, sendo necessários estudos *in vivo* para melhor avaliar sua aplicação como reagentes no diagnóstico de infecção por *M. leprae*.

Embora não fazendo parte do IDEAL Consortium, nosso laboratório está em consonância com as propostas do grupo. Nesse sentido, procuramos avaliar o antígeno glicolípido sintético ND-O-BSA, fornecido pelo Prof. Dr. John Spencer da Universidade do Estado do Colorado e o antígeno recombinante LID-1 fornecido pelo Prof. Dr. Steven Reed (IDRI) em testes imunoenzimáticos, com amostras de soros de pacientes provenientes da cidade de Imperatriz, Maranhão, região endêmica de hanseníase. Também procuramos por Western Blotting, utilizando extrato antigênico de *M. leprae* (gentilmente cedido pelo Dr. John Spencer – Universidade do Estado do Colorado), identificar frações protéicas que pudessem ser úteis para fins de diagnóstico e prognóstico da doença.

Para avaliar o desempenho do antígeno recombinante LID-1, dois protocolos foram estudados, com variações na solução de bloqueio da fase sólida e na solução diluente das amostras de soros. Melhores resultados foram obtidos quando a fase sólida foi bloqueada com leite desnatado 5% em PBS e as amostras de soros foram diluídas com solução de leite desnatado a 2%, em PBS-Tw20. Nestas condições obtivemos uma reação com pouca coloração de fundo e, boa distinção de densidades ópticas entre amostras de soros de pacientes com hanseníase, indivíduos residentes em área não endêmica (RANE) e, pacientes com tuberculose pulmonar.

As condições por nós utilizadas foram diferentes daquelas descritas na literatura por Duthie et al., 2007. Nossos resultados mostraram sensibilidade de 91% e 45% e valores preditivos negativos de 94% e 88% para pacientes com formas multibacilares e, paucibacilares, respectivamente. A especificidade do teste foi de 95% para indivíduos residentes em área endêmica, 90% para indivíduos residentes em área não endêmica e 85% para pacientes com tuberculose pulmonar. Duthie et al. (2007) descreveu uma especificidade de 96% para grupo de indivíduos de área endêmica com amostras de soros colhidas no Japão.

Na avaliação do desempenho do antígeno glicolípido sintético ND-O-BSA utilizamos dois protocolos que variaram na concentração dos antígenos na sensibilização da fase sólida, no diluente e diluição das amostras de soros. Melhores resultados foram obtidos quando a fase sólida foi sensibilizada com 2µg/mL e as amostras de soros foram diluídas a 1/50. Nestas condições obtivemos uma sensibilidade para pesquisa de anticorpos

totais de 91% em amostras de soros de pacientes com hanseníase com formas multibacilares e 60% para pacientes com formas paucibacilares.

Nossos resultados mostraram índices inferiores aos obtidos por Spencer et al. (2011). Analisando o trabalho do Spencer et al (2011) verificamos que na classificação de pacientes com formas multibacilares foram incluídas apenas as formas LL e BL, enquanto que nossos resultados foram obtidos com pacientes com formas multibacilares selecionados conforme critério operacional recomendado pela OMS (formas LL, BL, BB e BT). Esse dado certamente influenciou na sensibilidade do teste. Em relação à especificidade, obtivemos índice melhor ao descrito por Spencer et al. (2011) (93%) em amostras de soros procedentes de área não endêmica (100%).

Os valores preditivos negativos obtidos foram de 94% para pacientes com formas MB e 86% para pacientes com formas paucibacilares o que viabiliza a utilização do teste no diagnóstico da hanseníase.

A maioria dos estudos não avalia pacientes com a forma indeterminada da doença. Neste trabalho, de oito amostras de soros analisadas, três apresentavam sorologia positiva para pesquisa de anticorpos totais e um para a pesquisa de anticorpos IgG. Como essa fase clínica é considerada inicial, caracterizada geralmente por uma área de hipoestesia definida e não por uma lesão visível, seu diagnóstico clínico é difícil, mesmo após criteriosa investigação. A inclusão dessa forma clínica no estudo foi importante para verificar o desempenho dos testes sorológicos,

ELISA e WB, no diagnóstico e prognóstico de pacientes que apresentavam a fase transitória e inicial da hanseníase.

Na literatura vários pesquisadores descreveram o ELISA IgM para a pesquisa de anticorpos na hanseníase para fins de diagnóstico (Chujor et al., 1991; Cellona et al., 1993; Cho et al., 2001; Duthie et al., 2007; Spencer et al., 2011; Lobato et al., 2011). No nosso laboratório fizemos um estudo inicial do desempenho do ELISA IgM com o glicolípídeo fenólico I (PGL-I) nativo e sintético. Como os resultados obtidos não diferiram significadamente dos relatados na literatura não achamos importante colocá-los neste trabalho e, conforme discutimos no trabalho enviado para publicação, estudos devem ser feitos para avaliar melhor o desempenho da pesquisa de anticorpos IgM no diagnóstico da hanseníase.

Quando fizemos o estudo comparativo dos resultados obtidos no ELISA com os dois antígenos estudados e o resultado da baciloscopia, observamos que para o antígeno recombinante LID-1 das 31 amostras de soros de pacientes com formas multibacilares e BAAR positiva, 24 foram concordantes e sete foram discordantes. A discordância mostrou melhor desempenho do ELISA em relação à baciloscopia, pois apresentou positividade em sete amostras de soros com baciloscopia negativa. Esses resultados são importantes no manejo do paciente, para fins de terapêutica e estudos epidemiológicos influenciando no controle da transmissão da doença e melhor avaliação prognóstica. Em relação às formas paucibacilares, os testes foram concordantes em nove de 19 amostras de soros dos pacientes estudados. A positividade do ELISA em nove amostras de soros de

pacientes com as formas paucibacilares mostrou que esses pacientes provavelmente estejam em fase de transição da doença (sete dos nove pacientes apresentavam a forma borderline – tuberculóide).

Em relação ao antígeno glicolípídeo sintético ND-O-BSA, os resultados da Tabela 8 mostraram o mesmo desempenho observado para o antígeno recombinante LID-1, para as formas multibacilares. Pouca diferença foi observada em relação às formas paucibacilares sendo válidas as observações feitas para o desempenho do antígeno recombinante LID-1.

Dos 48 pacientes que fizeram o teste intradérmico de Mitsuda, 29 apresentavam formas multibacilares e 19 formas paucibacilares. Os resultados apresentados na tabela 09, mostraram pouca diferença entre os ELISA, com discreta variação para o antígeno glicolípídeo sintético ND-O-BSA, com 12 testes concordantes e 17 discordantes para as formas multibacilares. O que chama atenção para ambos os antígenos é o elevado número de amostras de soros reagentes com teste de Mitsuda negativo, o que seguramente está relacionado com o espectro da doença e com a classificação dada pelos clínicos.

Para as formas paucibacilares, observamos para o antígeno glicolípídeo sintético ND-O-BSA concordância entre 9 testes e discordantes em 10 testes. Mais uma vez essa discrepância poderá ser explicada, futuramente após rigoroso estudo entre as formas clínicas da doença bem definidas pelos clínicos, teste de Mitsuda e sorologia.

O estudo do perfil de reatividade dos anticorpos contra proteínas nativas de *M. leprae* por Western Blotting foi fundamentada nos resultados obtidos por estudos realizados em nosso laboratório para diferentes patologias, como doença de Chagas, toxoplasmose, sífilis, tuberculose pulmonar, neurocisticercose e, leishmaniose visceral (Frade, et al., 2011; Araújo & Ferreira, et al., 2008; Lemos et al., 2007; Beck et al., 2005; Kanunfre, 2007; Vaz et al., 2005; Silva, 2007).

