

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

**FILIPPE ROCHA LIMA**

**Anticorpos anti-Mce1A como biomarcadores sorológicos na hanseníase: diagnóstico,  
avaliação de contatos e seguimento**

**RIBEIRÃO PRETO**

**2023**

FILIPE ROCHA LIMA

**Anticorpos anti-Mce1A como biomarcadores sorológicos na hanseníase: diagnóstico,  
avaliação de contatos e seguimento**

**Versão Corrigida**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de  
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para  
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Clínica Médica -  
Investigação Biomédica

Orientador: Prof. Dr. Marco Andrey Cipriani Frade

RIBEIRÃO PRETO

2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

### FICHA CATALOGRÁFICA

Lima, Filipe Rocha

Anticorpos anti-Mce1A como biomarcadores sorológicos na hanseníase: diagnóstico, avaliação de contatos e seguimento.

87p. : il. ; 30 cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Área de concentração: Clínica Médica – Investigação Biomédica.

Orientador: Frade, Marco Andrey Cipriani.

1. Hanseníase. 2. Biomarcadores. 3. Anticorpos.  
4. Proteína Mce1A. 5. Diagnóstico. 6. Sorologia.



ATA DE DEFESA

Aluno: 17138 - 11740448 - 1 / Página 1 de 1

Ata de defesa de Tese do(a) Senhor(a) Filipe Rocha Lima no Programa: Medicina (Clínica Médica), do(a) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Aos 31 dias do mês de janeiro de 2023, no(a) FMRP-USP realizou-se a Defesa da Tese do(a) Senhor(a) Filipe Rocha Lima, apresentada para a obtenção do título de Doutor intitulada:

"Anticorpos anti-Mce1A como biomarcadores sorológicos na hanseníase: diagnóstico, avaliação de contatos e seguimento"

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra ao candidato para exposição e a seguir aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

Nome dos Participantes da Banca	Função	Sigla da CPG	Resultado
Marco Andrey Cipriani Frade	Presidente	FMRP - USP	Não Votante
Maria Carolina de Oliveira Rodrigues	Titular	FMRP - USP	APROVADO
Rodrigo Guerino Stabeli	Titular	UFSCar(FMRP)	APROVADO
Mariane Martins de Araújo Stefani	Titular	UFG - Externo	APROVADO

Resultado Final: APROVADO

Parecer da Comissão Julgadora \*

Eu, Marcia Rita Pessini \_\_\_\_\_, lavrei a presente ata, que assino juntamente com os(as) Senhores(as). Ribeirão Preto, aos 31 dias do mês de janeiro de 2023.

Maria Carolina de Oliveira Rodrigues

Rodrigo Guerino Stabeli

Mariane Martins de Araújo Stefani

Marco Andrey Cipriani Frade  
Presidente da Comissão Julgadora

\* Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatória.

A defesa foi homologada pela Comissão de Pós-Graduação em \_\_\_\_\_ e, portanto, o(a) aluno(a) \_\_\_\_\_ jus ao título de Doutor em Ciências obtido no Programa Medicina (Clínica Médica) - Área de concentração: Clínica Médica - Opção: Investigação Biomédica.

\_\_\_\_\_  
Presidente da Comissão de Pós-Graduação

Conforme resolução 7493/2018, artigo 91, §2º,  
a CPP autorizou que esta defesa fosse  
realizada em modo híbrido, com a  
participação de um ou mais examina-  
dores por meio de videoconferência em distân-  
cia. Os membros Prof. Dr. Rodrigo G. Jabeli  
de Boa Vista (RR) e Profa. Dra. Mariana Mattos  
de Jaciara Stefani de São Paulo (SP) partici-  
param virtualmente considerando o aluno  
Filipe Rocha Lima. APROVADO.

Mariana  
31/01/2023

## **FONTES DE FINANCIAMENTO**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil.

Ministério da Saúde (MS/FAEPA-FMRP-USP: 749145/2010 e 767202/2011).

Fundação Oswaldo Cruz - Ribeirão Preto (TED:163/2019 - Processo: N°25380.102201/2019-62/Projeto Fiotec: PRES-009-FIO-20).

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (2021/13429-1).

Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do HCFMRP-USP.

## DEDICATÓRIA

À Tânia Regina de Jesus Rocha Lima e Paulo Cesar Bonfim de Lima (*in memoriam*), meus genitores, com muito carinho, gratulação e alegria pelos incentivos, amor e parceria imensurável durante todos os anos de minha vida.

## AGRADECIMENTOS

*“If you want to go fast, go alone. If you want to go far, go together.”* Provérbio africano

Agradeço inicialmente ao meu orientador Prof. Dr. Marco Andrey Cipriani Frade por oportunizar o meu ingresso no doutorado, por participar ativamente da minha formação como cientista e ser humano em constante desenvolvimento, pela amizade e dedicação em fazer a diferença na vida dos seus alunos, pacientes e na sociedade de forma geral. Assim como, por possibilitar a minha atuação nas ações para controle da hanseníase no Brasil e no desenvolvimento científico e tecnológico com impacto direto para população.

Deixo registrado os meus agradecimentos a toda equipe do Laboratório de Cicatrização e Hanseníase, do Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária e Hanseníase, do ambulatório de dermatologia do HC-FMRP-USP e do Centro Saúde Escola Dr. Joel Domingos Machado (FMRP-USP) pelo apoio e por tornar viável a execução da minha tese. Agradeço aos amigos que fiz ao decorrer da minha trajetória científica, pois vocês foram fundamentais para suavizar todos esses anos dedicados à ciência.

Agradeço ao Prof. Dr. Sérgio Arruda e toda equipe do Laboratório Avançado em Saúde Pública do Instituto Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz por me iniciar na jornada acadêmico-científica e possibilitar a minha consolidação nessa linha de pesquisa. Agradeço ao Prof. Dr. Lee Riley (*in memoriam*) da UC Berkeley pela sua constante colaboração. Como também, aos pacientes e profissionais envolvidos nesse trabalho.

Expresso meu reconhecimento à Universidade de São Paulo, a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, ao Departamento de Clínica Médica (Divisão de Dermatologia) e ao Programa de Pós-graduação em Clínica Médica pela oportunidade de fazer parte dessa instituição. Agradeço às instituições de fomento por possibilitarem a execução do meu doutorado, como também, ao Ministério da Saúde e Fundação Oswaldo Cruz – Ribeirão Preto por subsidiar as nossas pesquisas e ações do CRNDSHansen – HCFMRP - USP.

Minha imensa gratidão aos meus pais Paulo Cesar (*in memoriam*) e Tânia Regina por permitirem a minha chegada até aqui e por me conduzirem com muita dedicação, amor e lapidarem o meu caminhar garantindo a minha evolução, assim como, toda a minha família, em especial a minha irmã Priscila Lima e minha sobrinha Maria Eduarda. Agradeço ao meu marido, João Betarello, por todo incentivo, parceria e por demonstrar o quanto o amor é a verdade do momento. Meus agradecimentos a minha sogra Francisca Andréia. Amigos, obrigado por toda motivação, colaboração e apoio, pois sem vocês os dias não seriam tão alegres e especiais.

*Mo dúpé Òrìṣà* por todas as energias emanadas, proteção e por permitir o alcance dos meus objetivos. Agradeço a *Ìyá* Maria de Fátima e toda a família *Osín Imolè*.

## **EPÍGRAFE**

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará a seu tamanho original.”

Albert Einstein

## RESUMO

LIMA, F. R. **Anticorpos anti-Mce1A como biomarcadores sorológicos na hanseníase: diagnóstico, avaliação de contatos e seguimento.** 2022. Tese (Doutorado em Clínica Médica) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2022.

A hanseníase é uma doença crônica infectocontagiosa, causada por *Mycobacterium leprae* e *Mycobacterium lepromatosis*. A principal consequência da doença são as deformidades levando à incapacidade física. As dificuldades vividas na prática diária dos serviços de saúde e as limitações dos testes laboratoriais quanto ao diagnóstico das diferentes formas clínicas e a identificação precoce dos comunicantes infectados são importantes fatores que não nos permite controlar a magnitude que essa doença representa no Brasil. Com isso, a aplicação da proteína de superfície Mce1A vem se demonstrando como um possível avanço para prospecção de ensaios sorológicos por ELISA. Mce1A (52 kD) é uma proteína da parede celular do gênero *Mycobacterium*, que confere grande capacidade de aderência, invasão e sobrevivência em células do hospedeiro. Os resultados já publicados pelo grupo sugerem que os testes sorológicos propostos podem ser usados como um método fácil, não invasivo e de baixo custo para suporte ao diagnóstico na hanseníase. Para tal foi realizado um novo estudo de corte transversal bidirecional entre 2020 e 2022. Os grupos do estudo são classificados em controles endêmicos (voluntários saudáveis), comunicantes intradomiciliares dos casos de hanseníase e pacientes casos novos com e sem utilização da PQT. Os ensaios laboratoriais consistem em avaliar a resposta imune humoral através da pesquisa de anticorpos das classes IgA, IgM, IgG  $\alpha$ -Mce1A pelo método de ELISA indireto *in house*, comparar com o teste sorológico  $\alpha$ -PGL-I e o diagnóstico molecular (DNA) PCR-RLEP. Na região endêmica de Parnaíba-PI, IgG  $\alpha$ -Mce1A obteve uma sensibilidade e especificidade de 94,7% e 100%, respectivamente. Indivíduos IgM  $\alpha$ -Mce1A positivos tiveram 3,6 chance de serem diagnosticados com hanseníase [OR = 3,6 (95% CI = 1,1-11,6); p = 0,028], enquanto os indivíduos IgA-positivos tiveram uma chance de 2,3 [OR = 2,3 (IC 95% = 1,2-4,3); p = 0,005]. IgA é um biomarcador ideal para confirmar o contato com o bacilo com soropositividade de 88,2%, 92,3% e 52,6% para contatos, casos novos e pacientes tratados, respectivamente. Já na região de Ribeirão Preto-SP, IgA  $\alpha$ -Mce1A obteve acurácia de 90%, 77,5% de sensibilidade, 89% especificidade, 77,5% de pacientes e 65,7% de comunicantes soropositivos. ELISA IgM  $\alpha$ -Mce1A 87% de acurácia, 76,5% de sensibilidade, 88% de especificidade com 76,5% e 70,5% dos casos novos e contatos positivos, respectivamente. 75% de acurácia foi identificada no ELISA IgG  $\alpha$ -Mce1A e demonstrou que pode ocorrer uma menor frequência (61,5%) em regiões de menor endemicidade e alta soroprevalência em casos novos de região hiperendêmica (84%), sendo o anticorpo testado de maior especificidade (96%). A sorologia  $\alpha$ -PGL-I mostrou pior desempenho com propabilidade de detecção dos casos novos em 34,6%. Paralelo aos estudos supracitados, uma avaliação de acurácia dos testes laboratoriais (baciloscopia, PCR e sorologia  $\alpha$ -PGL-I) foi desenvolvido demonstrando a superioridade da sorologia e biologia molecular em comparação a baciloscopia para diagnosticar hanseníase. Por fim, sugere-se que os anticorpos IgA é um marcado de contato bacilar, IgM na detecção de doença ativa e triagem de infecção subclínica, sendo negativo nos casos tratados avaliados, e IgG apresentando sua maior soropositividade em pacientes após uso da PQT. Portanto, os resultados encontrados permitem contribuir para o melhor entendimento do papel desta proteína na patogênese da hanseníase, além de identificar potenciais biomarcadores para execução de plataformas de diagnóstico aplicáveis nas unidades básicas e especializadas de saúde, se tornando um importante avanço tecnológico para o diagnóstico

precoce da hanseníase com implicações direta na quebra da cadeia de transmissão da doença, além de evitar incapacidade, deformidades e manutenção do estigma da doença.

Palavras-chave: Hanseníase. Biomarcadores. Anticorpos. Proteína Mce1A. Diagnóstico. Sorologia.

## ABSTRACT

LIMA, F. R. **Anti-Mce1A antibodies as serological biomarkers in Hansen's disease: diagnosis, evaluation in contacts and follow-up.** 2022. Tese (Doutorado em Clínica Médica) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2022.

Hansen's disease is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium lepromatosis*. The main consequence of the disease is deformities leading to physical disability. The difficulties experienced in the daily practice of health services and the limitations of laboratory tests regarding the diagnosis of different clinical forms and the early identification of infected contacts are important factors that do not allow us to control the magnitude that this disease represents in Brazil. Thus, the application of the surface protein Mce1A has been demonstrated as a possible advance for the prospecting of serological assays by ELISA. Mce1A (52 kD) is a cell wall protein of the *Mycobacterium* genus, which confers great capacity for adherence, invasion, and survival in host cells. The results already published by the group suggest that the proposed serological tests can be used as an easy, non-invasive, and low-cost method to support the diagnosis of Hansen's disease. To this end, a new bidirectional cross-sectional study was carried out between 2020 and 2022. The study groups are classified as endemic controls (healthy volunteers), household contacts of Hansen's disease cases, and patients with new cases with and without MDT use. Laboratory tests consist of evaluating the humoral immune response by searching for antibodies of the IgA, IgM, IgG  $\alpha$ -Mce1A classes by the indirect in-house ELISA method, comparing with the  $\alpha$ -PGL-I serological test and molecular diagnosis PCR-RLEP (DNA). In the endemic region of Parnaíba-PI, IgG  $\alpha$ -Mce1A obtained a sensitivity and specificity of 94.7% and 100%, respectively. IgM  $\alpha$ -Mce1A positive individuals had a 3.6 chance of being diagnosed with Hansen's disease [OR = 3.6 (95% CI = 1.1-11.6); p = 0.028], while IgA-positive individuals had a chance of 2.3 [OR = 2.3 (95% CI = 1.2-4.3); p = 0.005]. IgA is an ideal biomarker to confirm contact with the bacillus with seropositivity of 88.2%, 92.3%, and 52.6% for contacts, new cases, and treated patients, respectively. In the region of Ribeirão Preto-SP, IgA  $\alpha$ -Mce1A obtained 90% accuracy, 77.5% sensitivity, 89% specificity, 77.5% of patients, and 65.7% of seropositive contacts.  $\alpha$ -Mce1A IgM ELISA 87% accuracy, 76.5% sensitivity, and 88% specificity with 76.5% and 70.5% of new cases and positive contacts, respectively. 75% of accuracy was identified in the IgG  $\alpha$ -Mce1A ELISA and demonstrated that a lower frequency (61.5%) may occur in regions of lower endemicity and high seroprevalence in new cases of the hyperendemic region (84%), with the antibody tested being of greater specificity. (96%). The  $\alpha$ -PGL-I serology showed the worst performance with a 34.6% probability of detecting new cases. Parallel to this study, an evaluation of the accuracy of laboratory tests (bacilloscopy, PCR, and  $\alpha$ -PGL-I serology) was developed demonstrating the superiority of serology and molecular biology compared to bacilloscopy to diagnose Hansen's disease. Finally, it is suggested that IgA antibodies are a bacillary contact marker, IgM in the detection of active disease and subclinical infection screening, being negative in the evaluated treated cases, and IgG presenting its highest seropositivity in patients after using MDT. Therefore, the results found allow us to contribute to a better understanding of the role of this protein in the pathogenesis of Hansen's disease, in addition to identifying potential biomarkers for the implementation of diagnostic platforms applicable in basic and specialized health units, becoming an important technological advance for early diagnosis of Hansen's disease with direct implications for

breaking the chain of transmission of the disease, in addition to preventing disability, deformities, and maintenance of the disease's stigma.

Keywords: Hansen's disease. Biomarkers. Antibodies. Mce1A protein. Diagnosis. Serology.

## ESTRUTURAÇÃO DA TESE

A tese foi estruturada no modelo de coletânea de artigos e dividida em três capítulos sendo composta por: Introdução, Revisão da Literatura, Justificativa, Objetivos, Resultados (Capítulo 1, Capítulo 2 e Capítulo 3), Conclusão, Referências e Anexos.

O objetivo geral e objetivos específicos da tese são explanados nos três capítulos dos resultados. O primeiro e segundo capítulos são formados pelos manuscritos publicados na revista *Frontiers in Medicine* nas seções *Infectious Diseases – Surveillance, Prevention and Treatment* e *Pathology*, respectivamente. O terceiro capítulo é formado pelo manuscrito aceito para publicação na revista *Frontiers in Medicine* na seção *Pathology*.

A conclusão foi realizada com base nos três capítulos de resultados e no objetivo principal do trabalho em validar o imunoensaio proposto como método sorológico para diagnóstico e seguimento na hanseníase, assim como, triagem dos contatos de pacientes com hanseníase.

As referências alocadas ao final dessa tese são referentes as citações da Introdução, e Revisão da Literatura, tendo em vista, que a lista de referências específicas ao capítulo 1, 2 e 3 dos resultados se encontram ao final de cada manuscrito.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES E FIGURAS

- Figura 1.** Resumo gráfico do protocolo de pesquisa e evidencias encontradas no estudo. 39
- Figura 2.** Figure 1. Biomarkers for the diagnosis of HD patients and their contacts. 62
- Figura 3.** Figure 2. Simultaneous analysis of  $\alpha$ -Mce1A antibodies in the clustering of groups. 63
- Figura 4.** Figure 3. Contrasting Shapley values for impact on HD diagnosis for all antibodies against Mce1A protein. 64
- Figura 5.** Figure 4. Immunoglobulins against Mce1A protein correlate weakly and moderately. 65
- Figura 6.** Figure 5. Anti-Mce1A biomarkers can cluster hierarchically. 65
- Figura 7.** Figure 6. Proposed model of the stimulus and utility of specific antibodies against Mce1A protein in the laboratory diagnosis of HD based on the levels of seropositivity for patients, household contacts and endemic controls. 66

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Table 1. Study population characteristics (N=405).	60
<b>Tabela 2.</b> Table 2. Comparison of the performance of IgA, IgM and IgG $\alpha$ -Mce1A protein and IgM $\alpha$ -PGL-I for the diagnosis of new HD Cases (n=200)	60
<b>Tabela 3.</b> Table 3. Positivity profile of serological biomarkers in HD diagnosis	61

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
APGL-I	Anti-glicolípídeo fenólico-I
ApoB	Apoproteína B
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
BI	<i>Bacterial index</i>
BSA	Albumina sérica bovina
C	Citosina
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CD 209	Cluster de diferenciação 209
CD163	Cluster de diferenciação 163
CD36	Cluster de diferenciação 36
CEP	Cômite de Ética em Pesquisa
CI	Confidence interval
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CONITEC	Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sistema Único de Saúde
CRNDSHasen	Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária e Hanseníase
Ct	<i>Cycle threshold</i>
CTLA-4	Antígeno-4 associado ao linfócito T citotóxico
DD	Dimorfa-dimorfa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
DT	Diomorfa-tuberculóide
DV	Diomorfa-virchowiana
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ENH	Eritema nodoso hansênico
FAEPA	Fundação de Apoio e Ensino, Pesquisa e Assistência
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
G	Guanina
QUADAS-2	Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico
Hab	Habitantes
HC	Hospital das Clínicas
HD	<i>Hansen's disease</i>
HDP	<i>Hansen's disease patients</i>
HI	Hanseníase inderteminada
HT	Hanseníase tuberculóide
HV	Hanseníase virchowiana
IC	Intervalo de confiança

IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
Ig	Imunoglobulina
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL-10	Interleucina-10
IL-15	Interleucina-15
IL-17A	Interleucina-17A
IL-17F	Interleucina-17F
IL-2	Interleucina-2
IL-21	Interleucina-21
IL-22	Interleucina-22
IL-4	Interleucina-4
IQR	Intervalo interquartilico
kD	Quilodalton
LAM	Lipoarabinomanano
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDL-R	Receptor de lipoproteína de baixa densidade
LID-1	Proteína recombinante de fusão
LILRA2	Receptor semelhante a imunoglobulina leucocitária membro da subfamília A 2
LRP-1	Proteína 1 relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade
M	Molar
MB	Multibacilar
Mb	Milhões de pares de base
Mce	Proteínas de entrada na célula de mamífero
Mce1A	Proteína de entrada na célula de mamífero 1 A
mce1A	Gene da proteína de entrada na célula de mamífero 1 A
mL	Mililitro
MS	Ministério da Saúde
N	Normal
N-HDP	<i>Non Hansen's disease patients</i>
NB2	Nível de biossegurança 2
ND-O-BSA	Dissacarídeo natural-octil-albumina sérica bovina
NDO-HSA	Dissacarídeo natural-octil-albumina sérica humana
NDO-LID	Dissacarídeo natural-octil-Proteína recombinante de fusão
ng	Nanogramas
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	<i>Odds ratio</i>
pb	Pares de bases
PB	Paucibacilar
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PGL-I	Glicolípido fenólico-I

PLS-DA	<i>Partial least squares-discriminant analysis</i>
PQT	Poliquimioterapia
qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i>
RLEP	Regiões de elementos repetitivos específicos
ROC	Curvas de características de operação do receptor
RR	Reação Reversa
SR-B1	<i>Receptor scavenger – B1</i>
SSS	<i>Slit-skin smear</i>
STARD	<i>Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy Studies</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
T	Timina
T.A.	Temperatura ambiente
TB	Tuberculose
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF- $\beta$	Fator de crescimento tecidual- $\beta$
Th1	<i>T helper 1</i>
Th17	<i>T helper 17</i>
Th2	<i>T helper 2</i>
TLR	<i>Toll like receptor</i>
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF	Fator de necrose tumoral
Treg	T regulatória
USP	Universidade de São Paulo
VIP	Variável de importância na projeção
WHO	<i>World Health Organization</i>
$\mu$ L	Microlitro
$\mu$ M	Micromolar

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	21
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b>	22
2.1 EPIDEMIOLOGIA DA HANSENÍASE	22
2.2 AGENTE ETIOLÓGICO	23
2.3 DESENVOLVIMENTO E CLASSIFICAÇÃO DA HANSENÍASE	24
2.4 RESPOSTA IMUNE NA HANSENÍASE	25
2.5 PROTEÍNA Mce1A	27
<b>2.5.1 Proteína Mce1A e a produção de anticorpos</b>	29
2.6 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	29
<b>2.6.1 Baciloscopia do raspado intradérmico</b>	30
<b>2.6.2 Histopatologia da biópsia de pele</b>	30
<b>2.6.3 Sorologia</b>	30
<b>2.6.4 Exame molecular</b>	31
<b>3 JUSTIFICATIVA</b>	33
<b>4 OBJETIVOS</b>	34
4.1 OBJETIVO GERAL	34
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
<b>5 RESULTADOS</b>	35
5.1 CAPÍTULO 1	35
<b>5.1.1 Artigo original publicado</b>	35
5.2 CAPÍTULO 2	38
<b>5.2.1 Artigo original publicado</b>	38
5.3 CAPÍTULO 3	41
<b>5.3.1 Manuscrito aceito para publicação</b>	40
<b>6 CONCLUSÃO</b>	67
<b>REFERÊNCIAS</b>	69
<b>ANEXOS</b>	74
ANEXO 1 – Parecer Consubstanciado do CEP	74
ANEXO 2 – TCLE	78
ANEXO 3 – Artigo 1 correlacionado publicado durante o doutorado	82
ANEXO 4 – Artigo 2 correlacionado publicado durante o doutorado	83
ANEXO 5 – Artigo 3 correlacionado publicado durante o doutorado	84

ANEXO 6 – Artigo 4 correlacionado publicado durante o doutorado	85
ANEXO 7 – Registro do artigo referente ao capítulo 3 da tese aceito para publicação	86

## 1 INTRODUÇÃO

Hanseníase é uma doença infecciosa, de evolução crônica e tratável que tem como agentes etiológicos os bacilos *Mycobacterium leprae* e *Mycobacterium lepromatosis*. A sua transmissão ocorre com o contato com o paciente bacilífero através da mucosa nasal e oral. O bacilo compromete a pele e os nervos periféricos, podendo deixar graves sequelas quando não há intervenção terapêutica precoce (BRITTON, LOCKWOOD, 2004; OMS, 2021).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), 202.256 novos casos de hanseníase foram registrados globalmente em 2019, de acordo com números oficiais de 161 países das 6 regiões da OMS. No Brasil, no mesmo ano, foram notificados 27.863 casos novos, sendo classificado como país de alta endemicidade, ocupando o segundo lugar na posição mundial, representando 93% do total de casos dos países das Américas, fazendo parte dos países prioritários na estratégia global de hanseníase e constituindo a hanseníase como um importante problema de saúde pública (OMS, 2021).

Diante do grave problema de saúde pública e do estigma que a hanseníase representa, evidencia-se a necessidade de intensificar o desenvolvimento de ações direcionadas para o diagnóstico precoce, tratamento, seguimento dos casos e cura, com o objetivo de eliminar fontes de infecção e evitar sequelas físicas (BRITTON, LOCKWOOD, 2004). Entretanto, distintas características clínicas, bacteriológicas, imunológicas e histopatológicas compõem o espectro da doença e expressam a relação entre a patogenicidade do bacilo e a resposta imune do hospedeiro, o que dificulta e inviabiliza o controle da doença (OMS, 2019). Para isso, novas plataformas tecnológicas de testes laboratoriais, capacidade de identificar pacientes em com as diferentes formas clínicas e os indivíduos com infecção subclínica se estabelecem como metas da OMS no que tange o investimento em pesquisas para diagnóstico de doença e infecção (OMS, 2021).

O diagnóstico é, ainda hoje, baseado principalmente na clínica através da identificação de sinais dermatológicos e neurológicos, tendo em vista, a performance variável dos testes laboratoriais existentes para detecção dos casos da doença e na triagem dos contatos (BRASIL, 2017). Diante disso, antígenos de membrana e/ou da parede de superfície desempenham um importante papel na interação hospedeiro-bacilo uma vez que estas são as primeiras moléculas a interagir com a célula hospedeira (FLESSELLES et al, 1999). Nesse contexto, um antígeno que pode representar um possível avanço no diagnóstico e controle da doença é a proteína de

superfície *mammalian cell entry* 1A (Mce1A), presente no gênero *Mycobacterium*, e que possui papel relevante durante a resposta imunológica (ARRUDA et al, 1993).

Assim, as diversas apresentações clínicas, a falta de protocolos padronizados que direcionem a classificação e o manejo dos episódios reacionais, bem como suas possíveis repercussões na progressão do grau de incapacidade física são fatores que dificultam o controle da doença no país. Associado as dificuldades inerentes aos aspectos clínicos da doença, na prática, não existe nenhum teste laboratorial sorológico para o diagnóstico precoce da infecção assintomática por *M. leprae*, para prever a progressão das formas clínicas da doença entre os indivíduos infectados e/ou doentes. Portanto, a presente tese tem como objetivo principal a validação dos anticorpos contra a proteína Mce1A como potenciais biomarcadores sorológicos no diagnóstico de novos casos, seguimento de pacientes em tratamento e triagem dos contatos.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 EPIDEMIOLOGIA DA HANSENÍASE**

Em 2019, 27.864 novos casos de hanseníase foram notificados no Brasil, equivalente a 93% de todos os casos da região das Américas e 13,7% dos casos globais registrados no ano. O Brasil é o primeiro no mundo em registros de novos casos por habitante e o segundo em novos casos por ano (OMS, 2021). 9,9% dos casos diagnosticados foram no estágio avançado da doença, no grau 2 de incapacidade física, quando existem deformidades e sequelas físicas visíveis. Entre 2010 e 2019, aproximadamente, 20.700 brasileiros tiveram sequelas físicas incapacitantes, como perda de extremidades e deformidade nos pés e mãos causadas pela falta de tratamento ou diagnóstico tardio da hanseníase. 1.550 crianças e adolescentes menores de 15 anos foram diagnosticados com a doença, representando 5,5% dos casos brasileiros (BRASIL, 2021).

A taxa de detecção geral dos novos casos foi de 13,23 por 100 mil habitantes, mais de 13 vezes maior que o recomendado pela OMS para 2020. A taxa de prevalência da hanseníase foi de 1,50 para cada 10 mil habitantes, considerada de alta endemicidade. Os estados com a maior taxa de novos casos foi Mato Grosso e Tocantins com 129,38 casos por 100 mil hab e 96,44 casos por 100 mil hab, respectivamente (BRASIL, 2021). No estado de São Paulo, 1.185 novos casos foram notificados e com um coeficiente de detecção de 2,58 por 100 mil hab, sendo classificado nos parâmetros de endemicidade como médio. Ribeirão Preto, município com alta endemicidade no ano de 2019, obteve 95 casos novos notificados com um coeficiente de 13,5

por 100 mil hab (SES-SP, 2020). A heterogeneidade da distribuição dos casos no território nacional e os indicadores epidemiológicos do Brasil no âmbito global evidenciam o cenário de transmissão continuada e ratificando a doença como prioritária dentre os problemas de saúde no país (OMS, 2021).

O boletim epidemiológico divulgado em 2021 pela OMS registrou 127.558 novos casos em 139 países e uma prevalência de 129.389 pacientes em tratamento (16,7 por milhão de habitantes). Sendo considerado uma redução de 37% na detecção de casos novos em comparação a 2019, como resultado do impacto da pandemia COVID-19 para os programas de controle da hanseníase (OMS, 2021).

## 2.2. AGENTE ETIOLÓGICO

A descoberta de *M. leprae* por Gerhard Armauer Hansen em 1873 permitiu um avanço na medicina ratificando que os patógenos são causadores de doenças, que as condições sociais são agentes determinantes para o desenvolvimento das doenças e desmistificando os postulados hipotéticos associados a religião sobre o desenvolvimento dessa enfermidade, no período, ainda denominada de lepra (IRGENS, 1984).

*M. leprae* é um bacilo reto ou levemente encurvado, com extremidades arredondadas de coloração álcool-ácido resistente, medindo 1–8 µm de comprimento e 0,3 µm de diâmetro (HIRATA, 1985). *M. leprae* ou bacilo de Hansen pertencente a classe *Schizomycetes*, ordem *Actinomycetales*, família *Mycobacteriaceae* e gênero *Mycobacterium* (SKERMAN et al, 1980). Trata-se de um parasita intracelular obrigatório, imóvel, aeróbio, de crescimento lento por divisão binária com média de crescimento entre 12-14 dias e não cultivável *in vitro*. *M. leprae* permanece viável por 9 dias no meio ambiente e a temperatura ideal para sua sobrevivência e proliferação está entre 27-30 °C, explicando a sua predileção por sítios anatômicos mais superficiais no hospedeiro humano como pele, nervos periféricos, testículos e vias aéreas superiores, e envolvimento visceral inferior (LASTÓRIA, ABREU, 2014).

*M leprae* possui a capacidade de forma matrizes capsulares e estruturas espumosas responsáveis pela ligação de várias células bacterianas gerando aglomerados ou globias (NISHIURA et al, 1969). A parede celular das micobactérias consiste em uma membrana externa, análoga à das bactérias Gram-negativas, ligada ao peptidoglicano por meio de um polissacarídeo de conexão arabinogalactano (BHAMIDI et al, 2011). A parede celular ligada à membrana plasmática é composta por peptidoglicanos conjugados a polissacarídeos de cadeia ramificada, como os ácidos micólicos e lipoarabinomanano (LAM). A cápsula possui lipídios,

especialmente dimiocerosato de ftiocerol e glicolípido fenólico (PGL-I), que possui um trissacarídeo ligado aos lípidios por uma molécula de fenol, sendo este trissacarídeo antigenicamente específico para *M. leprae* (LASTÓRIA, ABREU, 2014). Esses complexos glicolípídios desempenham diferentes funções na interação bacilo-hospedeiro, a exemplo do trissacarídeo específico presente na molécula do PGL-I que desempenha um papel fundamental para o tropismo do bacilo aos nervos periféricos e no estabelecimento da infecção nas células de Schwann (NG et al, 2000).

Mais recentemente, distintas características clínico-patológicas apresentadas por uma forma clínica avançada e difusa da doença levaram a propor *Mycobacterium lepromatosis* como nova espécie causadora da hanseníase. Assim, sendo responsável por parte da variabilidade clínica e geográfica da hanseníase no mundo, apesar de ainda ser limitado o número de estudos sobre as implicações da nova espécie no diagnóstico da hanseníase (Han et al, 2008).

### 2.3 DESENVOLVIMENTO E CLASSIFICAÇÃO DA HANSENÍASE

Os sinais cardinais da hanseníase são lesões cutâneas com sensibilidade alterada e/ou nervos periféricos espessados evidenciando sinais e sintomas neurológicos e/ou presença de bacilos álcool-ácido resistentes nos exames laboratoriais (OMS, 2021). A investigação clínica dos sinais cardinais da doença possui uma sensibilidade ao diagnóstico de 97% (MOSCHELLA, 2004; BRASIL, 2021).

O desenvolvimento da enfermidade pode se manifestar com lesões hipocromiantes com alteração de sensibilidade, estágio inicial, em geral transitório e/ou um quadro inicial exclusivamente neurológico classificado a doença como uma enfermidade primariamente neural (TOMASELLI et al, 2021). Em caso de progressão, a resposta imune específica do hospedeiro frente ao bacilo, diferenças genéticas do hospedeiro e modulações exercidas por *M. leprae* no sistema imune irão definir os padrões da doença. Na forma clínica inicial a proliferação do bacilo, encontra-se a doença localizada, a hanseníase tuberculóide (HT), que expressa resposta imune inflamatória e granulomatosa na tentativa de destruição bacilar. Já na forma clínica de alta suscetibilidade, associado à deficiência da imunidade celular específica ao bacilo, encontra-se a forma disseminada e altamente contagiosa, a hanseníase virchowiana (HV). Esta forma clínica decorre da incapacidade da resposta imune em impedir a multiplicação e eliminação do bacilo. As formas interpolares, dimorfa-tuberculóide (DT), dimorfa-dimorfa (DD) e dimorfa-virchowiana (DV) refletem graduais variações da resposta efetora ao bacilo que

tendem a se aproximar das características de cada uma das formas polares HT ou HV (de SOLDENHOFF, 1994; RIDLEY, JOPLING, 1966).

A classificação de Ridley e Jopling envolve aspectos clínicos, patológicos, baciloscópicos e imunológicos, permitindo uma caracterização completa das formas polares HT, HV e das formas interpolares DT, DD, DV (RIDLEY, JOPLING, 1966; RIDLEY, 1974). Uma sexta classificação, hanseníase indeterminada (HI) também é comumente usada para caracterizar os estágios iniciais da doença (RODRIGUES et al, 2016). De acordo com a classificação da OMS, com base na avaliação dermatoneurológica e laboratorial, os pacientes são classificados em dois grupos que orientam o tratamento: a forma menos grave denominada paucibacilar (PB) compreendendo os casos de HI e HT e os casos mais avançados denominados multibacilares (MB) que aloca as formas interpolares e a HV (BRASIL, 2017; OMS, 2021).

A evolução crônica e insidiosa da doença pode ser sobreposta por fenômenos inflamatórios agudos conhecidos como reações hansênicas. Os episódios reacionais podem incidir em qualquer uma das formas clínicas, antes, durante ou após a instituição do tratamento com a poliquimioterapia (PQT). Os dois tipos de reações hansênicas: Tipo 1 ou reação reversa (RR) e Tipo 2 ou eritema nodoso hansênico (ENH) refletem processo inflamatório imuno-mediado, envolvendo mecanismos de hipersensibilidade tipo IV e III, respectivamente. Os estados reacionais são uma das principais causas de neurites provocadas pela hanseníase (BECX-BLEUMINK, 1992; NAAFS, 1994; BRITTON, LOCKWOOD, 2004;). Portanto, é importante que o diagnóstico das reações seja feito precocemente, para se dar início imediato ao tratamento antirreacional, visando à prevenção de deformidades e incapacidade.

#### 2.4 RESPOSTA IMUNE NA HANSENÍASE

*M. leprae* modula um espectro amplo e excepcional de características clinicopatológicas nos indivíduos suscetíveis ao desenvolvimento da doença. A capacidade particular de cada hospedeiro desenvolver um padrão de intensidade da resposta imune celular ao bacilo permitiu consolidar as afirmativas basilares que justificam a diversidade das apresentações clínicas. As evidências histopatológicas antecederam o reconhecimento dos linfócitos T e B e tornou a hanseníase um modelo extremamente importante para a compreensão da imunidade celular humana (SKINSNES, 1964)

A resposta imune inata é ativada por *M. leprae* por meio de receptores toll-like (TLR) 2/1 (KRUTZIK et al, 2003). Inicialmente, o perfil de ativação celular com a participação da interleucina-15 (IL-15) estimula os mecanismos antimicrobianos dependente de vitamina D em

macrófagos e inibe a fagocitose das micobactérias (JULLIEN et al, 1997). Esses eventos promovem uma resposta de citocinas de linfócitos T com perfil T *helper* 1 (Th1) produtores de citocinas como interferon-  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), IL-2, fator de necrose tumoral (TNF) e IL-15 que controla a infecção e induz a formação de granulomas, assim como, orquestra o desenvolvimento de uma resposta Th17 com produção de IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22 que leva à inflamação e destruição do tecido, recrutamento de neutrófilos, ativação de macrófagos e aumento de células efetoras Th1 caracterizando os eventos imunopatológicas da forma polar HT (SADHU et al, 2016; FONSECA et al 2017).