Na hanseníase, poucos são os estudos que avaliam o perfil de reatividade de anticorpos para proteínas de *M. leprae*, principalmente quando associamos com o espectro clínico da doença. A obtenção do antígeno de *M. leprae* foi a maior dificuldade para a padronização do WB na hanseníase. Para solucionar este problema, trabalhamos inicialmente com antígeno do *M. leprae* obtido em nosso laboratório, a partir de hansenoma humano. A quantidade de micobactérias recuperadas para preparação do extrato antigênico foi sempre insuficiente para os estudos de padronização do Western Blotting. Também a qualidade do antígeno obtido foi questionável pela presença de componentes celulares que interferiam na dosagem protéica, mascarando o resultado final.

Por não dispormos de biotério, para manutenção de tatus nove bandas (espécie *Dasypus novemcinctus*), principal fonte da bactéria para estudos bioquímicos e imunológicos, procuramos várias alternativas, pois acreditávamos que o WB poderia fornecer informações adicionais sobre o comportamento da sorologia relacionado às formas clínicas da hanseníase.

Neste estudo para padronizar o WB e aplicar nas amostras de soros selecionados, obtivemos quantidade suficiente de antígeno enviado pelo Prof. Dr. John Spencer, da Universidade do Estado do Colorado. O produto, antígeno sonificado de *M. leprae*, obtido de tatus infectados experimentalmente em cativeiros, foi plenamente satisfatório para o desenvolvimento do projeto.

A experiência acumulada do laboratório foi importante para a definição da concentração do gel de poliacrilamida em 15%, a não utilização de 2 – Mercapto etanol (2ME) no tampão de amostra, o bloqueio das membranas de nitrocelulose, a diluição das amostras de soros e o tempo de incubação das amostras de soros. Após realização de gel de poliacrilamida com diferentes concentrações do extrato antigênico de *M. leprae* (5, 3 e 2µg/mm de gel), a concentração 3µg/mm de gel foi a definida para a realização do estudo.

Uma vez definidas as condições do SDS-WB, procuramos na literatura suporte científico para os nossos achados iniciais. No entanto, raros são os estudos que utilizam o WB com extrato antigênico de *M. leprae*.

Spencer et al. (2011), utilizou o antígeno MLSA ("*M. leprae* Soluble Antigen") obtido de tatus infectados experimentalmente em cativeiros, contendo componentes solúveis do *M. leprae* para a realização do WB aplicando-o em amostras de soros de pacientes com as formas clínicas LL/BL e TT/BT. Os autores descreveram a região ("smear") de 20-40kDa como a mais reconhecida pelos anticorpos presentes nas amostras de soros

dos pacientes com as formas LL/BL. No entanto, 1/3 das amostras de soros do grupo controle de área endêmica também apresentava esta reatividade.

Em função dos diferentes antígenos utilizados, não foi possível discutir os nossos resultados com dados da literatura.

Nas amostras de soros dos pacientes com hanseníase encontramos anticorpos IgG contra frações proteínicas que variaram entre 3,5kDa a 68kDa. A maior frequência de reconhecimento foi para a fração de 38kDa e as regiões de 30, 16, 6 e 3,5kDa.

Investigando a reatividade dos anticorpos IgG nas diferentes formas clínicas da doença observamos que a fração de 38kDa e região de 3,5kDa poderia ser utilizado como um marcador de diagnóstico precoce e/ou de prognóstico de hanseníase multibacilar. Entre os 27 pacientes com as formas multibacilares (LL, BL, BB), 24 apresentaram reatividade de anticorpos IgG para a fração de 38kDa (86%) e 13 (37%) para a região de 3,5kDa. Três pacientes com forma multibacilar não apresentaram anticorpos IgG nem para a fração de 38kDa e nem para a região de 3,5kDa.

Analisando os dados clínicos e laboratoriais disponíveis destes três pacientes, verificamos que um paciente, foi classificado com a forma clínica LL, apresentando lesões múltiplas e ENH (eritema nodoso hansênico), no entanto, também possuía resultados da baciscopia, teste rápido (ML FLOW) e teste de Mitsuda negativos. Este paciente também apresentaram ELISA ND-O-BSA não reagente.

O segundo, foi classificado com a forma clínica BL, apresentando 4 lesões cutâneas com alteração de sensibilidade, no entanto, seus testes laboratoriais (BAAR e teste rápido – ML FLOW) foram positivos. Este paciente apresentava ELISA ND-O-BSA e LID-1 reagentes e foi considerado no Western Blotting um falso resultado negativo.

O terceiro paciente foi classificado como BB, apresentando múltiplas lesões cutâneas com alteração de sensibilidade e ENH, no entanto, seus testes laboratoriais (teste de Mitsuda e teste rápido – ML FLOW) foram positivos. A baciloscopia foi negativa e os ELISA ND-O-BSA e LID-1 reagentes. Provavelmente, trata-se de um paciente com maior resistência a multiplicação bacilar e progressão da doença.

Baseados nesta análise, verificamos que os nove pacientes com as formas borderline (BB, BT) que apresentaram anticorpos para a fração de 38kDa e região 3,5kDa, possuíam um mal prognóstico da doença, sugerindo que estariam migrando para a forma lepromatosa-lepromatosa.

Nenhum dos 11 pacientes com as formas tuberculóide-tuberculóide (TT) apresentaram reatividade de anticorpos IgG para a fração de 38kDa. Essa forma clínica é caracterizada por uma elevada resposta imune celular (RIC). Geralmente estes pacientes controlam melhor a infecção e são resistentes a multiplicação bacilar.

Dentre os oito pacientes com a forma indeterminada da doença um apresentou anticorpos IgG para a fração de 38kDa. Este paciente apesar de apresentar uma única mancha hipocrômica com perda de sensibilidade

possuía resultado sorológico sugestivo de evolução da doença e de mau prognóstico.

Em relação ao grupo de contactantes, observamos um desempenho diferente para os antígenos recombinante LID-1 e ND-O-BSA nos testes ELISA. Para o antígeno LID-1 apenas uma amostra de soro do grupo foi reagente, enquanto que para o antígeno ND-O-BSA, 20 amostras de soros foram reagentes. Analisando os resultados do Western Blotting nesse grupo observamos que apenas uma amostra de soro foi reagente para a fração de 38kDa. A amostra de soro reagente era do mesmo paciente que também reagiu no ELISA LID-1. Esses dados nos levam a supor que esse contactante poderia estar desenvolvendo um quadro progressivo da doença. Essa observação está fundamentada em estudos anteriores do laboratório com contactantes de pacientes com tuberculose pulmonar.

Beck et al. (2003 , 2005), mostraram que um contactante apresentou anticorpos contra frações de *M. tuberculosis* definidas pelos autores como marcadores de mau prognóstico na tuberculose. Mais tarde em 2006, Kanunfre (2007), selecionando pacientes com tuberculose pulmonar para serem incluídos no seu estudo, observou que aquele contactante era um dos pacientes do ambulatório do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (FMUSP). Esses dados reforçam a contribuição da sorologia não apenas para fins de diagnóstico, mas também, no seguimento dos pacientes e de seus contactantes.

Até o momento, não são descritos na literatura, estudos que avaliam a presença de anticorpos IgG para a fração de 38kDa; na tuberculose, a expressão da proteína de 38kDa esta associada a presença de processos cavitários, multiplicação bacilar e a certos eventos associados a estágios avançados da doença (Jackett et al., 1988; Bothamley, 1995; Samanich et al., 2001; Kanunfre, 2007).

Essas observações nos levam a concluir que a fração de 38kDa e região de 3,5kDa sejam bons marcadores de confirmação da doença e de prognóstico, e quando os anticorpos estão presentes nas formas borderlines e indeterminada, podem indicar progressão do curso da doença.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo permitiram concluir:

1) Antígenos Recombinante LID-1 e sintético ND-O-BSA poderão ser utilizados para o diagnóstico da hanseníase por apresentarem bons índices de sensibilidade, especificidade e valores preditivos;

2) A presença de anticorpos IgG anti- *M. leprae* mostrou que a fração de 38kDa e a região de 3,5kDa do antígeno nativo de *M. leprae* poderão ser consideradas bons marcadores imunológicos para diagnóstico, confirmação da sorologia e prognóstico da doença;

ANEXO

ANEXO A – Informações clínicas e laboratoriais dos pacientes com hanseníase

N	Cod.	Idade	Sexo	CO	CE	TM (mm)	nº de lesões	BAAR	I.B.
1	P003	55	M	PB	TT	10	1	N	0
2	P004	13	M	PB	TT	9	1	NR	NR
3	P005	53	M	MB	DV	6	11	NR	NR
4	P006	32	F	MB	DD	6	11	N	0
5	P007	67	F	MB	VV	0	11	P	0,75
6	P008	NI	F	PB	TT	PL	0	N	0
7	P009	60	M	MB	VV	0	11	N	0
8	P011	67	M	MB	VV	PL	11	P	3
9	P012	58	M	PB	I	0	1	N	0
10	P013	35	F	MB	VV	PL	11	NR	NR
11	P016	31	F	PB	TT	9	1	N	0
12	P017	63	M	PB	I	PL	1	N	0
13	P021	44	M	PB	TT	8,5	1	N	0
14	P027	37	F	PB	I	PL	1	N	0
15	P028	32	M	PB	TT	6	1	N	0
16	P029	36	M	PB	I	7	1	N	0
17	P034	37	F	MB	DT	8,5	2	N	0
18	P035	46	M	MB	DT	0	0	N	0
19	P036	63	M	MB	DV	0	6	P	1,25
20	P037	36	F	MB	VV	6	0	P	3
21	P038	24	F	MB	VV	PL	11	P	5
22	P040	28	M	MB	DV	0	11	P	3
23	P042	47	F	MB	DT	PL	11	P	4
24	P043	47	F	MB	DT	6	1	N	0
25	P044	51	F	PB	TT	6	1	N	0
26	P046	53	M	MB	DV	0	6	P	3
27	P047	50	M	MB	DT	7	1	P	5
28	P048	67	M	MB	DV	0	11	P	4
29	P049	41	M	MB	DT	0	0	N	0
30	P050	58	F	MB	DD	PL	1	P	1,5
31	P051	13	F	PB	I	0	1	N	0
32	P052	83	M	MB	DD	6	9	N	0
33	P053	18	F	MB	DD	0	11	P	6
34	P054	67	M	MB	VV	0	11	P	5
35	P055	17	M	PB	TT	0	1	N	0
36	P056	24	M	MB	DT	0	2	N	0
37	P057	18	F	PB	I	10	1	N	0
38	P058	38	F	MB	DV	PL	2	N	0
39	P059	49	M	MB	VV	0	11	N	0
40	P060	8	M	PB	I	PL	1	N	0

N	Cod.	Idade	Sexo	CO	CE	TM (mm)	nº de lesões	BAAR	I.B.
41	P061	42	M	MB	DV	7	11	P	5
42	P062	27	F	PB	TT	14	1	N	0
43	P063	58	F	MB	DT	PL	5	N	0
44	P064	16	M	MB	DT	PL	5	N	0
45	P065	65	M	MB	DV	4	4	P	0,5
46	P066	17	M	MB	DT	10	11	N	0
47	P067	28	M	MB	VV	0	11	P	5
48	P068	61	M	MB	VV	PL	11	P	1,5
49	P069	68	M	MB	DT	0	11	N	0
50	P070	90	M	MB	DT	0	11	N	0
51	P071	37	M	MB	DV	PL	11	P	4,5
52	P072	20	M	MB	DT	4	11	N	0
53	P073	28	M	MB	DD	NR	11	P	0,5
54	P074	75	M	PB	I	8,5	1	N	0
55	P075	36	M	MB	DT	N	11	N	0
56	P076	47	M	MB	DT	6	2	N	0
57	P077	25	M	MB	DV	0	11	P	5
58	P078	63	M	MB	DV	0	11	P	3
59	P079	49	M	MB	VV	0	11	P	5
60	P080	22	M	MB	DT	NR	1	N	0
61	P082	54	F	MB	VV	0	11	N	0

Cod.= código de inclusão no estudo; M = masculino; F = feminino; CO = Classificação Operacional; MB = multibacilar; PB = paucibacilar; I = Indeterminada; TT = tuberculóide-tuberculóide; BT = borderline; BB = borderline-boderline; BL: borderline-lepromatosa; LL: lepromatosa-lepromatosa; CE: Classificação Espectral; TM: teste de Mitsuda; BAAR= baciloscopia de esfregaço de raspado intradérmico; I.B.= índice baciloscópio; PL = perdeu a leitura do teste de Mitsuda; N = negativo; P = positivo; NR: Não realizado;

REFERÊNCIAS

Almeida, EC, Martinez, AN, Manierom VC, Sales, AM, Dupre, NC, Sarno, EN, Santos, AR, Moraes, MO. Detection of mycobacterium leprae DNA by polymerase chain reaction in the blood and nasal secretion of Brazilian household contacts. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2004;99:509-511.

Araoz, R, Honoré, N, Cho, S, Kim, Jonh-Pill, Cho, Sang-Nae, Monot, M, Demangel, C, Brennan, PJ, Cole, ST. Antigen Discovery: a Postgenomic Approach to Leprosy Diagnosis. *Infection and Immunity*. 2006;74(1):175–182.

Araújo MG. Hanseníase no Brasil. Artigo de atualização. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2003;36:373-82.

Araújo PR, Ferreira AW. Avidity of IgG antibodies against excreted/secreted antigens of *Toxoplasma gondii*: immunological marker for acute recent toxoplasmosis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2008;41(2):142-7.

Araújo S, Goulart IMB, Cardoso AM, Marangoni K, Nunes MM, Santos FAA, Goulart LR. Detecção por PCR de infecção pelo *Mycobacterium leprae* em amostras de sangue de pacientes com hanseníase e seus contatos em Uberlândia MG. In: Resumos do 12º Congresso de La Asociación Latinoamericana de Genética e do 52º Congresso Brasileiro de Genética, Foz do Iguaçu, PR; 2006; Ribeirão Preto, São Paulo; 2006. p. 635.

Aseffa A, Brennan P, Dockrell H, Gillis T, Hussain R, Oskam L, Richardus JH. Report on the first meeting of the IDEAL (Initiative for Diagnostic and Epidemiological Assays for Leprosy) consortium held at Armauer Hansen

Research Institute, ALERT, Addis Ababa, Ethiopia. *Lepr. Rev.* 2005;76:147–159.