Em pacientes com forma clínica HV, ocorre um aumento de citocinas como IL-4 e IL-10, receptor semelhante a imunoglobulina leucocitária membro da subfamília A 2 (LILRA2) e o envolvimento de fosfolipídios oxidados inibindo as respostas de citocinas induzidas por TLR2/1, mas preservando a liberação de IL-10 (JULLIEN et al, 1997). Além disso, imunocomplexos desencadeiam a produção de IL-10 e aumentam a fagocitose de *M. leprae*. Como também, são ativados por macrófagos através dos receptores cluster de diferenciação 209 (CD209) e CD163 mecanismos mediados por apoproteína B (ApoB), complexo haptoglobina-hemoglobina e fosfolipídios oxidados, sem ativar a via antimicrobiana dependente da vitamina D. Esses eventos, resultam no acúmulo de gotículas de lipídios dentro dos macrófagos gerando o padrão de célula espumosa (RATLEDGE, DOVER, 2000; PHILIPPIDIS et al, 2004; FONSECA, 2017).

Há uma regulação positiva da perilipina do tecido adiposo, proteína relacionada à diferenciação no complexo retículo endoplasmático-Golgi com a formação de vesículas contendo lipídios, fosfolipídios, éster de colesterol e colesterol. Logo, há um aumento na síntese de receptores de lipoproteína de baixa densidade (LDL) como CD36, receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDL-R), receptor *scavenger* – B1 (SR-B1), e proteína 1 relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade (LRP-1), assim como, a captação de colesterol endógeno que se acumula intracelularmente. Em resumo, esses mecanismos imunes induzem um perfil imunológico Th2 e T regulatório (Treg), com a produção de IL-4 e IL-10, indução da produção de anticorpos, ausência de resposta granulomatosa e o favorecimento de um perfil de susceptibilidade para o crescimento do bacilo (HALVORSEN et al, 2005; CRUZ et al, 2008; RUSSELL et al, 2009; de MATTOS et al, 2012; FONSECA et al 2017).

Dando continuidade as habilidades imunomodulatórios do bacilo no sistema imune do hospedeiro, *M. leprae* é capaz de evadir a resposta imune gerando o acúmulo de corpúsculos lipídicos nas células infectadas, modulação de microRNA supressores da atividade inflamatória Th1 e reprogramação de células de Schwann nos nervos periféricos, como também,

estimulando moléculas supressoras da atividade celular, como antígeno-4 associado ao linfócito T citotóxico (CTLA-4), interferindo nos mecanismos de morte celular programada e de ativação de células T (PARK et al, 2016).

Embora a imunidade celular esteja presente na maioria dos fenômenos de interação bacilo-hospedeiro, a imunidade humoral também participa. As formas da manifestação da doença dependem da resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro, sendo a HT caracterizada por baixos títulos de anticorpos, devido a forte indução e predomínio de células Th1 e Th17. Enquanto a HV está associada a um relativo aumento na resposta Th2 e Treg (NARAYAN et al, 2001; FONSECA et al, 2017). O resultado é a fraca imunidade mediada por células, o que proporciona a inabilidade de controlar a bactéria, e conseqüentemente, a multiplicação do bacilo. Por outro lado, a resposta Th2 auxilia na ativação dos linfócitos B, resultando na produção de anticorpos (WANG et al, 1989; WALKER, LOCKWOOD, 2006). Paradoxalmente, esses anticorpos produzidos, seja na fase HT ou na fase HV são usualmente não protetores, mas podem ser utilizados como biomarcadores no diagnóstico sorológico.

## 2.5 PROTEÍNA Mce1A

Antes da decodificação do genoma de *M. leprae* a disponibilidade de novos antígenos era limitada principalmente devido ao fato do bacilo não ser cultivável *in vitro*. Comparações do genoma de *Mycobacterium tuberculosis* e de *M. leprae* revelaram que o último sofreu redução evolutiva apresentando um genoma de 3.3 milhões de pares de base (Mb) comparado com 4.4 Mb de *M. tuberculosis* (COLE et al, 1998; COLE et al, 2001). Dos 1.614 genes/proteínas de *M. leprae*, 1.429 são comuns em *M. tuberculosis* (COLE et al, 2001).

A similaridade genética nas cepas de *M. tuberculosis* e *M. leprae* demonstraram a presença do operon *mce1* e gene *mce1A* (1326 bp), o qual codifica a proteína Mce1A (52 kD) em ambos os bacilos e formada por 442 aminoácidos (aa) (FADLITHA et al, 2019). As proteínas de entrada na célula de mamífero (Mce) codificadas pelos operons *mce1*, *mce2*, *mce3* e *mce4*, compostos de 10 a 14 genes cada, são moléculas que desempenham um papel fundamental na importação de moléculas de lipídios e atuação na patogênese do bacilo frente ao hospedeiro (COLE et al, 1998). A sua denominação é baseada na observação inicial de que um fragmento de DNA correspondente a proteína Mce1A de *M. tuberculosis* (H37Ra), quando expresso em *Escherichia coli*, permitiu a entrada dos bacilos de *E. coli* em células HeLa, evidenciando a sua capacidade de mediar a entrada na célula e, eventualmente, na sobrevivência do bacilo no interior de macrófagos (ARRUDA et al, 1993). Pesquisas subsequentes mostraram

que o papel dessas proteínas está principalmente associado ao transporte de lipídios, modulação da sinalização da célula hospedeira, homeostase da parede celular e remodelação da membrana celular confirmando a sua participação para garantir a sobrevivência bacilo e os mecanismos de patogênese (QUEIROZ, RILEY, 2017; ASTHANA et al, 2021).

A posteriori, a proteína recombinante isoladamente e baseada no gene *mce1A* de *M. leprae* foi demonstrada por promover a internalização em células epiteliais nasais, células epiteliais brônquicas, fibroblastos dérmicos, células endoteliais microvasculares e queratinócitos humanos. Logo, o produto do gene *mce1A* pode mediar a entrada de *M. leprae* nas células epiteliais respiratórias como suas células-alvo naturais, que podem ser o principal modo de transmissão. As células endoteliais, por outro lado, podem servir como reservatório de bacilos para infecção de longo prazo. A proteína Mce1A de *M. leprae* tem implicações importantes em potencial para o modo de transmissão e patogênese da hanseníase (SATO et al, 2007).

A região mais importante da proteína Mce1A envolvida na invasão de *M. tuberculosis* nas células epiteliais humanas é chamada de célula InvIII (KOHWIWATTANAGUN et al, 2007). A região InvIII de *M. tuberculosis* corresponde a InvXb de *M. leprae*. A sequência das regiões é idêntica entre os aminoácidos da posição 1 para a posição 22 - contados a partir do terminal N de InvXb, exceto que os aminoácidos nas posições 1 a 3, 5, 8, 9, 13 são diferentes entre *M. leprae* e *M. tuberculosis*. Portanto, *M. leprae* inclui uma região (ML2589, 1326 pb) altamente homóloga à proteína Mce1A de *M. tuberculosis*, sendo, a proteína Mce1A expressa na superfície da bactéria como uma proteína nativa e que a região N terminal da proteína Mce1A de *M. leprae*, além da região ativa encontrada em *M. tuberculosis*, está envolvida na entrada do bacilo. *M. leprae* para infectar as células de Schwann, precisa primeiro invadir as células epiteliais e os novos achados evidenciam que a região InvX desta proteína, em particular, está envolvida na invasão das células epiteliais da mucosa nasal (FADLITHA et al, 2019).

Experimentos em modelo animal demonstram que o gene *mce1* é expresso na fase de transição entre infecção por *M. tuberculosis* e o aparecimento da doença (SHIMONO et al, 2003; GIOFFRE et al, 2005). Shimono e colaboradores (2003) ratificam essa assertiva ao demonstrar que camundongos desafiados com cepas mutantes H37Rv sem o gene responsável pela expressão da proteína, tornou o bacilo da tuberculose mais virulento, induzindo a morte precoce dos camundongos quando comparado com os que foram desafiados com a cepa virulenta que expressa o gene (SHIMONO et al, 2003). Um dos primeiros estudos em modelo humano sugere que a proteína Mce1A favorece o estabelecimento da infecção latente no hospedeiro, através da inibição da resposta imune celular pela produção de fator de crescimento

tecidual- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) por células mononucleares. Esta citocina estaria relacionada com a modulação da resposta imune, a fim de propiciar a sobrevivência do bacilo no hospedeiro (NASCIMENTO, 1999).

### **2.5.1 Proteína Mce1A e a produção de anticorpos**

A pequena quantidade de estudos em modelo humano, as sugestões de estudos anteriores, sobre o papel da Mce1A no estabelecimento da infecção, e a ausência de outros grupos de pesquisa atuando nessa busca de biomarcadores sorológicos  $\alpha$ -Mce1A, impulsionaram o objetivo de avaliar a resposta imune humoral contra a proteína Mce1A em pacientes com diferentes formas clínicas da hanseníase. Com isso, a utilização da proteína Mce1A recombinante já foi aplicada como proposta de imunoensaio para detecção de imunoglobulinas (Igs) das classes IgA, IgM e IgG no estudo piloto já publicado por Lima et al (2017). Através desse estudo de corte transversal com 89 voluntários (casos de hanseníase n=55; contatos domiciliares n=12; controles endêmicos n=22) do ambulatório de referência para hanseníase do Hospital Couto Maia, em Salvador-BA, foi demonstrado que os níveis de anticorpos (IgA, IgM e IgG) anti-Mce1A foram significativamente superiores nos casos de hanseníase quando comparados com os controles ( $p < 0,0001$ ). ELISA indireto para detecção de IgG anti-Mce1A apresentou 92,7% de sensibilidade e 97,1% especificidade com uma soropositividade de 92,1% em pacientes MB e 94,1% PB. IgA anti-Mce1A correlaciona-se de forma positiva com o índice baciloscópico ( $p = 0,043$ ) e número de lesões cutâneas ( $p = 0,042$ ). Os resultados encontrados sugerem que o teste sorológico proposto pode ser usado como um método fácil, não invasivo e de baixo custo para suporte ao diagnóstico e seguimento da hanseníase, tendo em vista, a baixa soropositividade apresentada por pacientes PB e contatos intradomiciliares quando utilizado outros testes sorológicos como a sorologia anti-PGL-I (APGL-I) para detecção de IgM e os testes utilizando proteína de fusão LID-1 (LIMA et al, 2017).

## **2.6 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL**

O diagnóstico da hanseníase deve ser essencialmente pautado nos sinais clinicodermatoneurológicos, no entanto, os exames complementares e auxiliares ao diagnóstico médico, quando disponíveis, de qualidade e confiáveis, podem ser realizados (BRASIL, 2017).

### **2.6.1 Baciloscopia do raspado intradérmico**

A baciloscopia consiste em um exame microbiológico através da coloração de Ziehl-Neelsen e sendo o seu resultado dependente da carga bacilar do paciente. O teste objetiva identificar o bacilo em esfregaços de raspados dérmicos dos lóbulos auriculares, cotovelos e joelhos, como também, das lesões de pele. O exame permite classificar os pacientes como MB e monitorar o tratamento, quando apresentam positividade no teste. A baciloscopia é geralmente negativa nas formas iniciais da doença e em casos predominantemente neurais, assim como, é fortemente positiva nas formas clínicas DV/HV. Os resultados negativos para baciloscopia não afastam o diagnóstico da hanseníase, sendo a sua sensibilidade variável entre 25% para pacientes PB e 62% para casos MB, porém, com uma especificidade de 100%. A performance do teste é baseada a qualidade da coleta, expertise do profissional executor e protocolo laboratorial utilizado (BRASIL, 2017).

### **2.6.2 Histopatologia da biópsia de pele**

O exame histopatológico baseia-se na análise microscópica de biópsias das lesões de pele e nervos sendo geralmente utilizado para a classificação histopatológica da hanseníase, especialmente quando são evidenciadas agressão neural, presença de bacilos, formação de granuloma e presença de infiltrado histiocitário xantomizado. O estudo anatomopatológico é realizado através da coloração hematoxilina-eosina objetivando avaliar as características morfofuncionais do tecido e a identificação dos bacilos álcool-ácido resistentes através da coloração Faraco-Fite. Os resultados negativos para baciloscopia da biópsia não excluem o diagnóstico clínico da hanseníase e achado falso-negativo pode ser liberado na pesquisa dos bacilos, quando não empregada a técnica Faraco-Fite (BRASIL, 2017). A especificidade diagnóstica do exame histopatológico varia entre 70% a 72% e sensibilidade variando de 49% a 70% (LOCKWOOD et al, 2012; BRASIL, 2021).

### **2.6.3 Sorologia**

Atualmente, as ferramentas de diagnóstico disponíveis carecem de sensibilidade e especificidade suficientes para atingir o objetivo de detecção precoce. A detecção da infecção por *M. leprae*, seguida de uma intervenção efetiva, é considerada um componente vital das estratégias que visam reduzir a transmissão da hanseníase (OMS, 2021). A sorologia mais

amplamente difundida busca a identificação de anticorpos APGL-I. Altos títulos de IgM para APGL-I de *M. leprae* são associados a disseminação e infecções progressivas pelo bacilo, tornando o teste positivo preferencialmente nos casos MB de alta carga. Estudos anteriores utilizaram metodologias de imunoenaios baseadas em testes de fluxo lateral e aglutinação de partículas que incorporam o epítipo di- ou trissacarídeo sintético do PGL-I (OSKAM et al, 2003; SPENCER et al, 2011; STEFANI et al, 2012).

O teste ELISA indireto busca a pesquisa de anticorpos da classe IgM APGL-I, sendo útil principalmente no diagnóstico dos casos MB e a detecção para pacientes PB tem valor limitado (BUHRER-SEKULA et al, 2003; GOULART et al, 2008; SPENCER et al, 2012). Em regiões hiperendêmicas para hanseníase, mais de 50% dos jovens pesquisados em idade escolar apresentaram respostas anti-PGL-I positivas (BARRETO et al, 2012). Contudo, a maioria dos indivíduos com título de anticorpos positivo nunca desenvolverá hanseníase, mesmo sendo a sorologia APGL-I positiva um fator de risco para o desenvolvimento da hanseníase (DOUGLAS et al, 2004; SPENCER et al, 2011).

Os estudos disponíveis com propostas de testes sorológicos em 78 publicações, demonstram que a técnica de ELISA foi a mais preconizada e em diferentes protocolos utilizados a performance dos testes foi variável com sensibilidade entre 0% a 100% e a especificidade 13% a 100%. Os protocolos utilizando o antígeno PGL-I apresentaram uma sensibilidade média de 63,8% e especificidade média de 91% (GURUNG et al, 2019).

Apenas no ano de 2021, o Ministério da Saúde através da Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sistema Único de Saúde (CONITEC-SUS) propôs a utilização de um método sorológico baseado em um teste rápido imunocromatográfico para determinação qualitativa de anticorpos IgM anti-*M. leprae* em amostras de soro, plasma ou sangue total para diagnóstico complementar de hanseníase utilizando o antígeno PGL-I. Em pacientes contactantes de hanseníase MB e portadores de lesões duvidosas, o teste demonstrou sensibilidade estimada de 82% e especificidade de 89%, com certeza da evidência variando entre baixa e muito baixa. Já para pacientes contactantes de hanseníase PB e lesões duvidosas, o teste obteve uma sensibilidade estimada de 23% e especificidade de 92%, com certeza da evidência variando entre moderada a muito baixa. (BRASIL, 2021).

#### **2.6.4 Exame molecular**

As limitações no diagnóstico dos casos PB e comunicantes de pacientes com hanseníase geraram a necessidade da incorporação de técnicas com maior performance tecnológica

almejando a identificação dos grupos de difícil diagnóstico baciloscópico e histopatológico como forma de obter um diagnóstico precoce com elevada especificidade. A técnica consiste na extração, amplificação e identificação de DNA de *M. leprae* em amostras clínicas como biópsias de pele, raspados intradérmicos e entre outras espécimes (BRASIL, 2021). A sensibilidade da *polymerase chain reaction* quantitativa (qPCR) varia de 51% a 91%, e a especificidade de 46% a 100% (GURUNG et al, 2019).

Atualmente, diferentes alvos gênicos são estudados para subsidiar a detecção específica de *M. leprae*. A sequência gênica de regiões de elementos repetitivos específicos (RLEP) localizadas ao longo do genoma do bacilo se tornou um alvo potencial e promissor para o diagnóstico molecular da hanseníase. A aplicação do ensaio molecular com RLEP permite maior sensibilidade por fornecer múltiplas cópias ao decorrer do genoma. Portanto, os ensaios de PCR-RLEP apresentam resultados rápidos e fidedignos para detecção e quantificação molecular (COLE et al, 2001; MARTINEZ et al, 2011; AZEVEDO et al, 2017).

Azevedo e colaboradores (2017) demonstraram que qPCR apresentou-se sensível e 100% específica, devido aos resultados negativos em amostras de diferentes micobactérias, de indivíduos saudáveis e de outras doenças granulomatosas. Com isso, PCR-RLEP pode ser utilizada como exame complementar para o diagnóstico de hanseníase, independentemente da forma clínica da doença (AZEVEDO et al, 2017).

No ano de 2021, o Ministério da saúde implementou uma consulta pública através da CONITEC para então implementação de um teste de detecção molecular qualitativa de *M. leprae* para o diagnóstico de hanseníase. O ensaio proposto apresenta sensibilidade para detecção da hanseníase MB de 72% e 45% para casos classificados como PB (BRASIL 2021).

### 3 JUSTIFICATIVA

Diante do grave problema de saúde pública que a hanseníase representa, devem ser realizadas atividades de prevenção e controle que apresentem impacto na situação de saúde da população. Atualmente, são poucos os estudos que abordam o perfil imunológico humoral dos portadores de hanseníase e dos seus respectivos comunicantes com resultados promissores para implementação nos serviços públicos e privados de saúde objetivando o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico da hanseníase em todas as formas clínicas ou como forma de seguimento dos casos.

Adicionalmente, não existem estudos avaliando o papel da proteína Mce1A na hanseníase como biomarcadores sorológicos publicados por outros grupos de pesquisa. A obtenção destes dados vem adquirindo importância, principalmente para o esclarecimento do estado imunológico destas diferentes formas da doença, dos estados reacionais e como forma de detecção dos comunicantes infectados que ainda não apresentam manifestações clínicas. Assim, com o intuito de contribuir para o esclarecimento da doença e a prospecção de testes sorológicos por ELISA e testes rápidos, está sendo realizado um estudo para avaliar a resposta imune humoral e detecção precoce dos casos para o bloqueio da cadeia de transmissão do bacilo com o diagnóstico feito a partir da resposta à proteína Mce1A em pacientes com diferentes formas clínicas e em estados reacionais da hanseníase, em seus respectivos comunicantes e controles saudáveis de regiões com diferentes níveis de endemia. Além disso, a identificação de padrões associados à ocorrência da hanseníase é uma meta importante para monitorar a situação de saúde da população brasileira, comparando a evolução, tendências e identificando áreas e grupos prioritários.