Bathia AS, Katoch K, Narayanan RB, Ramu G, Mukherjee A, Lavanaia RK. Clinical and histopathological correlation in the classification of leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1993;61:433–438.

Beck ST, Leite OM, Arruda RS, Ferreira AW. Combined use of Western blot/ELISA to improve the serological diagnosis of human tuberculosis. *Braz. J. Infect. Dis.* 2005;9(1):35-43.

Beck ST. Padronização e desenvolvimento de testes sorológicos para o diagnóstico da tuberculose humana [tese]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo; 2003.

Bezerra Da Cunha FM, Werneck MC, Scola RH, Werneck LC. Pure neural leprosy: diagnostic value of the polymerase chain reaction. *Muscle Nerve.* 2006; 33:409–414.

Birdi TJ, Antia NH. The macrophage in leprosy: a review on the current status. *Int J Lepr.* 1989; 57:511-525.

Bothamley GH. Serological diagnosis of tuberculosis. *Eur. Respir. J.* 1995;8(20): 676-88.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Controle da hanseníase: uma proposta de integração ensino-serviço.* Rio de Janeiro: DNDS/NUTES, 1989.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Estratégia global aprimorada para redução adicional da carga da hanseníase: 2011-2015: diretrizes operacionais (atualizadas)*. Tradução de Priscila Leiko Fuzikawa. Organização Mundial da Saúde. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE. **Guia de controle da hanseníase**. 2o ed., MS/FNS/CENEPI/CNDS, Brasília, 156 p., 1994.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Vigilância em Saúde: situação epidemiológica da hanseníase no Brasil*. Brasília (DF); 2008.

Brennan PJ, Barrow WW. Evidence for species-specific lipid antigens in *Mycobacterium leprae*. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1980;48(4):382-7.

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

Britton WJ. Immunology of leprosy. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1993;87(5):508-514.

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

Bührer SS, Smits HL, Gussenhoven GC, van Ingen CW, Klatser PR. A simple dipstick assay for the detection of antibodies to phenolic glycolipid-I of *Mycobacterium leprae*. *Am J Trop Med Hyg*. 1998;58(2):133-6.

Bührer-Sékula S. PGL-I leprosy serology. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008;41(2)2: 3-5.

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

Chae GT, Kim MJ, Kang TJ, Lee SB, Shin HK, Kim JP, Ko YH, Kim SH, Kim NH. DNA-PCR and RT-PCR for the 18-kDa gene of *Mycobacterium leprae* to assess the efficacy of multidrug therapy for leprosy. *J Med Microbiol.* 2002;51:417–422.

Chatterjee D, Cho SN, Brennan PJ, Aspinall GO. Chemical synthesis and seroreactivity of O-(3,6-di-O-methyl-beta-D-glucopyranosyl)-(1----4)-O-(2,3-di-O-methyl- alpha-L-rhamnopyranosyl)-(1----9)-oxynonanoyl-bovine serum albumin--the leprosy-specific, natural disaccharide-octyl-neoglycoprotein. *Carbohydrate Research.* 1986;156:39-56.

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

Cho SN, Fujiwara T, Hunter SW, Rea TH, Gelber RH, Brennan PJ. Use of an artificial antigen containing the 3,6-di-O-methyl-beta-D-glucopyranosyl epitope for the serodiagnosis of leprosy. *J Infect Dis.* 1984;150(3):311-22.

Chujor CS, Bernheimer H, Levis WR, Schwerer B. Serum IgA1 and IgM antibodies against *Mycobacterium leprae*-derived phenolic glycolipid-I: a comparative study in leprosy patients and their contacts. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 1991;59(3):441-9.

Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature.* 2001;409:1007-11.

Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, Honoré N, Garnier T, Churcher C, Harris D, Mungall K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies RM, Devlin K, Duthoy S, Feltwell T, Fraser A, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Lacroix C, Maclean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Quail MA, Rajandream MA, Rutherford KM, Rutter S, Seeger K, Simon S, Simmonds M, Skelton J, Squares R, Squares S, Stevens K, Taylor K, Whitehead S, Woodward JR, Barrell BG. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature.* 200;409(6823):1007-11.

Congress, Madrid. 1953. Classification. Technical Resolutions. VIth International Congress Leprol. Madri. *Int. J. Lepr.* 1953;21:504-16.

Cree IA, Srinivasan T, Krishnan SA, Gardiner CA, Mehta J, Fisher CA, Beck JS. Reproducibility of histology in leprosy lesions. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1988;56:296–301.

Croft RP, Smith WC, Nicholls P, Richardus JH. Sensitivity and specificity of methods of classification of leprosy without use of skin-smear examination. *Int. J. Lepr.* 1998;66:445-450.

CUNHA (FMB). *Reação em cadeia da polimerase (PCR): valor diagnóstico na hanseníase neural pura* [tese]. Paraná (Curitiba): Universidade Federal do Paraná; 2003.

Cunha, AZS. Hanseníase: aspectos da evolução do diagnóstico, tratamento e controle. *Ciência & Saúde Coletiva*. 2002;7(2):235-242.

D'Haucourt, G. 1984. A vida na Idade Média. Martins Fontes, São Paulo.

Daniel TM, Debanne SM. The serodiagnosis of tuberculosis and other mycobacterial diseases by enzyme-linked immunosorbent assay. *Am Rev Respir Dis*. 1987;135(5):1137-51.

Dayal R, Singh SP, Mathur PP, Katoch VM, Katoch K, Natrajan M. Diagnostic value of *in situ* Polymerase Chain Reaction in leprosy. *Ind J Pediatr*. 2005;72(12):1043-6.

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

de Wit MYL, Faber WR, Krieg SR, Douglas JT, Lucas SB, Montreewasuwat N, Pattyn SR, Hussain R, Ponnighaus JM, Hartskeerl RA, Klatser PR.

Application of the polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae* in skin tissues. *J Clin Microbiol.* 1991;29:906–910.

Dockrell HM, Geluk A, Brennan P, Saunderson, PR, Oskam L, Lockwood, DN, Xiaoman W, Richardus JH. Report on the sixth meeting of the IDEAL (Initiative for Diagnostic and Epidemiological Assays for Leprosy) consortium held in Beijing, China on 23-25 August 2010. *Lepr. Rev.* 2011;82:80–85.

Dockrell HM, Young SK, Britton K, Brennan PJ, Rivoire B, Waters MF, Lucas SB, Shahid F, Dojki M, Chiang TJ, Ehsan Q, McAdam KP, Hussain R. Induction of Th1 cytokine responses by mycobacterial antigens in leprosy. *Infect Immun.* 1996;64(10):4385-9.

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

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

Douglas JT, Cellona RV, Fajardo TT Jr, Abalos RM, Balagon MV, Klatser PR. Prospective study of serological conversion as a risk factor for development of leprosy among household contacts. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2004;11(5):897-900.

Draper, P, Kandler, O, Darbre, A. Peptidoglycan and Arabinogalactan of *Mycobacterium leprae*. *J Gen Microbiol.* 1987;133(5):1187-94.

Dubey GK, Joglekar VK, Grover S, Chaubey BS. Correlation of clinical and histopathological studies in classification leprosy. *Lepr India*. 1981;53:562–565.

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. Use of protein antigens for early serological diagnosis of leprosy. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2007;14:1400-1408.

Duthie MS, Goto W, Ireton GC, Reece ST, Sampaio LH, Grassi AB, Sousa ALM, Martelli CM, Balagon MVF., Tan E, Stefani MM, Reed SG. Antigen-specific T cell responses of leprosy patients. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2008;15:1659-1665.

EIDT, LM. Breve história da hanseníase: sua expansão do mundo para as Américas, o Brasil e o Rio Grande do Sul e sua trajetória na saúde pública brasileira. *Saúde e Sociedade*. 2004;13(2):76-88.

Engers HD, Abe M, Bloom BR, Merhra V, Buchanan TM, Khanolkar SK, Young DB, Closs O, Gillis T, Harboe M, Ivanyi J, Kolk AHJ, Shepard CC. Results of a World Health Organization-sponsored workshop on monoclonal antibodies to *Mycobacterium leprae*. *Infect Immun*. 1985;48(2):603-5.

Ferrara G, Losi M, D'Amico R, Roversi P, Piro R, Meacci M, Meccugni B, Dori IM, Andreani A, Bergamini BM, Mussini C, Rumpianesi F, Fabbri LM, Richeldi L. Use in routine clinical practice of two commercial blood tests for

diagnosis of infection with *Mycobacterium tuberculosis*: a prospective study. *Lancet*, 2006;367:1328 – 1334.

Foss, NT. Hanseníase: aspectos clínicos, imunológicos e terapêuticos. *Anais Brasileiros de Dermatologia*.1999;74(2):113-19.

Frade AF, Luquetti AO, Prata A, Ferreira AW. Western blotting method (TESAcruzi) as a supplemental test for confirming the presence of anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies in finger prick blood samples from children aged 0-5 years in Brazil. *Acta Trop*. 2011;117(1):10-3.

Frohn, W. Der aussatz im Rheinland; sein vorkommen und seine bekämpfung. *Gustav Fischer*. 1933; Jena.

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

Fujiwara T, Hunter SW, Cho SN, Aspinall GO, Brennan PJ. Chemical synthesis and serology of disaccharides and trisaccharides of phenolic glycolipid antigens from the leprosy bacillus and preparation of a disaccharide protein conjugate for serodiagnosis of leprosy. *Infect Immun*. 1984;43(1):245-52.

Gaylord H, Brennan PJ. Leprosy and the leprosy bacillus: recent developments in characterization of antigens and immunology of the disease. *Annu Rev Microbiol*. 1987;41:645–675.

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. Postgenomic approach to identify novel *Mycobacterium leprae* antigens with potential to improve immunodiagnosis of infection. *Infect Immun*. 2005;73(9):5636-44.

Geluk A, Spencer JS, Bobosha K, Pessolani MC, Pereira GM, Banu S, Honoré 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; IDEAL Consortium. From genome-based in silico predictions to ex vivo verification of leprosy diagnosis. *Clin Vaccine Immunol*. 2009;16(3):352-9.

Geluk A, van der Ploeg J, Teles RO, Franken KL, Prins C, Drijfhout JW, Sarno EN, Sampaio EP, Ottenhoff TH. Rational combination of peptides derived from different *Mycobacterium leprae* proteins improves sensitivity for immunodiagnosis of *M. leprae* infection. *Clin Vaccine Immunol*. 2008;15(3):522-33.

Geluk A, van Meijgaarden KE, Franken KL, Subronto YW, Wieles B, Arend SM, Sampaio EP, de Boer T, Faber WR, Naafs B, Ottenhoff TH. Identification and characterization of the ESAT-6 homologue of *Mycobacterium leprae* and T-cell cross-reactivity with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 2002;70: 2544–2548.

Geluk A, van Meijgaarden KE, Franken KL, Wieles B, Arend SM, Faber WR, Naafs B, Ottenhoff TH. Immunological crossreactivity of the *Mycobacterium leprae* CFP-10 with its homologue in *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand J Immunol*, 2004;59: 66–70.

Geluk A, van Meijgaarden KE, Franken KLMC et al. Identification and characterization of ESAT-6 homologue of *Mycobacterium leprae* and T-cell cross reactivity with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*, 2002;70:2544–2548.

Geluk A, van Meijgaarden KE, Franken KLMC et al. Immunological cross reactivity of the *Mycobacterium leprae* CFP-10 with its homologue in *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand J Immunol*, 2004;59:66–70.

Gigg J, Gigg R, Payne S, Conant R. The allyl group for protection in carbohydrate chemistry. 17. Synthesis of propyl O-(3,6-di-O-methyl-beta-D-glucopyranosyl)-(1----4)-O-(2,3- di-O-methyl-alpha-L-rhamnopyranosyl)-(1----2)-3-O-methyl-alpha- L-rhamnopyranoside: the oligosaccharide portion of the major serologically active glycolipid from *Mycobacterium leprae*. *Chemistry and Physics of Lipids*.1985;38:299-307.

Gomes, ACB. O processo de Armauer Hansen. *Jornal do Conselho Regional de Medicina do Rio Grande do Sul*. 2000.p.13.

Goulart IMB, Cardoso AM, Santos MS, Gonçalves MA, Pereira JE, Goulart LR. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin lesions of leprosy

patients by PCR may be affected by amplicon size. *Arch Dermatol Res.* 2007;299:267–271.

Goulart, IMB, Penna, OG, Cunha, G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2002;35(4):365-375.

Goulart, IMB; Goulart, LR .Leprosy: diagnostic and control challenges for a worldwide disease. *Arch Dermatol Res.* 2008;300:269–290.

Grimes DA; Schulz KF. Refining clinical diagnosis with likelihood ratios. *Lancet.* 2005;365:1500-05.

Groathouse NA, Brown SE, Knudson DL, Brennan PJ, Slayden RA. Isothermal amplification and molecular typing of the obligate intracellular pathogen *Mycobacterium leprae* isolated from tissues of unknown origin. *J Clin Microbiol.* 2006;44:1502–1508.

Hansen, GA. 1897. Übertragung der lepra von mensch zu mensch. Facultative oder obligatorische isolation der leprösen. In *Lepra Konferenz*, 1,1897, August Hirschwald, Berlin.

Hardas U, Lele V. Evaluation of Fluorescent microscopy for detection of *Mycobacterium leprae*. *Lepr India.* 1981;53:273–277.

Hayden SR; Brown MD. Likelihood ratio: A powerful tool for incorporating the results of a diagnostic test into clinical decisionmaking. *Ann Emerg Med.* 1999;33:575-80.

<http://www.imtech.res.in/raghava/propred>. 2008.

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

Hunter SW, Fujiwara T, Brennan PJ. Structure and antigenicity of the major specific glycolipid antigen of *Mycobacterium leprae*. *J Biol Chem.* 1982;257(24):15072-8.

Jackett PS, Bothamley GH, Batra HV, Mistry A, Young DB, Ivanyi J. Specificity of antibodies to immunodominant mycobacterial antigens in pulmonary tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 1988;26: 2313-8.

Jerath VP, Desai SR. Diversities in clinical and histopathological classification of leprosy. *Lepr India.* 1982;54:130–134.

Job CK, Baskaran B, Jayakumar J, AschoV M. Histopathologic evidence to show that indeterminate leprosy may be a primary lesion of the disease. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1997;65:443–449.

Kang TJ, Kim SK, Lee SB, Chae GT, Kim JP. Comparison of two different amplification products (the 18-kDa protein gene vs. RLEP repetitive sequence) in the diagnosis of *Mycobacterium leprae*. *Clin Exp Dermatol.* 2003;28:420–424.

Kanunfre KA. Tuberculose pulmonar: aumento da eficiência diagnóstica pela associação de métodos microbiológicos e imunológicos para pesquisa de

anticorpos IgG anti – *Mycobacterium tuberculosis* por Western Blotting e interferon gama [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007.