Portanto, em busca do cumprimento das metas de controle da hanseníase preconizadas pela OMS e pretendidas pelo Ministério da Saúde, torna-se necessário investir em ações efetivas tanto para o diagnóstico da doença como também para a infecção, permitindo dessa forma a quebra da cadeia de transmissão, tendo em vista, a inexistência de métodos laboratoriais capazes de diagnosticar indivíduos infectados de forma subclínica e técnicas para predição do possível desenvolvimento da doença.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBEJTIVO GERAL

Analisar a aplicabilidade dos anticorpos IgA, IgM, IgG anti-Mce1A como potenciais biomarcadores para o diagnóstico e seguimento de pacientes com hanseníase e seus comunicantes.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar biomarcadores sorológicos de seguimento clínico, bacteriológico e terapêutico dos pacientes com hanseníase antes e após o uso da PQT;
- Analisar os anticorpos com potencial de diagnóstico dos contatos intradomiciliares expostos ao *M. leprae* antes do aparecimento dos sinais e sintomas dermatoneurológicos;
- Correlacionar os níveis dos anticorpos anti-Mce1A com os índices de anticorpos APGL-I e resultados de PCR-RLEP dos pacientes e comunicantes;
- Avaliar a acurácia dos ensaios laboratoriais atuais (baciloscopia, ELISA APGL-I, PCR-RLEP) em comparação com a sorologia anti-Mce1A;
- Obter resultados subsidiários para prospecção de plataformas tecnológicas de diagnóstico, monitoramento e prognóstico de baixo custo e aplicável as unidades de atenção a saúde (kit para ELISA).

## 5 RESULTADOS

Os resultados dessa tese de doutorado serão apresentados em três capítulos, sendo o primeiro e segundo em formato de manuscritos dos artigos originais publicados em revista indexada de circulação internacional e o terceiro capítulo em formato de manuscrito do artigo original aceito para publicação. Devido as regras das revistas e o *copyright*, os artigos não foram disponibilizados na íntegra nesse documento.

### 5.1 CAPÍTULO 1

#### 5.1.1 Artigo original publicado

**LIMA, F.R.;** DE PAULA, N.A.; SIMÕES, M.M.R.; MANSO, G.M.C.; ALBERTINO, G.S.; FELISBINO, G.C.; ANTUNES, V. M. G.; PERECIN, F.A.M.C.; WESTIN, A.T.; LUGÃO, H.B.; FRADE, M.A.C. Bacilloscopy and polymerase chain reaction of slit-skin smears and anti-phenolic glycolipid-I serology for Hansen's disease diagnosis. **Front Med**, v. 9, p. 972244, 2022. doi: 10.3389/fmed.2022.972244

Considerando as dificuldades diagnósticas no campo da hanseníase, principalmente entre os casos com apresentação macular leve ou formas neurais, o uso do exame microbiológico do raspado dérmico (baciloscopia) como forma de diagnóstico laboratorial apresenta-se como um método falho e rudimentar devido a seu baixo desempenho na detecção dos casos. A utilização de metodologias de biologia molecular (PCR) e a associação com técnicas sorológicas permitem um diagnóstico clínico mais preciso dos pacientes, além de identificar um maior número de indivíduos independentemente da forma clínica ou classificação operacional. Além disso, a necessidade de implantação da sorologia e PCR como exames complementares não se restringe aos centros de referência e pesquisa, pois essa prática gera o atraso do diagnóstico e tratamento, conseqüentemente, aumentando a incapacidade e o estigma dos pacientes. Sendo assim, um estudo de cor transversal baseado nos prontuários (N=345) dos pacientes atendidos no ambulatório da dermatologia da divisão da clínica médica (HC-FMRP-USP) de Ribeirão Preto-SP foi realizado para comparar o desempenho e a correlação da baciloscopia e com técnica de PCR-RLEP para rastreamento molecular do DNA de *M. leprae* e a sorologia APGL-I para dosagem de anticorpos IgM. A seleção dos prontuários foi baseada nos indivíduos que realizaram os 3 exames (baciloscopia, PCR-RLEP e APGL-I) no

mesmo período e foram atendidos com suspeita clínica para hanseníase. Em seguida, os indivíduos foram classificados no grupo pacientes com hanseníase (HDP) e grupo sem hanseníase (N-HDP) que apresentavam sinais e sintomas dermatológicos e/ou neurológicos. O trabalho evidenciou que a PCR e sorologia em comparação com baciloscopia são superiores para o diagnóstico dos pacientes acometidos e deve-se reconsiderar a recomendação da OMS do exame microbiológico como único critério laboratorial para a doença. Assim, corroborando com a implementação de novas metodologias laboratoriais e de maior sensibilidade para auxílio ao diagnóstico da hanseníase.


**OPEN ACCESS**

EDITED BY  
Ciro Martins Gomes,  
University of Brasilia, Brazil

REVIEWED BY  
Sebastian Vernal,  
University of São Paulo, Brazil  
Pugazhenthan Thangaraju,  
All India Institute of Medical Sciences  
Raipur, India

\*CORRESPONDENCE  
Marco Andrey Cipriani Frade  
mandrey@fmrp.usp.br

SPECIALTY SECTION  
This article was submitted to  
Infectious Diseases – Surveillance,  
Prevention and Treatment,  
a section of the journal  
Frontiers in Medicine

RECEIVED 18 June 2022  
ACCEPTED 25 July 2022  
PUBLISHED 10 August 2022

CITATION  
Lima FR, de Paula NA, Simões MMR,  
Manso GMdC, Albertino GS,  
Felisbino GC, Antunes VMG,  
Perecin FAMC, Westin AT, Lugão HB  
and Frade MAC (2022) Bacilloscopy  
and polymerase chain reaction  
of slit-skin smears and anti-phenolic  
glycolipid-I serology for Hansen's  
disease diagnosis.  
*Front. Med.* 9:972244.  
doi: 10.3389/fmed.2022.972244

COPYRIGHT  
© 2022 Lima, de Paula, Simões,  
Manso, Albertino, Felisbino, Antunes,  
Perecin, Westin, Lugão and Frade. This  
is an open-access article distributed  
under the terms of the [Creative  
Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).  
The use, distribution or reproduction in  
other forums is permitted, provided  
the original author(s) and the copyright  
owner(s) are credited and that the  
original publication in this journal is  
cited, in accordance with accepted  
academic practice. No use, distribution  
or reproduction is permitted which  
does not comply with these terms.

# Bacilloscopy and polymerase chain reaction of slit-skin smears and anti-phenolic glycolipid-I serology for Hansen's disease diagnosis

Filipe Rocha Lima<sup>1,2</sup>, Natália Aparecida de Paula<sup>1,2</sup>,  
Mateus Mendonça Ramos Simões<sup>1,2</sup>,  
Gabriel Martins da Costa Manso<sup>1,2</sup>,  
Gustavo Sartori Albertino<sup>1,2</sup>, Giovanni Cesar Felisbino<sup>1,2</sup>,  
Vanderson Mayron Granemann Antunes<sup>1,2</sup>,  
Fernanda André Martins Cruz Perecin<sup>2</sup>,  
Andreza Telles Westin<sup>2</sup>, Helena Barbosa Lugão<sup>2</sup> and  
Marco Andrey Cipriani Frade<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Healing and Hansen's Disease Laboratory, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, <sup>2</sup>Dermatology Division, Department of Internal Medicine, National Referral Center for Sanitary Dermatology and Hansen's Disease, Clinical Hospital of the Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

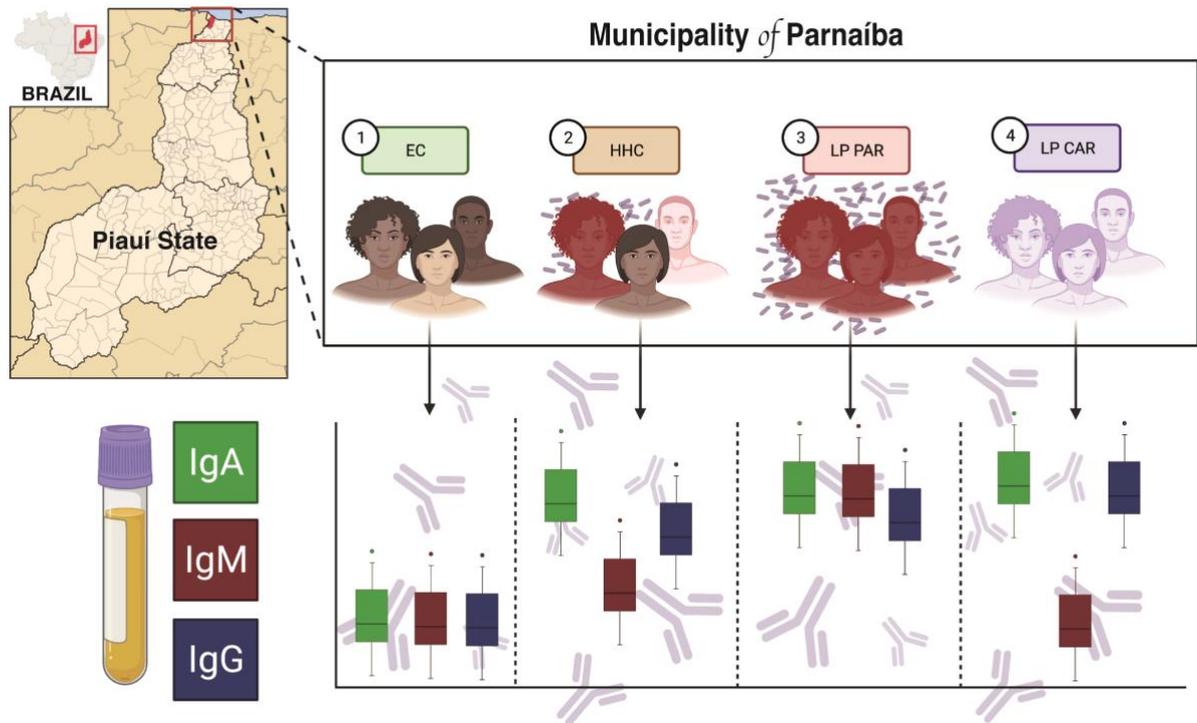
The bacilloscopy of the slit-skin smear (SSS) is the exclusive laboratory test associated with dermato-neurological evaluation for Hansen's disease (HD) diagnosis; however, it is negative in the majority of PB or primary neural forms. Thus, a PCR technique involving different sequences and target genes has been performed with an aim to increase the sensitivity and specificity of *M. leprae* identification, especially in patients with low bacillary loads. Additionally, serological assays based on antibody response reflect infection levels and indicate that this could be a simpler, less invasive technique for estimating *M. leprae* exposure. Serological tests and PCR have been shown to be more sensitive and accurate than the SSS. Our study aimed to measure accuracy and performance among the SSS and PCR of dermal scrapings stored on filter paper and APGL-I serology for diagnosis in HD. A cross-sectional study analyzing the medical records ( $n = 345$ ) of an HD outpatient-dermatology clinic from 2014 to 2021 was conducted. Accuracy performance parameters, correlation, and concordance were used to assess the value among the SSS, PCR, and APGL-I exams in HD. The SSS presented 24.5% sensitivity, 100% specificity, 37.4% accuracy, and the lowest negative predictive value (21.5%). The PCR assay had 41, 100, and 51% sensitivity, specificity, and accuracy, respectively. PCR and APGL-I serology increased the detection of HD cases by 16 and 20.6%, respectively. PCR was positive in 51.3% of patients when the SSS was negative. The SSS obtained moderate concordance with PCR [ $k$ -value: 0.43 (CI: 0.33–0.55)] and APGL-I [ $k$ -value:

## 5.2 CAPÍTULO 2

### 5.2.1 Artigo original publicado

**LIMA, F.R.;** BERNARDES FILHO, F.; ANTUNES, V. M. G.; SANTANA, J.M.; DE ALMEIDA, R.C.P.; TORO, D.M.; BRAGAGNOLLO, V.; MANSO, G.M.C; DE PAULA, N.A.; ALVES, E.S.; RILEY, L.; ARRUDA, S.; FRADE, M.A.C. Serological immunoassay for Hansen's disease (HD) diagnosis and monitoring treatment: anti-Mce1A antibody response among HD patients and their household contacts in northeastern Brazil. **Front Med**, v. 9, p. 855787. doi: 10.3389/fmed.2022.855787.

O estudo foi desenvolvido com amostras de plasma coletadas durante a ação de busca ativa para hanseníase no município de Parnaíba localizado no estado do Piauí, Brasil no ano de 2016. As amostras foram provenientes de 4 grupos de estudo: indivíduos sem diagnóstico de hanseníase e residentes na região endêmica para doença (Controles Endêmicos – EC); contatos intradomiciliares de pacientes diagnosticados com hanseníase (*Household Contacts* – HHC); casos novos da doença na região de Parnaíba-PI (PAR) e pacientes tratados residentes no Hospital Colônia do Carpina, Parnaíba-PI (CAR), ex-colônia para hanseníase. As análises laboratoriais foram realizadas objetivando dosar os níveis plasmáticos dos anticorpos IgA, IgM e IgG anti-Mce1A, assim como, correlacionar com os níveis de anticorpos APGL-I e os resultados de PCR-RLEP para *M. leprae*. Os resultados evidenciaram níveis basais de produção dos anticorpos circulantes no grupo EC, níveis moderados de IgM anti-Mce1A e índices aumentados para IgA e IgM nos HHC, aumento significativo dos valores de anticorpos IgA, IgM e moderados para IgG nos casos novos da doença (PAR), no entanto, pacientes tratados (CAR) apresentaram valores negativos de IgM anti-Mce1A e valores aumentados para IgA e IgG (**Figura 1**).



**Figura 1.** Resumo gráfico do protocolo de pesquisa e evidências encontradas no estudo.



# Serological Immunoassay for Hansen's Disease Diagnosis and Monitoring Treatment: Anti-Mce1A Antibody Response Among Hansen's Disease Patients and Their Household Contacts in Northeastern Brazil

OPEN ACCESS

**Edited by:**

Juarez Antonio Simões  
Quaresma,  
Universidade do Estado do Pará,  
Brazil

**Reviewed by:**

Mayara Ingrid Sousa Lima,  
Federal University of Maranhão, Brazil  
Tinará Leila De Souza Aarão,  
Federal University of Pará, Brazil

**\*Correspondence:**

Marco Andrey Cipriani Frade  
mandrey@fmrp.usp.br

**Specialty section:**

This article was submitted to  
Pathology,  
a section of the journal  
Frontiers in Medicine

**Received:** 16 January 2022**Accepted:** 26 April 2022**Published:** 09 June 2022**Citation:**

Lima FR, Filho FB, Antunes VMG,  
Santana JM, de Almeida RCP,  
Toro DM, Bragagnollo VF,  
Manso GMdC, de Paula NA,  
Alves ES, Riley LW, Arruda S and  
Frade MAC (2022) Serological  
Immunoassay for Hansen's Disease  
Diagnosis and Monitoring Treatment:  
Anti-Mce1A Antibody Response  
Among Hansen's Disease Patients  
and Their Household Contacts  
in Northeastern Brazil.  
Front. Med. 9:855787.  
doi: 10.3389/fmed.2022.855787

Filipe Rocha Lima<sup>1,2</sup>, Fred Bernardes Filho<sup>1,2</sup>, Vanderson Mayron Granemann Antunes<sup>1,2</sup>, Jaci Maria Santana<sup>1,2</sup>, Regina Coeli Palma de Almeida<sup>1,2</sup>, Diana Mota Toro<sup>3</sup>, Vinicius Fozatti Bragagnollo<sup>1,2</sup>, Gabriel Martins da Costa Manso<sup>1,2</sup>, Natália Aparecida de Paula<sup>1,2</sup>, Eliracema Silva Alves<sup>4,5</sup>, Lee W. Riley<sup>6</sup>, Sérgio Arruda<sup>7</sup> and Marco Andrey Cipriani Frade<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Healing and Hansen's Disease Laboratory, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

<sup>2</sup> Dermatology Division, Department of Internal Medicine, National Referral Center for Sanitary Dermatology and HD, Clinical Hospital of the Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil. <sup>3</sup> Department of Clinical, Toxicological, and Bromatological Analyses, School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo, São Paulo, Brazil. <sup>4</sup> Directorate of Unit and Health Care Surveillance, HD Control Program, State Department of Health, Piauí, Brazil. <sup>5</sup> Federal University of Piauí, Piauí, Brazil. <sup>6</sup> Division of Infectious Diseases and Vaccinology, School of Public Health, University of California, Berkeley, Berkeley, CA, United States. <sup>7</sup> Advanced Public Health Laboratory, Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, Brazil

Hansen's disease (HD) is an ancient disease, but more than 200,000 new cases were reported worldwide in 2019. Currently, there are not many satisfactory immunoassay methods for its diagnosis. We evaluated antibodies against Mce1A as a promising new serological biomarker. We collected plasma from new cases, contacts, and endemic controls in the city of Parnaíba and treated patients at Carpina, a former HD colony in Piauí state, northeastern Brazil. Receiver operating characteristic (ROC) curves were used to assess the assay thresholds, specificity and sensitivity of the IgA, IgM, and IgG antibodies against  $\alpha$ -Mce1A by indirect ELISA and compared it with IgM anti-PGL-I and molecular diagnosis by quantitative polymerase chain reaction (qPCR). Venn diagrams were generated to represent the overlap in the antibody positivity pattern. Multivariate analysis was performed to assess the potential predictor of antibodies for the outcome of having an HD diagnosis. IgA and IgG were positive in 92.3 and 84% of patients, respectively. IgM was negative for all treated patients. IgG had a sensitivity and specificity of 94.7 and 100%, respectively. IgM-positive individuals had a 3.6 chance of being diagnosed with HD [OR = 3.6 (95% CI = 1.1–11.6);  $p = 0.028$ ], while IgA-positive individuals had a 2.3 chance [OR = 2.3 (95% CI = 1.2–4.3);  $p = 0.005$ ] compared

## 5.3 CAPÍTULO 3

### 5.3.1 Manuscrito aceito para publicação

#### Original Article

### **Serological testing for Hansen's Disease Diagnosis: Clinical significance and performance of IgA, IgM, and IgG antibodies against Mce1A protein**

#### **Serological testing for Hansen's Disease**

Filipe Rocha Lima<sup>1,2</sup>, Mateus Mendonça Ramos Simões<sup>1,2</sup>, Gabriel Martins da Costa Manso<sup>1,2</sup>, Diana Mota Toro<sup>3</sup>, Vanderson Mayron Granemann Antunes<sup>1,2</sup>, Giovani Cesar Felisbino<sup>1,2</sup>, Gabriela Ferreira Dias<sup>1,2</sup>, Lee W. Riley<sup>4</sup>, Sérgio Arruda<sup>5</sup>, Natália Aparecida de Paula<sup>1,2</sup>, Helena Barbosa Lugão<sup>2</sup>, Fernanda Cruz Perecin<sup>2</sup>, Norma Tiraboschi Foss<sup>1,2</sup>, Marco Andrey Cipriani Frade<sup>1,2\*</sup>

1. Healing and Hansen's Disease Laboratory, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.
2. Dermatology Division, Department of Internal Medicine, National Referral Center for Sanitary Dermatology and Hansen's Disease, University Hospital, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.
3. Department of Clinical, Toxicological and, Bromatological Analyses, School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.
4. Division of Infectious Diseases and Vaccinology, School of Public Health, University of California, Berkeley, Berkeley, CA, United States.
5. Advanced Public Health Laboratory, Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Bahia, Brazil.