Kaplan G, Gandhi RR, Weinstein DE, Levis WR, Patarroyo ME, Brennan PJ, Cohn ZA. Mycobacterium leprae antigen-induced suppression of T cell proliferation in vitro. *J Immunol.* 1987;138(9):3028-34.

Kircheimer, WF, Stors, EE. Attempts to establish the armadillo (*Dasypus novemcinctus*, Linn.) as a model for the study of leprosy. 1 Report of lepromatoid leprosy in infected a experimentally infected armadillo liver. *Int J Lepr.* 1971;39:693-702.

Koelbing HM u.a.,1972. Beiträge zur geschichte der lepra. Zurich [s.n.].

Kumar SK, Rebbi BS, Ratnakar C. Correlation of skin and nerve histopathology in leprosy. *Lepr Rev.* 1996;67:119–125.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227:680-85.

Launius BK, Brown PA, Cush E, Mancini C. A case study in hansen's disease acquired after heart transplant. *Crit Care Nurs Q.* 2004;27:87–91.

Lemos EA, Belém ZR, Santos A, Ferreira AW. Characterization of the Western blotting IgG reactivity patterns in the clinical phases of acquired syphilis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2007;58(2):177-83.

Lima L de M, Content J, van Heuverswyn H, Degrave W. Nucleotide sequence of the gene coding for the 85-B antigen of *Mycobacterium leprae*. *Nucleic Acids Res.* 1991;19(20):5789.

Lobato J, Costa MP, Reis Ede M, Gonçalves MA, Spencer JS, Brennan PJ, Goulart LR, Goulart IM. Comparison of three immunological tests for leprosy diagnosis and detection of subclinical infection. *Lepr Rev.* 2011;82(4):389-401.

Locwood DNJ, Bryceson ADM. Leprosy. In: Champion RH, Burton JL, Burns M, Reathnack SM. Textbook of Dermatology. Sh ed. London: Blackwell Science; 1998, p.1215-1235.

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

Martins, MVBS. Avaliação da Resposta Imune Celular in vitro Induzida por Novos Antígenos de *Mycobacterium leprae* [tese]. Rio de Janeiro: Instituto de Microbiologia Paulo Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2006.

McDougall AC, Ponnighaus JM, Fine PE. Histopathological examination of skin biopsies from an epidemiological study of leprosy in northern Malawi. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1987;55:88–98.

Melsom R. Serodiagnosis of leprosy: the past, the present, and some prospects for the future. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1983;51(2):235-52.

Metz, CE. 1978. Basic principles of ROC analysis. *Semin. Nucl. Med*. 8(4): 283-98.

Mitsuda, K. On the value of a skin reaction to a suspension of leprous nodules. *JAP, J. Dermatol urol*, v. 19, p. 698-708, 1919. (Republicado em *Inst Lepr*, v. 21, p. 347-358, 1953).

Modi K, Mancini M, Joyce MP. Lepromatous leprosy in a heart transplant recipient. *Am J Transpl*. 2003;3:1600–1603.

Modlin RL, Bloom BR. Immune regulation: learning from leprosy. *Hosp Pract* 1993;28:71-84.

Modlin RL. Cytokine response in leprosy lesions. *Nippon Rai Gakkai Zasshi* 1995;64:85-88.

Moet FJ, Meima A, Oskam L, Richardus JH. Risk factors for the development of clinical leprosy among contacts, and their relevance for targeted interventions. *Lepr Rev*. 2004;75(4):310-26.

Moorthy BN, Kumar P, Chatura KR, Chandrasekhar HR, Basavaraja PK. Histopathological correlation of skin biopsies in leprosy. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2001;67:299–301.

Moschella, SL. An update on the diagnosis and treatment of leprosy. *J. Academy American Dermatology*. 2004;51:417-26.

Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I-Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of Immunology*. 1986;136:2348-2357.

Moura AC, Mariano M. Lipids from *Mycobacterium leprae* cell wall suppress T-cell activation in vivo and *in vitro*. *Immunology*. 1997;92(4):429-36.

Nations SP, Katz SJ, Lyde CB, Baronh RJ. Leprous neuropathy: an American perspective. *Sem Neurol*. 1998; 18: 113-124.

Nerland AH, Mustafa AS, Sweetser D, Godal T, Young RA. A protein antigen of *Mycobacterium leprae* is related to a family of small heat shock proteins. *J Bacteriol*. 1988; 170(12):5919-21.

Ng V, Zanazzi G, Timpl R, Talts JF, Salzer JL, Brennan PJ, Rambukkana A. Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. *Cell*. 2000;103:511–524.

Noordeen SK. The epidemiology of leprosy. In: Hastings RC, editors. *Leprosy*, 2nd ed. Edinburgh: Churchill-Livingstone; 1994. p.29–48.

Norman G, Joseph G, Richard J. Validity of the WHO operational classification and value of other clinical signs in the classification of leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 2004;72:278-283.

OPROMOLLA, DVA. *Noções de Hansenologia*. Ed.1. São Paulo: Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato; 2000.

Oskam L, Slim E, Bühner-Sékula S. Serology: recent developments, strengths, limitations and prospects: a state of the art overview. *Lepr Rev*. 2003;74(3):196-205.

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

Pai M, Kalantri S, Dheda K. New tools and emerging technologies for the diagnosis of tuberculosis: part I. Latent tuberculosis. *Expert Rev Mol Diagn*, 2006;6:413–422.

Parkash O, Kumar A, Pandey R, Nigam A, Girdhar BK. Performance of a lateral flow test for the detection of leprosy patients in India. *J Med Microbiol*. 2008;57(Pt 1):130-2.

Parkash O. Serological detection of leprosy employing *Mycobacterium leprae* derived serine-rich 45 kDa, ESAT-6, CFP-10 and PGL-I: a compilation of data from studies in Indian populations. *Lepr Rev*. 2011;2(4):383-8.

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

Phetsuksiri B, Rudeeaneksin J, Supakul P, Wachapong S, Mahotarn K, Brennan PJ. A simplified reverse transcriptase PCR for rapid detection of *Mycobacterium leprae* in skin specimens. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2006;48:319–328.

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

Prevedello FC, Mira MT. Hanseníase: uma doença genética? *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2007;82(5):451-9.

Rafi A, Donoghue HD, Stanford JL. Application of polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae* DNA in specimens from treated leprosy patients. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1994;63:42–47.

Ramaprasad P, Fernando A, Madhale S, Rao JR, Edward VK, Samson PD, Klatser PR, de Wit MY, Smith WC, Cree IA. Transmission and protection in leprosy: indications of the role of mucosal immunity. *Lepr Rev*. 1997;68:301–315.

Rambukkana A, Hiroshi Y, Zanazzi G, Mathus T, Salzer JI, Yurchenco PD, Campbel KP, Fichetti A. Role of α -Dystroglycan as a Schwann cell Receptor for *Mycobacterium leprae*. *Science*. 1998;282:2076-2078.

Rambukkana A, Salzeer JL, Yurchenco PD, Tuomanen EI. Neural targeting of *Mycobacterium leprae* mediated by the G domain of the laminin- α -2 chain. *Cell* 1997;88:811-821.

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

Rastogi N, Legrand E, Sola C. The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Rev Sci Tech*. 2001;20(1):21-54.

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

Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J. Lepr Other Mycobact Dis*. 1966;34:255-73.

Rodrigues LC, Lockwood DNJ. Leprosy now: epidemiology, progress, challenges, and research gap. *Lancet Infect Dis*. 2011;11:464–70.

Rosen, G. 1994. *Uma história da saúde pública*. Unesp, São Paulo.

Samanich K; Belisle JT; Laal S.. Homogeneity of antibody responses in tuberculosis patients. *Infect Immunity*. 2001;69:4600-09.

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

SAMPAIO SP, RIVITTI EA. Hanseníase. In: Dermatologia. Sao Paulo; *Artes Medicas*, 2002;40:467-487.

Sarno EM, Sampaio EP. The role of inflammatory cytokines in the tissue injury of leprosy. *Int J Lepr*. 1996;64:S69-S74.

Scollard DM, Adams LB, Gillis TP et al. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev*, 2006;19:338–381.

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

Sehgal VN, Rege VL, Reys M. Correlation between clinical and histopathological classification in leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1977;40:278–280.

Sekar, B. Recent Advances in Immunodiagnosis of Leprosy. *Indian J. Leprosy*. 2007;79(2/3):13-33.

SERVIÇO NACIONAL DE LEPRA. *Manual de leprologia*. Rio de Janeiro: Departamento Nacional de Saúde, 1960.

SHEPARD, CC. The experimental disease that follows the injection of human leprosy bacilli into foot-pads of mice. *J Exp Med*. 1960;112:445-54.

Sieling PA, Abrams JS, Yamamura M, Salgame P, Bloom BR, Rea TH, Modlin RL. Immunosuppressive roles for IL-10 and IL-4 in human infection: In vitro modulation of T cell responses in leprosy. *The Journal of Immunology*. 1993;150:5501-5510.

Sieling PA, Modlin RL. Cytokine patterns at the site of mycobacterial infection. *Immunobiology*. 1994;191:378-387.

Sieling PA, Modlin RL. Regulation of cytokine patterns in leprosy. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1994b;730:42-52.

Silva, LA. Avaliação do Western blotting e do ELISA com exo-antígenos de *Leishmania* spp do complexo donovani na detecção de infecção por *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* [tese]. Uberaba: Universidade Federal do Triângulo Mineiro; 2007.

Singh PA, Agarwal R, Misra V, Gupta SC, Bajaj AK. Clinico- histopathological concordance in leprosy. *Trop Doct*. 2000;30:228–231.

SOUZA, CS. Hanseníase: formas clínicas e diagnóstico diferencial. *Medicina*, (Ribeirão Preto). 1997;30:325-334.

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

Spencer JS, Dockrell HM, Kim HJ, Marques MA, Williams DL, Martins MV, Martins ML, Lima MC, Sarno EN, Pereira GM, Matos H, Fonseca LS,

Sampaio EP, Ottenhoff TH, Geluk A, Cho SN, Stoker NG, Cole ST, Brennan PJ, Pessolani MC. Identification of specific proteins and peptides in *Mycobacterium leprae* suitable for the selective diagnosis of leprosy. *J Immunol*. 2005;175:7930-7938.

Spencer JS, Kim HJ, Marques AM et al. Comparative analysis of B and T-cell epitopes of *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate protein-10. *Infect Immun*, 2004;72:3161 – 3170.

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; IDEAL Consortium. 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*. 2011;18(2):260-7.

Spencer JS, Marques MA, Lima MC, Junqueira-Kipnis AP, Gregory BC, Truman RW, Brennan PJ. Antigenic specificity of the *Mycobacterium leprae* homologue of ESAT-6. *Infect Immun*, 2002;70:1010–1013.

Spencer JS, Marques MM, Lima MCBS et al. Antigenic specificity of the *Mycobacterium leprae* homologue of ESAT-6. *Infect Immun*, 2002;70:1010 – 1013.

Stefani, MMA. Desafios na era pós genômica para o desenvolvimento de testes laboratoriais para o diagnóstico da hanseníase. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2008;41(Suplemento II):89-94.

Summary of the Report of The International Leprosy Association Technical Forum. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases*. 2002;70:(suppl 1).

Talhari S, Neves RG, Penna, GO, Oliveira MLW. *Dermatologia Tropical: Hanseníase*. 4.ed. Manaus, 2006.

Teixeira AC, Cruvinel DL, Roma FR., Luppino LF, Resende LHP, Sousa T, Goulart IMB. Avaliação da concordância entre exames clínicos e laboratoriais no diagnóstico da hanseníase. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2008;41(Suplemento II): 48-55.

Thole JE, Schöningh R, Janson AA, Garbe T, Cornelisse YE, Clark-Curtiss JE, Kolk AH, Ottenhoff TH, De Vries RR, Abou-Zeid C. Molecular and immunological analysis of a fibronectin-binding protein antigen secreted by *Mycobacterium leprae*. *Mol Microbiol*. 1992; 6(2):153-63.

Torres P, Camarena JJ, Gomez JR, Nogueira JM, Gimeno V, Navarro JC, Olmos A. Comparison of PCR mediated amplification of DNA and the classical methods for detection of *Mycobacterium leprae* in different types of clinical samples in leprosy patients and contacts. *Lepr Rev*. 2003;74:18–30.

Towbin N, Satehelin T, Bordon J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci (USA)*. 1979;76:43650-4.

Vaz AJ, Nunes CM, Piazza RM, Livramento JA, Da Silva MV, Nakamura PM, Ferreira AW. Immunoblot with cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis using antigen from cysticerci of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1997;57(3):354-7.

Vega-López F, Brooks LA, Dockrell HM, De Smet KA, Thompson JK, Hussain R, Stoker NG. Sequence and immunological characterization of a serine-rich antigen from *Mycobacterium leprae*. *Infect Immun.* 1993; 61(5):2145-53.

Virchow, R. 1860. Zur geschichte des aussatzes besonders. In *Deutschland nebet einer aufforderung an ärzte und geschichtsforscher*. August Hirschwald, Berlin.

Vissa, VD, Brennan, PJ. The genome of *Mycobacterium leprae*: a minimal mycobacterial gene set. *Genome Biology*.2001;2(8):1023.1-1023.8.

Weir R. Are Cytokines our key to immunity against mycobacterial diseases. *Lepr Rev.* 2000;71:268-269.

Weir RE, Brennan PJ, Butlin CR, Dockrell HM. Use of whole blood assay to evaluate in vitro T cell responses to new leprosy skin test antigens in leprosy patients and healthy subjects. *Clin Exp Immunol.* 1999;116:263–269.

WHO. Chemotherapy of leprosy for control programmes. *World Health Organ Tech Rep Ser.*1982;675: 1–33.

WHO. Leprosy for medical practitioners and paramedical workers. Geneva: Novartis Foundation for sustainable development, Basle, Switzerland, 2002. 134p.

WHO. Leprosy global situation. *Wkly Epidemiol Rec* 2009;84:333-340.

WHO. Leprosy global situation. *Wkly Epidemiol Rec.* 2002;77:1–8.

WHO. Leprosy global situation. *Wkly Epidemiol Rec.* 2010;85:337–348.

WHO. Leprosy global situation. *Wkly Epidemiol Rec.* 2011;86:389–400.

WHO. Leprosy surveillance in the Americas. *Wkly Epidem Rec.* 1984; 59(22): 165-172.

WHO. Report on the third meeting of the WHO Technical Advisory Group on the elimination of leprosy. Geneva, WHO: 2002, WHO/CDS/CPE/CEE/2002.29

Williams DL, Scollard DM, Gillis TP. PCR-based diagnosis of leprosy in the United States. *Clin Microbiol Newslett.* 2003;25:57–61.