\*Correspondence:

Marco Andrey Cipriani Frade

[mandrey@fmrp.usp.br](mailto:mandrey@fmrp.usp.br)

**Keywords: Hansen's Disease, testing, serological, diagnosis, Mce1A, antibodies.**

**Number of words: 5,747**

**Number of figures: 06**

**Number of tables: 03**

## Abstract

Hansen's disease (HD) is an infectious, treatable and chronic disease. It is the main cause of infectious peripheral neuropathy. Due to the current limitations of laboratory tests for the diagnosis of HD, early identification of infected contacts is an important factor that would allow us to control the magnitude of this disease in terms of world public health. Thus, a cross-sectional study was conducted in the Brazilian southeast with the objective of evaluating humoral immunity and describing the accuracy of the immunoassay based on IgA, IgM, and IgG antibodies against surface protein Mce1A of *Mycobacterium*, the predictive potential of these molecules, the clinical significance of positivity, and the ability to segregate new HD cases (NC; n=200), contacts (HHC; n=105) and healthy endemic controls (HEC; n=100) as compared to  $\alpha$ -PGL-I serology.  $\alpha$ -Mce1A levels for all tested antibodies were significantly higher in NC and HHC than in HEC ( $P < 0.0001$ ). The performance of the assay using IgA and IgM antibodies was rated as highly accurate (AUC > 0.85) for screening HD patients. Among HD patients (NC), positivity was 77.5% for IgA  $\alpha$ -Mce1A ELISA, 76.5% for IgM and 61.5% for IgG, while  $\alpha$ -PGL-I serology showed only 28.0% positivity. Multivariate PLS-DA showed two defined clusters for the HEC and NC groups [accuracy=0.95 (SD=0.008)] and the HEC and HHC groups [accuracy=0.93 (SD=0.011)]. IgA was the antibody most responsible for clustering HHC as compared to NC and HEC, evidencing its usefulness for host mucosal immunity and as an immunological marker in laboratory tests. IgM is the key antibody for the clustering of NC patients. Positive results with high antibody levels indicate priority for screening, new clinical and laboratory evaluations, and monitoring of contacts, mainly with antibody indexes  $\geq 2.0$ . In light of recent developments, the incorporation of new diagnostic technologies permits to eliminate the main gaps in the laboratory diagnosis of HD, with the implementation of tools of greater sensitivity and accuracy while maintaining satisfactory specificity.

## 1 Introduction

Hansen's disease (HD) is an infectious and contagious disease that mainly affects the skin, the peripheral nerves, mucosa of the upper respiratory tract, and the eyes, being caused by bacilli of the *Mycobacterium leprae* complex, which includes *M. leprae* and *M. lepromatosis* (1). HD is the most common treatable cause of peripheral neuropathy; however, it can progress to physical disabilities and deformities in the absence of an early diagnosis and the implementation of effective multidrug therapy (MDT) (2). HD is classified as a major public health issue and in 2019, with more than 200,000 new cases of HD reported worldwide and 27,864 reported in

Brazil, a value equivalent to 93% of all cases in the Americas region and to 13.7% of the global cases registered. The heterogeneous distribution and the epidemiological indicators of Brazil at the global level reveal a scenario of continued transmission, with the disease representing a priority among the health problems of the country (3). According to the World Health Organization (WHO), as a result of the impact of the COVID-19 pandemic, more than 120,000 new cases were reported in 2020, with a 37% reduction compared to 2019 (4).

The incorporation of new laboratory technologies for an early diagnosis of HD and the identification of infected individuals will allow the control of the transmission chain and the global magnitude of the disease, as proposed by the WHO strategies (3). Thus, the absence of high performance diagnostic platforms for the diagnosis of patients across the clinical spectrum of the disease and of oligosymptomatic household contacts (HHC) are gaps in health units that do not allow early case detection, accurate diagnosis, or prompt treatment. Currently, anti-phenolic glycolipid-I ( $\alpha$ -PGL-I) serology is the most widespread tool for the complementary diagnosis of the disease and contact with *M. leprae* based on antibody research. However, due to the low and variable sensitivity and negative predictive value of this test, as well as its low ability to detect early cases, paucibacillary patients, and macular and neural forms, its accuracy is not satisfactory for use as a diagnostic laboratory tool (5,6,7). Parallel to this, the slit skin-smear and the anatomopathological examination of the skin biopsy, despite having high specificity, are also techniques that depend on the bacillary load of the host and are of low sensitivity for effective detection and screening of HD cases and their HHC (6,7). More recently, the introduction of molecular biology to identify bacillus DNA in clinical samples (skin, nasal swab, and intradermal scraping) has increased the probability of detecting new cases while maintaining high specificity and has shown that the polymerase chain reaction (PCR) may be used to confirm most field cases (8). On the other hand, PCR is an expensive method not available to all laboratories for the diagnosis of HD, in addition to the absence of a gold standard laboratory test (7).

To validate new biomarkers for the diagnosis of all clinical forms of HD, infected individuals, and characterization of these molecules in the population residing in an endemic region, antibodies against the mammalian cell-entry protein 1A (Mce1A) of *Mycobacterium* were evaluated. Mce1A is reported to mediate bacillus entry into cells in the host's reticuloendothelial system cells and to induce their survival (9,10). Despite the presence of the Mce1A protein in the *Mycobacterium* genus, preliminary studies have shown that conditions such as bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccination and latent tuberculosis infection (LTBI) do not interfere with the levels of anti-Mce1A antibodies ( $\alpha$ -Mce1A) in HD patients (11,12). Previously

published studies have reported the potential of  $\alpha$ -Mce1A antibodies for the detection and monitoring of HD, also indicating its role in the identification of asymptomatic contacts (11,12). However, the present study is the first one carried out in a state of low endemicity in the Brazilian southeast, including patients with macular forms and mainly neurological signs and symptoms, representing the largest sample tested for the proposed serological assay. Thus, determining the most appropriate test cut-off value for each region and each biomarker. On this basis, our study aimed to describe the accuracy of an immunoassay based on  $\alpha$ -Mce1A IgA, IgM, and IgG antibodies, as well as the predictive potential of these molecules, the clinical significance of positivity and their ability to segregate HD patients, contacts and healthy endemic controls.

## **2 Materials and methods**

### **2.1 Design and study population**

A cross-sectional study was conducted at the National Referral Center in Sanitary Dermatology and HD, University Hospital of the Ribeirão Preto Medical School (HCFMRP-USP), University of São Paulo, Brazil, from 2020 to 2022. The study population (N=405) was classified into three groups: new HD cases without MDT (NC), household contacts of HD patients (HHC), and healthy endemic controls (HEC).

#### **2.1.1 New HD cases (NC)**

NC (n=200) were diagnosed by clinical evaluation according to the Brazilian Ministry of Health and WHO guidelines using recommended cardinal signs (13). The dermatological and neurological evaluation of the patients was the confirmatory exam performed by dermatologists and leprologists for the diagnosis of HD. Auxiliary tests to the clinical diagnosis were used, such as assessment of tactile sensation with a Semmes-Weinstein esthesiometer, ultrasound of peripheral nerves, and electroneuromyography, besides complementary exams such as serology, molecular exams, and bacilloscopy. Considering that none of the classifications for HD include all of the clinical manifestations of HD, particularly those involving macular and pure neural forms, we classified the patients considering the guidelines adapted by Madrid (Congress of Madrid 1953) and the Indian Association of Leprology (IAL 1982) classifications as follows: indeterminate (I), polar tuberculoid (TT), borderline (B), borderline lepromatous (BL), polar lepromatous (LL), and pure neural (N); and PB (I and TT clinical forms) and MB (B, BL, LL and N forms) according to WHO operational criteria. Considering the classification

by Frade et al (2021), patients with atypical hypochromatic macules and with altered sensation and neurological findings were classified as having the B and MB forms (14). All newly diagnosed patients were referred to a health unit for standard MDT.

### **2.1.2 Household contacts (HHC)**

HHC (n=105) were defined as individuals residing or having resided in the same household with an HD patient in the last five years at the time of diagnosis (3). All HHC were clinically screened for signs and symptoms of HD and subjected to laboratory analysis with serological and molecular exams. Clinical examinations were performed by dermatologists and leprologists at HCFMRP-USP.

### **2.1.3 Healthy endemic controls (HEC)**

HEC (n=100), representing community contacts, were defined as healthy individuals residing in the Ribeirão Preto region, SP, Brazil. During the last five years (2018 to 2022), the state was classified as having low endemicity. The Ribeirão Preto municipality was classified as having very high endemicity in 2021 for the first time during the study period, according to the new case detection rate of the disease. All participants reported that they had no history of diagnosis or contact with an HD, were test-negative for human immunodeficiency virus (HIV), had no diseases and did not use immunosuppressive drugs.

## **2.2 Anti-PGL-I serology**

Indirect ELISA was used to measure the  $\alpha$ -PGL-I IgM titer of every serum sample and the cut-off was based on the OD average among healthy subjects multiplied by 2.1 plus 10%, according to a previously reported protocol (7, 12, 15). Serology was performed with an ND-O-BSA (PGL-I) based glycoconjugate of bovine serum albumin (NR-19346. BEI Resources).

## **2.3 Molecular diagnosis of *M. leprae* DNA**

Total DNA extraction from a skin biopsy and/or earlobes and at least one elbow, knee and/or lesion slit-skin smear sample was performed with the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Germantown, MD, cat: 51306) according to the manufacturer's protocol. DNA was used to perform quantitative PCR-RLEP according to a previously reported protocol (7,16). The quantitative PCR (qPCR) result was considered positive for the detection of *M. leprae* DNA

with amplification up to a 40.0 cycle threshold (Ct) and melting temperature at 87.5 °C. The maximum number of cycles used was 40.0.

#### **2.4 Anti-Mce1A serological testing**

Quantitative evaluation of IgA, IgM and IgG antibody  $\alpha$ -Mce1A protein was performed by indirect ELISA according to a previously reported protocol (7, 11, 12). Purified recombinant Mce1A protein was provided by Dr. LW Riley (University of California, Berkeley, CA, USA). The respective index was calculated by dividing the optical density (OD 450 nm) of each sample by the cut-off, with indexes above 1.0 being considered positive. The cut-off point was based on mean OD between healthy controls compared to samples from patients with HD. The OD data were analyzed by receiver operating characteristic (ROC) curves to determine the cut-off point highest and matched sensitivity, specificity, and likelihood ratio, as previously described (7, 11, 12). For all assays, negative control samples from healthy individuals with no history of diagnosis or contact with HD, positive samples for  $\alpha$ -Mce1A antibodies from patients diagnosed with HD, and wells considered blank without the addition of specific antibodies and with peroxidase-linked second antibody for each immunoglobulin tested were added. The OD values of the blank wells were used for subtraction in the respective results obtained in each well with the tested samples.

#### **2.5 Statistical analysis**

Data were analyzed with GraphPad Prism v. 9.0 software (GraphPad Inc., La Jolla, CA, USA). Study population characteristics were analyzed by the t test and chi-squared test. Antibody level variations were analyzed by the Kruskal–Wallis test, followed by Dunn’s test. The ability of immunoglobulin levels to discriminate NC and HHC from HEC was evaluated by ROC curves. The accuracy classification was based on Bowers et al (2019) (17). The level of statistical significance was set at  $P < 0.05$ . The combined performance of the antibodies in distinguishing the groups was determined using Python 3.9.12 in the Jupyter Notebook environment. The libraries used were Numpy 1.21.5, Pandas 1.4.2, Matplotlib 3.5.1, Scipy 1.7.3, Sklearn 1.0.2 and Shap 0.40.0. Data were first anonymized and all patient identification was excluded from the database. For multivariate analysis, the dataset variables were transformed using the Partial Least Square method and the two latent variables that explained most of the variance were used to construct the graphs. The Mahalanobis distance and the Chi-square distribution with a threshold of 0.95 were used to detect outliers. Partial Least Square-Discriminant Analysis (PLS-DA) was implemented with a stratified cross-validation of 10 divisions and 20 repetitions and

a variable importance in projection (VIP) score plot for important antibody identified by PLS-DA analysis was evaluated. The VIP score value closest to or greater than 1 is the of rule thumb for selecting relevant variables. Thus, to investigate the importance of the variables, the Shapley values of each individual for each of the antibodies were obtained and the mean of the module of these values was then calculated. Spearman's correlation was used to compare the antibody levels and classification was based on Akoglu (2018) (18). Finally, Hierarchical clustering was performed using Euclidean distance and Ward's linkage algorithms were performed using MetaboAnalyst 5.0. The analyzes were carried out with the antibody indexes corresponding to each group under study, and all input data have been normalized and transformed into logarithm. Two parameters were considered to perform hierarchical clustering. The first one is similarity measure - Euclidean distance, Pearson's correlation, Spearman's rank correlation. The other parameter is clustering algorithms, including average linkage (clustering uses the centroids of the observations), complete linkage (clustering uses the farthest pair of observations between the two groups), single linkage (clustering uses the closest pair of observations) and Ward's linkage (clustering to minimize the sum of squares of any two clusters). Heatmap was presented as a visual aid in addition to the dendrogram also showing distance measure using euclidean, and clustering algorithm using ward.D, where dendrogram data values are transformed to an average color scale displaying high values in red and low values in blue. The study was developed with pre-specified tests and considering  $\alpha$ -PGL-I ELISA and PCR as reference standard and  $\alpha$ -Mce1A ELISA as index test.

### **3 Role of the funding source**

The funder of the study had no role in the study design, data collection, data analysis, data interpretation, or writing of the report. All authors had full access to all of the data in the study and had final responsibility for the decision to submit for publication.

## **4 Results**

### **4.1 Clinical and demographic findings**

The spontaneous demand for care at the health unit did not permit the recruitment of a population with no statistically significant difference in terms of age, which on average ranged from 41.1 to 58.5 years ( $P < 0.0001$ ) among the groups. Female sex was predominant among all individuals evaluated and ranged from 55.5 to 63.8% ( $P = 0.35$ ). 96.5% of NC were classified as MB and the most diagnosed clinical form was B (78.5%). Molecular diagnostic comparison

(PCR-RLEP) showed 94.9% negative results for HHC and 43.7% positivity for *M. leprae* DNA in NC ( $P<0.0001$ ) (**Table 1**).

#### **4.2 Anti-Mce1A and anti-PGL-I antibodies are biomarkers for the diagnosis of patients and their contacts**

The antibody profiles of  $\alpha$ -Mce1A protein and  $\alpha$ -PGL-I indexes in newly diagnosed HD patients (NC), household contacts of HD patients (HHC) and healthy endemic-control individuals (HEC) are represented in **Figure 1** as median and interquartile range (IQR).  $\alpha$ -Mce1A IgA levels were significantly higher in the NC [median: 1.39 (IQR: 1.00-2.02),  $P<0.0001$ ] and HHC [median: 1.17 (IQR: 0.83-1.83),  $P<0.0001$ ] groups as compared to the HEC group [median: 0.62 (IQR: 0.42-0.81)] (**Fig. 1A**). IgM  $\alpha$ -Mce1A was evidently increased in HHC [median: 1.57 (IQR: 0.95-2.47),  $P<0.0001$ ] and NC [median: 1.51 (IQR: 1.025-2.32),  $P<0.0001$ ] as compared to HEC [median: 0.63 (IQR: 0.43-0.81)] (**Fig. 1B**).  $\alpha$ -Mce1A IgG indexes were higher in the NC [median: 1.14 (IQR: 0.87-1.51),  $P<0.0001$ ] and HHC [median: 1.070 (IQR: 0.80-1.34)  $P<0.0001$ ] groups than in HEC [median: 0.80 (IQR: 0.68-0.96)] (**Fig. 1C**). The HHC group had moderate levels of  $\alpha$ -PGL-I IgM [median: 0.50 (IQR: 0.30-1.0),  $P=0.0041$ ] as compared to HEC [median: 0.4 (IQR: 0.2-0.6)]. The NC indexes against PGL-I [median: 0.6 (IQR: 0.22-1.1)] showed significant differences compared to the HEC indexes ( $P<0.0001$ ). (**Fig. 1D**).

#### **4.3 Performance of anti-Mce1A antibodies and IgM anti-PGL-I for HD diagnosis**

ROC curve analysis was performed to evaluate the performance of the three immunoglobulins against the Mce1A protein and IgM  $\alpha$ -PGL-I for the diagnosis of NC, and the area under the curve (AUC), cut-off, sensitivity and specificity values with 95% CI are shown in **Table 2**.  $\alpha$ -Mce1A IgA had the best significant performance with AUC=0.90 (CI: 0.87-0.93;  $P<0.0001$ ), with a case detection probability of 77.5% (CI: 71.1- 83.1%) and 89% (CI:81.2-94.4%) specificity. IgM showed a performance with AUC=0.87 (CI: 0.83-0.91;  $P<0.0001$ ), with a 76.5% chance of correct classification (CI: 70.0-82.2%) of new cases and an 88% probability of identifying true negative individuals (CI: 80.0-93.6%). The performance of the assay using IgA and IgM antibody was rated as having high accuracy (AUC>0.85) for screening HD patients. The serological test with IgG showed AUC=0.75 (CI: 0.69-0.80;  $P<0.0001$ ), 61.5% sensitivity (CI: 54.4-68.3%) and 96% specificity (CI: 90.1-98.9) and was classified as having a moderate probability of providing correct results (AUC=0.75-0.85). The  $\alpha$ -PGL-I test showed performance with an AUC=0.67 (CI: 0.61-0.72;  $P<0.0001$ ), 34.6% (CI: 28.5-41.2%)

probability of case detection and 96% (CI: 90.1-98.9%) specificity. The performance of  $\alpha$ -PGL-I serology was classified as having low accuracy (AUC<0.75). The absence of difference between NC and HHC in all analyses for immunoglobulin levels led to the evaluation of the ELISA performance only for the group of patients compared to controls (HEC).

#### 4.4 Positivity and evaluation of serological biomarkers in parallel

The performance of the  $\alpha$ -Mce1A assay was also evaluated based on the percentages of biomarker seropositivity (**Table 3**). IgA  $\alpha$ -Mce1A ELISA for NC was positive in 77.5% (155/200) of patients, IgM in 76.5% (153/200), IgG in 61.5% (123/200) and  $\alpha$ -PGL-I serology in 28.0% (56/200) of positive NC. HHC were 11.8%, 6.0%, 4.5%, 8.0% less seropositive for the tested antibodies, respectively, as compared to NC. The use of the  $\alpha$ -Mce1A immunoassay in NC compared with HEC showed 7.0x more positivity for IgA  $\alpha$ -Mce1A, 6.4 for IgM and 2.9 for IgG. None of the assays performed with HEC samples showed antibody indexes  $\geq 2.0$ . A positive serological test with a  $\geq 2.0$  index in HHC and NC, respectively, was obtained in 20.0% and 26.5% for IgA ELISA, in 32.4% and 34.0% for IgM ELISA, in 8.6% and 7.0% for IgG ELISA, and 3.8% and 2.0% for IgM  $\alpha$ -PGL-I. The use of the new  $\alpha$ -Mce1A IgA, IgM, and IgG biomarkers allowed an increase of 49.5%, 48.5%, and 33.5%, respectively, in the detection of NC as compared to the use of  $\alpha$ -PGL-I serology.

Parallel analysis of markers with  $\alpha$ -Mce1A ELISA showed results with up to 5.0% seropositivity for all antibodies tested in the HEC group and 14.3% and 17.0% for HHC and NC, respectively. Thus, the combination of positivity for two tested antibodies showed greater overlap for IgM+IgG in the HHC (27.6%) and for IgA+IgG in NC (36.0%), an increase of positivity of 5.7% for HHC and of 19.0% for NC, as compared to the serial evaluation with IgA+IgM+IgG. For all overlaps performed, NC showed better seropositivity results (**Table 3**). The low seropositivity and accuracy of the  $\alpha$ -PGL-I serology meant that the authors did not use it in the subsequent analyzes of the study.

#### 4.5 Multivariate Models employed to distinguish endemic controls, HD patients and contacts by means of the new serological biomarkers

The comparison of  $\alpha$ -Mce1A antibody levels among NC, HHC and HEC is shown in **Fig. 2**. The performance of the model was evaluated using the intercept coefficient of determination ( $R^2$ ), predictive relevance ( $Q^2$ ) and significance of the permutation test (PT). Multivariate PLS-DA [ $R^2=0.38$  (SD:0.01);  $Q^2=0.42$  (SD:0.28); PT:  $P=0.009$ ] showed two defined clusters for the HEC and NC groups [accuracy=0.95 (SD=0.008)] and had the highest scores driving the cluster

separation (LV1=56.99%) (**Fig. 2A**). HEC and HHC [ $R^2=0.40$  (SD:0.01);  $Q^2=0.36$  (SD:0.32); PT:  $P=0.009$ ] also obtained excellent accuracy [accuracy=0.93 (SD=0.011)] and scores driving the cluster separation (LV1=61.92%) (**Fig. 2D**). The analysis performance for the HHC and NC groups [ $R^2=0.01$  (SD:0.004);  $Q^2=-2.03$  (SD:4.3); PT:  $P=0.56$ ] was not satisfactory [accuracy=0.56 (SD=0.024); LV1=37.7%] (**Fig. 2G**). The ROC curve for model performance in discriminating the groups showed that IgM had the best accuracy in discriminating between HEC and NC (AUC=0.87) (**Fig. 2B**) and HEC and HHC (AUC=0.86) (**Fig. 2E**). The  $\alpha$ -Mce1A IgG antibody showed the lowest accuracy among these groups (AUC=0.75 and 0.72, respectively).  $\alpha$ -Mce1A antibodies showed a low performance of IgA (AUC=0.54), IgM (AUC=0.51) and IgG (AUC=0.50) in segregating HHC and NC due to the absence of difference in immunoglobulin levels in these groups (**Fig. 2H**).

The ranking of the evaluated antibodies indicated that, in the discrimination among the groups after multivariate analysis, IgA  $\alpha$ -Mce1A obtained a VIP score higher than 1 (VIP: 1.22; 1.13; 1.51), being the biomarker most responsible for the clustering of these groups (**Fig. 2C, F, I**). The IgM antibody was the second relevant biomarker distinguishing between NC and HHC versus HEC (VIP: 0.96; 0.99, respectively). However, the IgG antibody was found to be the second most ideal biomarker only for the analyses between HHC and NC (VIP: 0.74) (**Fig. 2I**).

#### 4.6 Anti-Mce1A antibodies associated with HD diagnosis by means of Shapley values

Comparative assessment of  $\alpha$ -Mce1A antibody levels in HHC and NC had preferably positive Shapley values, suggesting that these conditions always tended to diagnose infection and/or disease. The values were represented as group means and as minimum and maximum values of individuals. Figures 3 A, C, and E plotted Shapley values for each individual while figures 3 B, D, and F the average of the absolute values (modules). The IgA antibody showed the highest positive Shapley value in the analyses between HEC and NC (**Fig. 3 A-B**) i.e., 0.173 (range: -0.348-1.017), a value of 0.169 (range: -0.329-0.707) between HEC and HHC (**Fig. 3 C-D**), and a lower value of 0.039 (range: -0.096-0.215) between HHC and NC (**Fig. E-F**). The Shapley values of IgG  $\alpha$ -Mce1A for HHC and NC as compared to HHC and HEC appear clustered and partially negative [0.017 (-0.301-0.032)], thus suggesting that antibody positivity in these groups had less potential for association with the diagnosis of HD due to their similar response. On the other hand, the IgG antibody ranked better than the IgM  $\alpha$ -Mce1A antibody in the evaluation of the difference between HHC and NC. IgM was found to be clustered and with most positive Shapley values (**Fig. 3 E-F**) [0.013 (-0.019-0.112)], thus being the marker that,

after IgA, showed a positive impact on HD diagnosis between HHC and NC. In light of these results, the values obtained with the IgA and IgM  $\alpha$ -Mce1A antibodies ranged from negative to positive for all group comparisons, thus suggesting that these conditions were always leaning towards HD diagnosis (**Fig. 3 A-F**).

Thus, the higher the IgA value, more PLS-DA tended to classify the individual as NC, and the lower its value or negative as HEC. The same is true for IgM. For IgG, the higher its value, the more the model tended to classify as HEC. This behavior was caused by the association of the IgG antibody with treated patients and low seropositivity in the diagnosis. The figure in (B) shows that IgA contributed more than IgM, which contributed more than IgG. In (C), the higher the Shapley value, the more the model tended to classify as HHC. In (E), the higher the Shapley value, the more the model ranked the individual as NC.

#### **4.7 Correlation of Immunoglobulins against Mce1A protein**

Matrix correlation of  $\alpha$ -Mce1A antibody levels among the study groups was calculated and the values are shown in color scale. NC and HEC showed a fair correlation between IgA and IgM ( $r=0.46$ ;  $P<0.001$ ) and between IgA and IgG ( $r=0.50$ ;  $P<0.001$ ). IgM and IgG showed a moderate positive correlation ( $r=0.66$ ;  $P<0.001$ ) between these two groups (Fig. 4A). All positive correlations were fair for HHC and HEC, with  $r=0.42$ - $0.59$  ( $P<0.001$ ) (**Fig. 4B**). The correlation between HHC and NC for IgA and IgM was poor ( $r=0.074$ ;  $P=0.186$ ) and the correlation for IgA versus IgG and for IgM versus IgG was classified as fair ( $r=0.42$ ;  $P<0.001$ ) and moderate ( $r=0.59$ ;  $P<0.001$ ), respectively (**Fig. 4C**). Further analyses demonstrated that  $\alpha$ -Mce1A IgA correlated poor ( $r=0.15$ ;  $P=0.04$ ), IgM, and IgG ( $r=0.37$ ;  $P<0.0001$ ) fair with  $\alpha$ -PGL-I indices. The proposed assay with Mce1A was able to detect different individuals in comparison with PGL-I serology.

#### **4.8 Anti-Mce1A serology was able to provide hierarchical clustering for the individuals evaluated**

We combined these plasma antibodies indexes with the group's classification in HEC, HHC, and NC to apply machine learning using hierarchical methods of cluster analysis and as the main objective of the algorithm to provide the level of importance of each biomarker for each group through the heatmap. The following results were obtained:  $\alpha$ -Mce1A IgA and IgM serology yielded essential results for NC identification as compared to HEC (**Fig. 5A**); positivity for ELISA IgA was responsible for the clustering of HHC, while IgG ELISA was

responsible for the clustering of HEC (**Fig. 5B**), showing a very low involvement of IgM serology in the clustering of these two groups (HHC and HEC); positive samples for IgA and IgM distinguished NC from HHC, with IgA being the most intense antibody in terms of clustering performance in the HHC group (**Fig. 5C**).

## 5 Discussion

The present results confirm the biomarker potential of  $\alpha$ -Mce1A antibodies in the diagnosis of patients with HD, the screening of their contacts, and the assessment of exposure to the bacillus in endemic regions (Fig. 6). The published results (11,12) of the analysis with antibody levels in the different clinical forms and operational classification do not show differences between these groups for levels of  $\alpha$ -Mce1A immunoglobulins. Also, there is no correlation or association between PCR positivity or bacillary load with positivity or higher levels of  $\alpha$ -Mce1A antibodies in the tested samples. Thus,  $\alpha$ -Mce1A serology differs from the  $\alpha$ -PGL-I tool, which has been consolidated in the literature for correlation with bacillary load, operational classification, and multibacillary clinical forms. Therefore, the work analysis strategies aimed to identify patients with HD regardless of clinical classification and laboratory results for PCR, bacilloscopy, and  $\alpha$ -PGL-I serology.

Serological testing for IgA is presented as an additional tool for the diagnosis and classification of HD, with potential utility for exposure monitoring of household contacts. In agreement with our data, Silva et al (2021) reported greater IgA reactivity against the conjugated antigen formed by natural octyl disaccharide linked to human serum albumin (NDO-HSA) among household contacts of PB and MB patients than among non-endemic controls (19). Accordingly,  $\alpha$ -Mce1A IgA showed satisfactory accuracy (AUC 0.90) with 77.5% sensitivity and 89.0% specificity and revealed greater seropositivity of the immunoglobulins tested in patients, with 77.5% for new cases and 65.7% for contacts. In parallel, our analyses show that IgA was the antibody most responsible for clustering contacts between patients and endemic controls.

IgA is an antibody associated with the mucosal response, the main gateway of the bacillus in the establishment of infection, participating in the early stages of HD and in subclinical infection (19,20,21). The importance of IgA for host mucosal immunity is well established and, although its role in the systemic circulation has not been fully elucidated (22), its usefulness as an immunological marker in laboratory tests has been confirmed.

Most published studies use IgM as a target molecule in serological assays in view of the fact that the seroprevalence of  $\alpha$ -PGL-I IgM is higher than the seroprevalence of IgA and IgG in endemic areas (23). IgM-seropositive individuals are at higher risk of developing the disease

(24); however, IgM seropositivity is not predictive of the disease, as demonstrated with  $\alpha$ -PGL-I IgG (5, 25). The findings using IgM and  $\alpha$ -PGL-I IgG corroborate the data obtained with  $\alpha$ -Mce1A serology. In the evaluation of previous *M. leprae* infection as a risk factor for diagnosed transmission through IgM  $\alpha$ -PGL-I serology, IgM represents a biomarker of greater sensitivity than IgG since it can be detected in many individuals already infected with the bacillus despite the absence of disease (23, 26, 27). The diagnostic performance of  $\alpha$ -PGL-I ELISA was only 28.0% for new cases of HD and 20.0% for their contacts, with a 34.6% probability of case detection, and 96.0% specificity. Thus, 48.5% fewer positives were identified in comparison with IgM  $\alpha$ -Mce1A serology.

IgM  $\alpha$ -Mce1A had high accuracy (AUC 0.87) with a chance of correct classification of 76.5% of new cases and 88.0% specificity; 76.5% of newly diagnosed patients with the disease and 70.5% of household contacts were seropositive in ELISA.

Positive results with a high index indicate the priority for screening, new clinical and laboratory evaluations, and monitoring of contacts, mainly with indexes  $\geq 2.0$ . These results were obtained here in 32.4% of contacts and 34.0% of new HD cases with positivity in the IgM  $\alpha$ -Mce1A immunoassay. Thus, IgM is the key antibody for the clustering of new cases in relation to the other groups evaluated (HHC and HEC).

The ELISA results for all tested immunoglobulins were negative for an index  $\geq 2.0$  in healthy individuals from the endemic region, emphasizing the importance of serologies with a high value of seropositivity ( $\geq 2.0$ ) in patients and their contacts. IgA serology with values  $\geq 2.0$  was positive in 26.5% of patients (NC) and 20.0% of contacts. On the other hand, rates higher than  $\geq 2.0$  for IgG  $\alpha$ -Mce1A were only detected in 7.0% of the cases and 8.6% of the contacts. Thus, having positive serology for the contact and the case demonstrates the need for greater clinical surveillance of these individuals and the differentiation between these groups will be based on the clinical diagnosis, which remains the confirmatory evidence and gold standard for the diagnosis of HD.

Disease control and protective immunity in HD are associated with effective cellular immunity of T cell responses. Studies evaluating antibody responses are primarily focused on their utility as a serological diagnostic tool. Rada et al (2012) showed that IgG responses decrease in MB and PB patients during treatment with MDT when using IgG against *M. leprae* antigens such as ML0405, ML2331, and LID-1 aiming to monitor the treatment of patients with the non-reactive LL form (28). However, data from assays targeting the detection of  $\alpha$ -Mce1A IgG show variable seropositivity according to endemicity, showing that there may be a lower frequency of positives (61.5%) in less endemic regions and a high seroprevalence in new cases

in a hyperendemic region (84.0%), as reported by Lima et al (2022). Patients treated with MDT had the highest rate of IgG positivity, which was detected in 89.5% of the patients evaluated in the study (12).

Recently, different cases of patients treated at an emergency unit in the Brazilian southeast were clinically diagnosed with HD and characterized by presenting hypoanesthetic skin lesions and thickened nerves, with peripheral nerve ultrasound demonstrating asymmetric and focal multiple mononeuropathy, and also with a positive molecular diagnosis in all patients tested by RLEP-PCR. Confirming the potential and innovative aspect of the new markers proposed for HD serology, 71.4%, 100%, and 42.8% of patients were positive for IgA, IgM, and IgG  $\alpha$ -Mce1A, respectively. However, 100% were negative for  $\alpha$ -PGL-I IgM (29).

Laboratory assays using  $\alpha$ -PGL-I and  $\alpha$ -LID-1 by ELISA and rapid test platforms with NDO-LID show low sensitivity and accuracy and are not recommended for isolated use in the diagnosis of HD, considering the complexity of the immunological presentations and the clinical aspects of the disease. A study by Frade et al (2017) demonstrated 48-62% sensitivity and 70% specificity for  $\alpha$ -PGL-I and  $\alpha$ -LID ELISA and 40% specificity for NDO-LID (30). Other reports evaluating different studies with protocols using the PGL-I antigen demonstrated an average sensitivity of 63.8% and an average specificity of 91% as a diagnostic method in HD but are indicated mainly in MB cases, due to low positivity in PB cases. (6).

The development of serological tests using antigens shared by a genus of a pathogen requires the evaluation of potential factors that can cause cross-reactivity in the results, such as vaccination with BCG, which is widespread in Brazil (> 90%) (31). The response to  $\alpha$ -Mce1A antibodies was evaluated by Lima et al (2017) in individuals with one or two BCG scars. However, in this study, we did not evaluate the response in newly vaccinated contacts and the proposal of the serological diagnosis during the clinical investigation of the patients and contacts before any prophylactic and/or therapeutic method for HD. Levels of antibodies against *M. tuberculosis* proteins (32) and LTBI did not induce distinct levels of  $\alpha$ -Mce1A antibodies in the diagnosis of HD patients (11,12,33). A linear immunodominant epitope KRRITPKD (residues 131 and 138 in Mce1A) is highly conserved in *M. tuberculosis*, which is a possible explanation for the difference in response between patients with tuberculosis and HD, despite the homology between the mce1 gene (12, 34). Thus, allowing less chance of cross-reactions between individuals infected with both species of mycobacteria. However, it is a limitation of the  $\alpha$ -Mce1A antibody assay for diagnosing HD in patients also diagnosed with or with a recent history of active tuberculosis. We sought to use three different antibodies (IgA, IgM, and IgG) to minimize bias and ensure the different proposed interpretations, such as

diagnosis, potential subclinical infection, contact with *M. leprae*, and patients already treated for HD.

In parallel, for the determination of the cut-off value in populations with different endemic profiles, we need to know the pretest probability of the disease of interest as well as the costs incurred by misdiagnosis. Accordingly, the cut-off value is not universal and should be determined for each region and each disease condition according to endemicity (35). We still do not have commercially available serological tests capable of detecting cases with high sensitivity and accuracy. Thus, more exploratory studies to characterize new molecules capable of providing an immunological signature with high sensitivity and maintaining specificity are implemented as an advance in the search for new technologies to aid in the diagnosis of HD and the screening of contacts. Currently,  $\alpha$ -Mce1A serology has not been able to distinguish contacts and patients with active disease, requiring further studies to understand whether seropositivity for the markers among household contacts is a predictor of the development of active disease or will only allow the identification of the contact with the bacillus regardless of disease progression. The seropositivity pattern of contacts for the tested immunoglobulins, similar to that found in patients and absent in healthy endemic controls, contributes as one more alert test for better clinical follow-up of positive contacts.  $\alpha$ -Mce1A serology corrects the main shortcomings in accuracy of the previous serology (PGL-I), as it demonstrates greater sensitivity, regardless of the clinical form or bacillary load.

The PCR-RLEP technique proved to be a methodology for identifying patients at diagnosis due to its positive rate (33.3%). The molecular technique showed performance with a positivity rate of 3.8% in household contacts. Thus, it represents another high-specificity diagnostic platform assisting with the diagnosis and screening of potential subclinical cases. Sensitivity can range from 51% to 91%, and specificity from 46% to 100% (6). A study published in the same endemic region identified a PCR positivity rate of 41.0% and sensitivity and specificity of 41.0% and 100% for HD patients, respectively (7). The evaluation of cases using complex neurological assessment techniques permits a better classification of patients into MB forms (2). In the present study more than 70.0% of the cases were diagnosed with the B clinical form and 96.5% with the MB form, mainly in patients with atypical hypochromatic macules with altered sensation, neurological findings on hands and feet, and lower bacillary load.