Winter N, Triccas JA, Rivoire B, Pessolani MC, Eiglmeier K, Lim EM, Hunter SW, Brennan PJ, Britton WJ. Characterization of the gene encoding the immunodominant 35 kDa protein of *Mycobacterium leprae*. *Mol Microbiol.* 1995;16(5):865-76.

World Health Assembly. Leprosy resolution WHA 44.9, Forty-fourth World Health Assembly, May 13, 1991.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **Leprosy for medical practitioners and paramedical workers.** Geneva: Novartis Foundation for sustainable development, Basle, Switzerland, 2002. 134p

World Health Organization (WHO). Chemotherapy of leprosy for control programmes. World Health Organization, Geneva, p. 675, 1982.

World Health Organization. 1994. Study Group Chemotherapy of leprosy. Technical Report Series. 847. Geneva, Switzerland.

World Health Organization. 1997. PQT: perguntas e respostas. Revisão 1997. WHO/LEP/97.8. Geneva.

Zhang, J, Chatterjee D, Brennan PJ, Spencer JS, Liav A. A modified synthesis and serological evaluation of neoglycoproteins containing the natural disaccharide of PGL-I from *Mycobacterium leprae*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2010;20:3250–3253.

Zwerg MH & Campbell G. 1993. Receiver Operating Characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clinical Chemistry.* 39: 561-577.

APÊNDICE

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - HCFMUSP
CAIXA POSTAL, 8091 – SÃO PAULO - BRASIL

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO.:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DO TESTE IMUNOENZIMÁTICO –ELISA IgG E IgM – PARA O DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA HANSENÍASE**

PESQUISADOR : ANTÔNIO WALTER FERREIRA

CARGO/FUNÇÃO: . Vice Diretor do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (IMTSP) da Universidade de São Paulo.

REGISTRO NO CONSELHO REGIONAL DE FARMÁCIA Nº: 4806

UNIDADE DO HCFMUSP: .INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO/ AMBULATÓRIO DE DERMATOLOGIA

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO X

RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐

RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 36 MESES.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - HCFMUSP
CAIXA POSTAL, 8091 – SÃO PAULO - BRASIL

O Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, juntamente com a Faculdade de Medicina da USP e Hospital das Clínicas de São Paulo, está desenvolvendo um projeto de pesquisa que consiste no **DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE UM TESTE IMUNOENZIMÁTICO PARA O DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA HANSENÍASE**, infecção causada pelo bacilo *Mycobacterium leprae*, bactéria que causa a doença Hanseníase. Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa estudar diversos antígenos para serem utilizados para fins de diagnóstico e monitoramento de pacientes com hanseníase. Com o resultado será possível iniciar rapidamente o tratamento das pessoas que se encontrarem com a doença, contendo a sua transmissão.

Para realizar essa pesquisa, serão necessários exames de rotina para o diagnóstico da doença nos pacientes e em seus contactantes, teremos 5 grupos de estudo:

GRUPO I - Grupo Controle Positivo: Pacientes com hanseníase

Serão colhidas amostras de sangue de 40 pacientes, independente de idade, sexo e grupo étnico que estiverem sendo atendidos no ambulatório de dermatologia do Hospital das Clínicas de São Paulo (HC-SP), e que tiverem exame clínico e prova específica (histamina) positivas. No caso de reação incompleta na prova da histamina, será realizada biópsia de pele.

GRUPO II - Grupo Controle Negativo: Indivíduos sadios

Serão colhidas amostras de sangue de 40 indivíduos adultos com diagnóstico clínico negativo para hanseníase.

GRUPO III – Indivíduos Contactantes

Serão colhidas amostras de sangue de 30 indivíduos que tiveram contato com pacientes com hanseníase antes do tratamento

Grupo IV: Indivíduos com outras doenças

Serão testadas amostras de soros de 30 pacientes com outras dermatoses, adquiridas no Departamento de Dermatologia do HC-FMUSP e 20 amostras de pacientes com tuberculose ativa da soroteca já existente no Laboratório de Soroepidemiologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

Grupo V: Indivíduos com hanseníase da cidade Imperatriz-MA

Serão avaliadas amostras de 40 pacientes com hanseníase definidos por critérios epidemiológicos, bacteriológicos e diagnóstico clínico, independente da idade, sexo e grupo étnico que estiverem sendo atendidos no Centro de Referência de Dermatologia Sanitária de Imperatriz-MA.

Se você concordar em participar deste estudo, você será submetido(a) a uma entrevista a respeito das doenças que já teve, um exame clínico, exames de sangue.

Durante a pesquisa, será retirada uma amostra de sangue. Essas amostras serão usadas para verificar a presença de componentes antigênicos da bactéria e anticorpos formados contra o bacilo da hanseníase. A presença destes anticorpos pode indicar se você entrou em contato, de alguma forma, com o agente causador da hanseníase.

No caso de diagnóstico clínico positivo (PACIENTES INCLUSOS NO GRUPO I), você passará pela prova específica (histamina), procedimento muito simples, realizado por um residente, que irá pingar uma gota de cloridrato ou fosfato de histamina na pele, em seguida dar uma leve picada e após 20 segundos realizar a leitura do teste.

Caso, o teste específico (histamina) apresente reação incompleta, será necessário realizar biópsia de pele, que consiste na retirada de um pequeno fragmento de pele.

O sangue coletado, a prova específica (histamina) e a biópsia de pele serão realizadas dentro das normas de segurança e dentro das dependências do hospital (ambulatório) com risco mínimo para você. Você estará colaborando para a realização de um teste que poderá auxiliar, no futuro, no diagnóstico da hanseníase. Este estudo não trará benefício direto para você.

Caso você apresente algum evento fora de seu período de avaliação, você deverá entrar em contato com os investigadores e coordenadores deste projeto de pesquisa. Os investigadores são os Dr. Antonio Walter Ferreira, ou Janaina Miranda Bezerra, que pode ser encontrado no endereço Dr. Enéas de Carvalho Aguiar

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - HCFMUSP
CAIXA POSTAL, 8091 – SÃO PAULO - BRASIL

470 Cerqueira César, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 2 andar, Laboratório de Soroepidemiologia, pelos telefones: 3061-0416 (horário comercial) ou (99) 8812-1800.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappel@hcfm.usp.br

ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

1. Você terá a garantia, a qualquer tempo, que receberá as informações sobre os procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para o esclarecimento de qualquer dúvida.
2. Você não terá custos adicionais ao participar deste estudo. Todos os custos da consulta, dos profissionais médicos e enfermeiros e exames laboratoriais que forem parte deste estudo serão fornecidos gratuitamente. Você ou seu provedor de assistência médica serão responsáveis por quaisquer outros custos de assistência médica.
3. As pessoas envolvidas neste estudo, inclusive médicos e investigadores, terão acesso aos prontuários de forma que possam acompanhar o progresso da pesquisa. Não haverá nomes nem outra identificação dos pacientes em nenhum relatório ou publicação do estudo. Toda a informação médica adquirida durante este estudo será tratada como confidencial e será apenas dada a conhecer aos investigadores. Só os dados anônimos serão usados para possível publicação em publicações científicas. Firmamos o compromisso de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE UM TESTE IMUNOENZIMÁTICO PARA O DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA HANSENÍASE”.

Eu discuti com o **Dr. Antônio Walter Ferreira**, sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data / /

Assinatura da testemunha Data / /

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data / /