In line with the search for new tools for an early diagnosis such as ELISA  $\alpha$ -Mce1A, the treatment of these cases is the next step towards achieving the goal of eliminating the disease in the community. As reported by the WHO, case detection and treatment with MDT alone are insufficient strategies to interrupt transmission. Thus, to boost the prevention of HD, the current

recommendation is an active search of the household and social contacts of each patient, accompanied by the offer of preventive chemotherapy (3).

In summary, the present data suggest that combined serological testing based on IgA, IgM, and IgG  $\alpha$ -Mce1A antibodies should be performed in order to ensure an interpretation of the three possibilities proposed for the new markers: positive IgA and/or IgG indicative of contact with the bacillus due to the strong positive correlation between these antibodies; positive IgM for diagnosis or priority for further clinical follow-up of contacts; Negative IgM and positive IgG as a form of therapeutic monitoring after MDT use. Serological assays are complementary diagnostic platforms, clinical correlation is always necessary and the region's endemicity is considered. Finally, the incorporation of new diagnostic technologies makes it possible to eliminate the main gaps in the laboratory diagnosis of HD with the implementation of tools of greater sensitivity and accuracy while maintaining satisfactory specificity. This procedure contributes to the goals of the WHO for the identification of initial and infected cases and for the interruption of bacillary transmission in the family environment, effectively reaching zero disability and eliminating the stigma of Hansen's Disease.

## **6 Acknowledgments**

We thank the staff members and all patients who agreed to participate in this study. The NDO-BSA\_reagent was obtained through BEI Resources, NIAID, NIH.

## **7 Data availability statement**

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors without undue reservation.

## **8 Ethics statement**

The studies involving human participants were reviewed and approved by the Institutional Review Board for Human Research of HCFMRP-USP (Protocol number 4.142.534/2020). The patients/participants gave written informed consent to participate in this study.

## **9 Authors' contributions**

FL and MF substantially contributed to study conception and design, acquisition of data, and/or analysis and interpretation of data. HL, FP, NF and MF contributed to the clinical care of patients. VA, GF and GD provided acquisition of clinical data. FL and NP executed and interpreted the laboratory tests. FL, MS and DT contributed to statistical analysis and

interpretation of the data. LR and SA provided scientific guidance and advice. MF gave final approval of the final submitted version and provided supervision and orientation of the study. All authors contributed to the interpretation of the results and to critical revision.

## 10 Conflict of Interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## 11 Funding

This study was financed in part by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brazil (CAPES)-Finance Code 001 and with Ph.D. scholarships for GM and MS, by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) with Ph.D. scholarships for FL and a research grant for MF (423635/2018-2), by the Unified Scholarships Program (PUB-USP) for VA and GF, by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) with a research grant 2021/13429-1, by the Brazilian Health Ministry (MS/FAEPA-FMRP-USP: 749145/2010 and 767202/2011), and by the Oswaldo Cruz Foundation-Ribeirão Preto (TED 163/2019–Protocol N° 25380.102201/2019-62/Project Fiotec: PRES-009-FIO-20). We also acknowledge the financial support of the Research and Assistance Support Foundation of the Hospital of the Medical School of Ribeirão Preto at USP (FAEPA) to the National Referral Center for Sanitary Dermatology and HD.

## 12 References

1. Randhawa A, Kapila R, Schwartz RA. Leprosy: what is new. *Int J Dermatol.* (2022) 61(6):733-738. doi: 10.1111/ijd.15998.
2. Frade MAC, Bernardes Filho F, Silva CML, Voltan G, Lima FR, Abi-Rached TLC, et al. Evaluation of altered patterns of tactile sensation in the diagnosis and monitoring of leprosy using the Semmes-Weinstein monofilaments. *PLoS One.* (2022) 17(8):e0272151. doi: 10.1371/journal.pone.
3. Towards Zero Leprosy. Global Leprosy (Hansen's disease) Strategy 2021–2030. New Delhi: World Health Organization, Regional Office for South-East Asia (2017). Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
4. WHO. Global leprosy update, 2020: impact of COVID-19 on global leprosy control. *Weekly Epidemiol Rec Genebra.* (2021) 36:421–44.
5. Richardus RA, van der Zwet K, van Hooij A, Wilson L, Oskam L, Faber R, et al. Longitudinal assessment of anti-PGL-I serology in contacts of leprosy patients in Bangladesh. *PLoS Negl Trop Dis.* (2017) 11(12): e0006083. doi: 10.1371/journal.pntd.0006083.
6. Gurung P, Gomes CM, Vernal S, Leeflang MMG. Diagnostic accuracy of tests for leprosy: a systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect.* (2019) 25:1315–27. doi: 10.1016/j.cmi.2019.05.020.

7. Lima FR, de Paula NA, Simões MMR, Manso GMdC, Albertino GS, Felisbino GC, et al. Bacilloscopy and polymerase chain reaction of slit-skin smears and anti-phenolic glycolipid-I serology for Hansen's disease diagnosis. *Front Med.* (2022) 9:972244. doi: 10.3389/fmed.2022.972244.
8. Gobbo AR, Bouth RC, Moraes TMP, Pinto P, da Costa PF, Barreto JG, et al. NDO-BSA, LID-1, and NDO-LID antibody responses for infection and RLEP by quantitative PCR as a confirmatory test for early leprosy diagnosis. *Front Trop Dis.* (2022) 3:850886. doi: 10.3389/fitd.2022.850886
9. Arruda S, Bomfim G, Knights R, Riley LW. Cloning of an *M. tuberculosis* DNA fragment associated with entry and survival inside cells. *Science.* (1993) 261:1454–7. doi: 10.1126/science.8367727.
10. Sato N, Fujimura T, Masuzawa M, Yogi Y, Matsuoka M, Kanoh M, et al. Recombinant *Mycobacterium leprae* protein associated with entry into mammalian cells of respiratory and skin components. *J Dermatol Sci.* (2007) 46:101–10. doi: 10.1016/j.jdermsci.2007.01.006.
11. Lima FR, Takenami I, Cavalcanti MAL, Riley LW, Arruda S. ELISA-based assay of immunoglobulin G antibodies against mammalian cell entry 1A (Mce1A) protein: a novel diagnostic approach for leprosy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* (2017) 112:844–9. doi: 10.1590/0074-02760160549
12. Lima FR, Filho FB, Antunes VMG, Santana JM, de Almeida RCP, Toro DM, et al. Serological Immunoassay for Hansen's Disease Diagnosis and Monitoring Treatment: Anti-Mce1A Antibody Response Among Hansen's Disease Patients and Their Household Contacts in Northeastern Brazil. *Front Med.* (2022) 9:855787. doi: 10.3389/fmed.2022.855787.
13. WHO. Guidelines for the Diagnosis, Treatment and Prevention of Leprosy. New Delhi: World Health Organization (2018).
14. Frade MAC, Rosa DJF, Bernardes Filho F, Spencer JS, Foss NT et al. Semmes-Weinstein monofilament: A tool to quantify skin sensation in macular lesions for leprosy diagnosis. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* (2021) 87(6):807-815. doi: 10.25259/IJDVL\_622\_19.
15. Bernardes Filho F, Silva CML, Voltan G, Leite MN, Rezende ALRA, de Paula NA, et al. Active search strategies, clinicoimmunobiological determinants and training for implementation research confirm hidden endemic leprosy in inner São Paulo, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* (2021) 15: e0009495. doi: 10.1371/journal.pntd.0009495.
16. Azevedo MC, Ramuno NM, Fachin LR, Tassa M, Rosa PS, Belone AF, et al. qPCR detection of *Mycobacterium leprae* in biopsies and slit skin smear of different leprosy clinical forms. *Braz J Infect Dis.* (2017) 21:71–8. doi: 10.1016/j.bjid.2016.09.017.
17. Bowers, AJ, Zhou, X. Receiver Operating Characteristic (ROC) Area Under the Curve (AUC): A Diagnostic Measure for Evaluating the Accuracy of Predictors of Education Outcomes. *J Educ Stud Placed Risk.* (2019). doi: 10.1080/10824669.2018.1523734.
18. Akoglu H. User's guide to correlation coefficients. *Turk J Emerg Med* (2018) 18(3):91-93. doi: 10.1016/j.tjem.2018.08.001.
19. Silva KKPE, de Oliveira EE, Elias CMM, Pereira IE, Pinheiro RO, et al. Serum IgA Antibodies Specific to *M. leprae* Antigens as Biomarkers for Leprosy Detection and Household Contact Tracking. *Front Med* (Lausanne). (2021) 8: 698495. doi: 10.3389/fmed.2021.698495.
20. Schwerer B, Chujor CS, Bernheimer H, Radl J, Haaijman JJ, et al. IgA antibodies against phenolic glycolipid I from *Mycobacterium leprae* in serum of leprosy patients and contacts: Subclass distribution and relation to disease activity. *Clin Immunol Immunopathol.* (1989) 53: 202–11. doi: 10.1016/0090-1229(89)90050-0.
21. 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 Lep Other Mycobact Dis.* (1991) 59: 441–9.

22. de Macedo AC, Guimarães JA, Rodrigues RO, Araújo TDV, Tavares CM et al. Serum anti-phenolic glycolipid-1 IgA correlates to IgM isotype in leprosy patients: a possible candidate for seroepidemiological surveys? *J Clin Lab Anal.* (2018) 32 (3): e22276. doi: 10.1002/jcla.22276.
23. Pierneef L, van Hooij A, Taal A, Rumbaut R, Nobre ML, et al. Detection of anti-*M. leprae* antibodies in children in leprosy-endemic areas: A systematic review. *PLoS Negl Trop Dis.* (2021) 15 (8): e0009667. doi: 10.1371/journal.pntd.0009667.
24. Gormus BJ, Baskin GB, Xu K, Ratterree MS, Martin LN, et al. Antileprosy protective vaccination of rhesus monkeys with BCG or BCG plus heat-killed *Mycobacterium leprae*: immunologic observations. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* (2000) 68 (1): 27–39.
25. TiemiNagao-Dias A, Casimiro de Macedo A, Rodrigues RO, Pedroza FHC, Albuquerque AA, et al. Serum Anti-PGL-1 IgG, IgM, and IgA in a 3-Year Follow-up Study of 4-15-Year-old Leprosy Contacts. *Pediatr Infect Dis J.* (2019) 38 (9): e193–e8. doi: 10.1097/INF.0000000000002337.
26. Cho SN, Yanagihara DL, Hunter SW, Gelber RH, Brennan PJ. Serological Specificity of Phenolic Glycolipid-I from *Mycobacterium-Leprae* and Use of Serodiagnosis in Leprosy. *Int J Leprosy.* (1983) 51 (4): 659–60. doi: 10.1128/iai.41.3.1077-1083.1983.
27. Bach MA, Wallach D, Flageul B, Hoffenbach A, Cottenot F. Antibodies to Phenolic Glycolipid-1 and to Whole *Mycobacterium-Leprae* in Leprosy Patients—Evolution during Therapy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* (1986) 54 (2): 256–67.
28. Rada E, Duthie MS, Reed SG, Aranzazu N, Convit J. Serologic follow-up of IgG responses against recombinant mycobacterial proteins ML0405, ML2331 and LID-1 in a leprosy hyperendemic area in Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* (2012) 107(1): 90-4. doi: 10.1590/s0074-02762012000900015.
29. Bernardes-Filho F, Lima FR, Voltan G, de Paula NA, Frade MAC. Leprosy case series in the emergency room: A warning sign for a challenging diagnosis. *Braz J Infect Dis* (2021) 25 (5): 101634. doi: 10.1016/j.bjid.2021.101634.
30. Frade MA, de Paula NA, Gomes CM, Vernal S, Bernardes Filho F, et al. Unexpectedly high leprosy seroprevalence detected using a random surveillance strategy in midwestern Brazil: A comparison of ELISA and a rapid diagnostic test. *PLoS Negl Trop Dis.* (2017) 11 (2): e0005375. doi: 10.1371/journal.pntd.0005375.
31. Domingues CMAS, Teixeira AMS. Coberturas vacinais e doenças imunopreveníveis no Brasil no período 1982–2012: avanços e desafios do Programa Nacional de Imunizações. *Epidemiol Serv Saúde.* (2013) 22 (1): 9–27. doi: 10.5123/S1679-49742013000100002.
32. Schmidt CM, Lovero KL, Carvalho FR, Dos Santos DCM, Barros ACMW, et al. Serum anti-Mce1A immunoglobulin detection as a tool for differential diagnosis of tuberculosis and latent tuberculosis infection in children and adolescents. *Tuberculosis* (Edinb). (2020) 120:101893. doi: 10.1016/j.tube.2019.101893.
33. Takenami I, de Oliveira CC, Lima FR, Soares J, Machado A Jr, et al. Immunoglobulin G response to mammalian cell entry 1A (Mce1A) protein as biomarker of active tuberculosis. *Tuberculosis* (Edinb). (2016) 100: 82-88. doi: 10.1016/j.tube.2016.07.012.
34. Harboe M, Das AK, Mitra D, Ulvund G, Ahmad S, et al. Immunodominant B-cell epitope in the Mce1A mammalian cell entry protein of *Mycobacterium tuberculosis* cross-reacting with glutathione S-transferase. *Scand J Immunol.* (2004) 59(2):190-7. doi: 10.1111/j.0300-9475.2004.01383.x.
35. Habibzadeh F, Habibzadeh P, Yadollahie M. On determining the most appropriate test cut-off value: the case of tests with continuous results. *Biochem Med (Zagreb).* (2016) 26(3): 297-307. doi: 10.11613/BM.2016.034.

## 13 Tables

**Table 1.** Study population characteristics (N=405).

	HEC n=100	HHC n=105	NC n=200	P-value
Age, years, mean (SD)	58.5 (16.7)	41.1 (17.7)	54.2 (17.2)	<0.0001 <sup>a</sup>
Sex, n (%)				
Male	40 (40.0)	38 (36.2)	89 (44.5)	0.35 <sup>b</sup>
Female	60 (60.0)	67 (63.8)	111 (55.5)	
Operational Classification, n (%)				
PB	-	-	7 (3.5)	
MB	-	-	193 (96.5)	
Clinical Form, n (%)				
I	-	-	1 (0.5)	
TT	-	-	6 (3.0)	
B	-	-	157 (78.5)	
BL	-	-	5 (2.5)	
LL	-	-	10 (5.0)	
N	-	-	21 (10.5)	
PCR-RLEP, n (%)				
Negative	-	75 (94.9) <sup>c</sup>	80 (43.7) <sup>d</sup>	<0.0001 <sup>b</sup>
Positive	-	3 (3.8)	61 (33.3)	

<sup>a</sup>Comparison by the Kruskal–Wallis test.

<sup>b</sup>Comparison by the chi-square test.

<sup>c</sup>Data not available for 14 HHC.

<sup>d</sup>Data not available for 53 NC.

HEC, healthy endemic controls; HHC, household contacts of HD patients; NC, new cases of HD; SD, standard deviation; PB, paucibacillary; MB, multibacillary; I, indeterminate; TT, tuberculoid; B, borderline; BL, borderline-lepromatous; LL, lepromatous; N, neural; PCR-RLEP, quantitative polymerase chain reaction-specific repetitive element.

**Table 2.** Comparison of the performance of IgA, IgM and IgG  $\alpha$ -Mce1A protein and IgM  $\alpha$ -PGL-I for the diagnosis of new HD Cases (n=200)

Antibody	AUC (95%CI)	P-value	Cut-off (O.D)	Sensitivity % (95%CI)	Specificity % (95%CI)	LR+
$\alpha$ -Mce1A IgA	0.90 (0.87-0.93)	<0.0001	0.189	77.5 (71.1-83.1)	89.0 (81.2-94.4)	7.045
$\alpha$ -Mce1A IgM	0.87 (0.83-0.91)	<0.0001	0.146	76.5 (70.0-82.2)	88.0 (80.0-93.6)	6.375
$\alpha$ -Mce1A IgG	0.74 (0.69-0.80)	<0.0001	0.172	61.5 (54.4-68.3)	79.0 (69.7-86.5)	2.929
$\alpha$ -PGL-I IgM	0.67 (0.61-0.72)	<0.0001	0.295	34.6 (28.5-41.2)	96.0 (90.1-98.9)	8.662

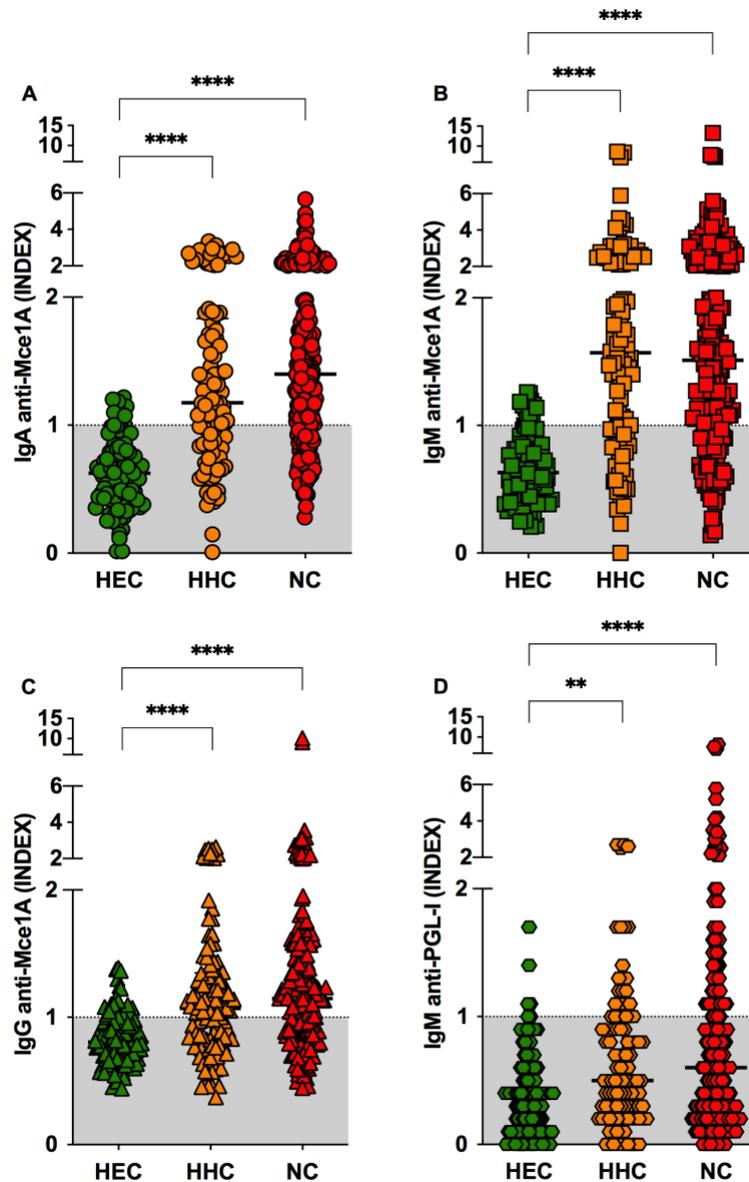
AUC, area under the curve; CI, confidence interval; O.D., optical density; LR+, positive likelihood ratio; Mce1A, mammalian cell-entry protein 1A; IgA, immunoglobulin A; IgM, immunoglobulin M; IgG, immunoglobulin G; PGL-I, phenolic glycolipid-I.

**Table 3.** Positivity profile of serological biomarkers in HD diagnosis

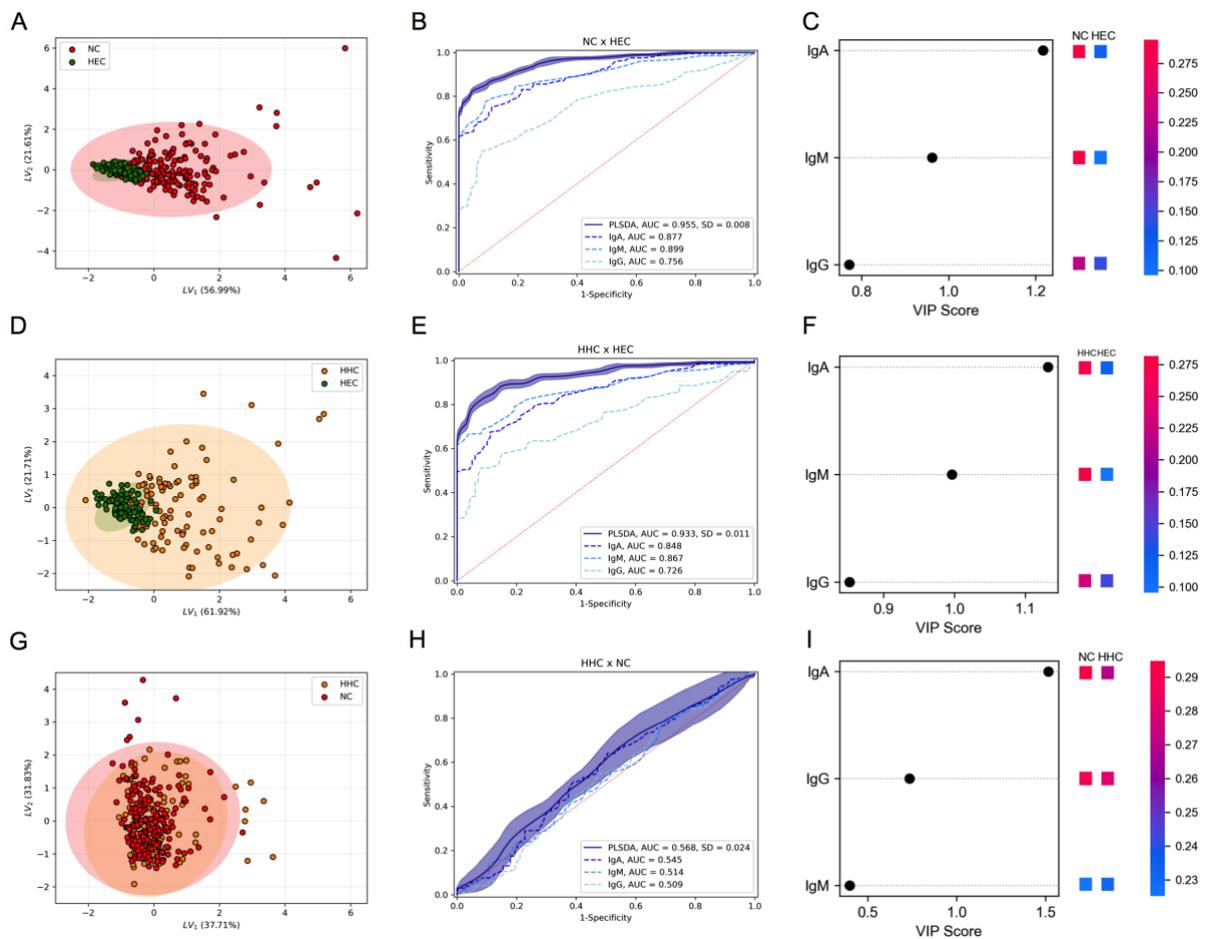
Seropositivity n (%)	HEC (n=100)	HHC (n=105)	NC (n=200)
<b><math>\alpha</math>-Mce1A IgA</b>			
>1.0 <2.0	11 (11.0)	48 (45.7)	102 (51.0)
$\geq 2.0$	0 (0)	21 (20)	53 (26.5)
Total	11 (11.0)	69 (65.7)	155 (77.5)
<b><math>\alpha</math>-Mce1A IgM</b>			
>1.0 <2.0	12 (12.0)	40 (38.1)	85 (42.5)
$\geq 2.0$	0 (0)	34 (32.4)	68 (34.0)
Total	12 (12.0)	74 (70.5)	153 (76.5)
<b><math>\alpha</math>-Mce1A IgG</b>			
>1.0 <2.0	21 (21.0)	51 (48.6)	109 (54.5)
$\geq 2.0$	0 (0)	9 (8.6)	14 (7.0)
Total	21 (21.0)	60 (57.2)	123 (61.5)
<b><math>\alpha</math>-PGL-I IgM</b>			
>1.0 <2.0	4 (4.0)	17 (16.2)	39 (19.5)
$\geq 2.0$	0 (0)	4 (3.8)	17 (8.5)
Total	4 (4.0)	21(20.0)	56 (28.0)
<b><math>\alpha</math>-Mce1A IgA+IgM+IgG</b>			
>1.0 <2.0	1 (1.0%)	10 (9.5)	26 (13.0)
$\geq 2.0$	0 (0)	5 (4.8)	8 (4.0)
Total	1 (1.0%)	15 (14.3)	34 (17.0)
<b><math>\alpha</math>-Mce1A IgA+IgM</b>			
>1.0 <2.0	2 (2.0%)	15 (14.3)	44 (22.0)
$\geq 2.0$	0 (0)	6 (5.7)	16 (8.0)
Total	2 (2.0%)	21 (20.0)	60 (30.0)
<b><math>\alpha</math>-Mce1A IgA+IgG</b>			
>1.0 <2.0	5 (5.0%)	1 (0.9)	61 (30.5)
$\geq 2.0$	0 (0)	8 (7.6)	11 (5.5)
Total	5 (5.0%)	9 (8.5)	72 (36.0)
<b><math>\alpha</math>-Mce1A IgM+IgG</b>			
>1.0 <2.0	4 (4.0%)	23 (21.9)	48 (24.0)
$\geq 2.0$	0 (0)	6 (5.7)	10 (5.0)
Total	4 (4.0%)	29 (27.6)	58 (29.0)

HEC, healthy endemic controls; HHC, household contacts of HD patients; NC, new cases of HD; Mce1A, mammalian cell-entry protein 1A; IgA, immunoglobulin A; IgM, immunoglobulin M; IgG, immunoglobulin G.

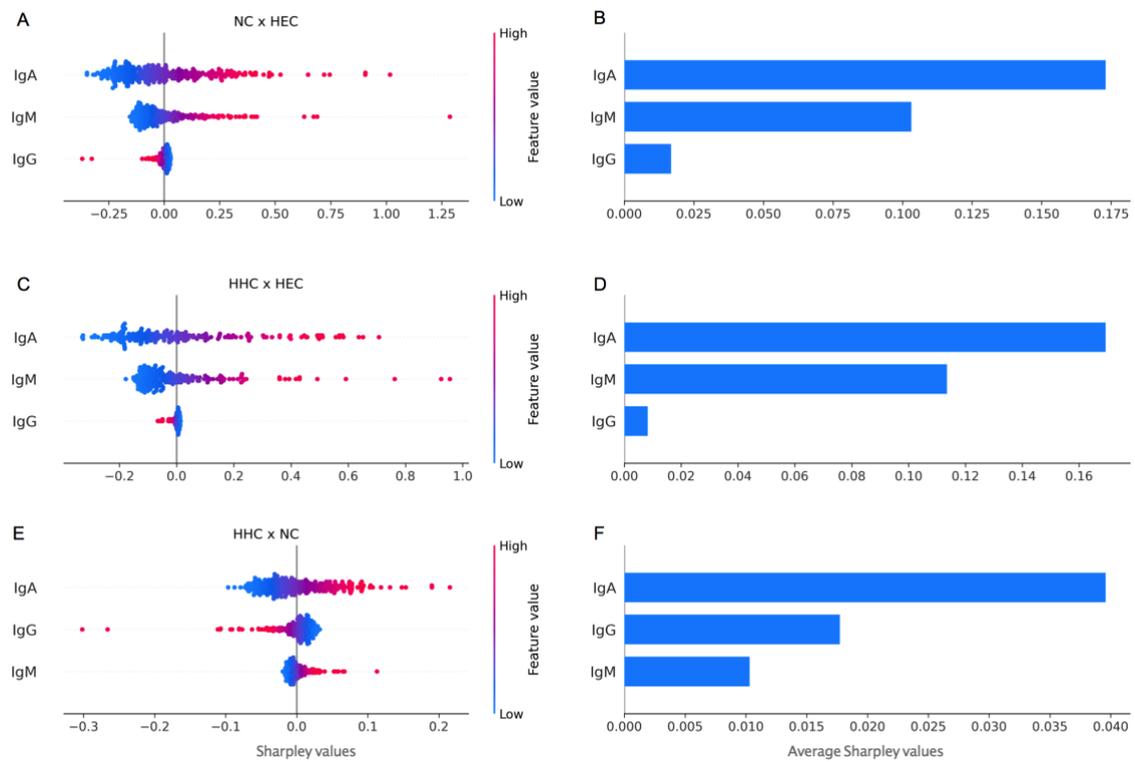
## 14 Figures and legends



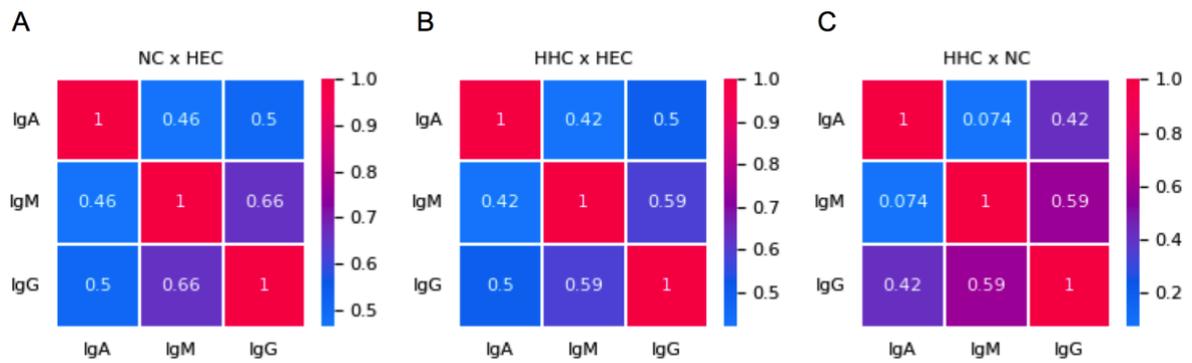
**Figure 1.** Biomarkers for the diagnosis of HD patients and their contacts. IgA (A), IgM (B), IgG (C)  $\alpha$ -Mce1A and anti-PGL-I (D) antibody indexes in plasma samples from HEC (n = 100), HHC (n=105) and NC (n=200). Statistical significance was determined by the Kruskal Wallis test followed by the Dunn test; significance was considered at \*\*\*\* $P < 0.0001$  and, \*\* $P = 0.0041$ . The respective index was calculated by dividing the optical density (O.D. 450 nm) of each sample by the cut-off. Indexes above 1.0 were considered positive. HEC, healthy endemic controls; HHC, household contacts of HD patients; NC, new cases of HD; IgA, immunoglobulin A; IgM, immunoglobulin M; IgG, immunoglobulin G.



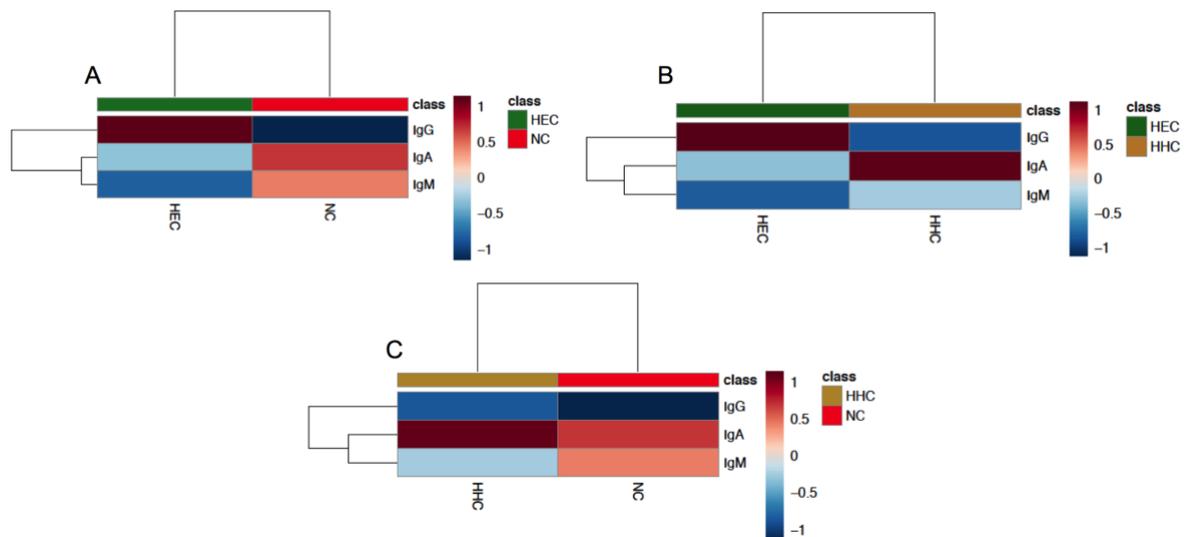
**Figure 2.** Simultaneous analysis of  $\alpha$ -Mce1A antibodies in the clustering of groups. Partial least squares-discriminate analysis (PLS-DA) plot of IgA, IgM and IgG  $\alpha$ -Mce1A combined from HEC, HHC and NC. PLS-DA score scatter plots for HEC (green) and NC (red) (A); HEC and HHC (yellow) (D); HHC and NC (G). Rank of the different immunoglobulins identified by PLS-DA according to the Variable Importance in Projection (VIP score) on the x-axis. The colored boxes on the right indicate the relative levels of the corresponding antibody (OD) in each group under study (C, F and, I). Receiver operating characteristic (ROC) curve for schematic performance of PLS-DA classifiers over the validation set for combined antibodies and isolated levels in the NC and HEC (B), HHC and HEC (E), HHC and NC (H) groups. HEC, healthy endemic controls; HHC, household contacts of HD patients; NC, new cases of HD; IgA, immunoglobulin A; IgM, immunoglobulin M; IgG, immunoglobulin G.



**Figure 3.** Contrasting Shapley values for impact on HD diagnosis for all antibodies against Mce1A protein. Each marker in the scatter plots corresponds to an individual and red to blue shades correspond to negatives to positive Sharpley values (A, C, E). The scatter plots expose not only the importance of a potential risk factor for HD diagnosis but also its range of effects over the NC and HEC (A), HHC and HEC (C), HHC and NC (E) groups. Scatter plots B, D, and F showed average Sharpley values for the respective comparisons. HEC, healthy endemic controls; HHC, household contacts of HD patients; NC, new cases of HD; IgA, immunoglobulin A; IgM, immunoglobulin M; IgG, immunoglobulin G.

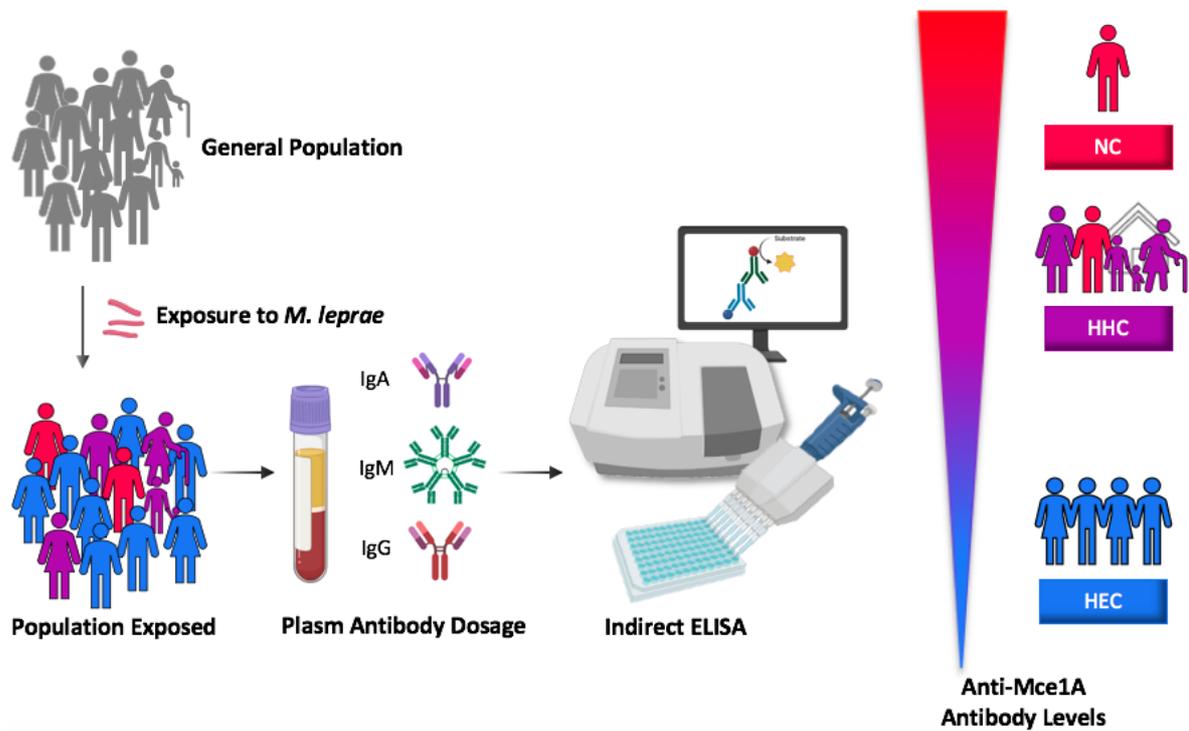


**Figure 4.** Immunoglobulins against Mce1A protein correlate weakly and moderately. Correlation matrix of  $\alpha$ -Mce1A antibodies for NC and HEC (A), HHC and HEC (B), HHC and NC (C). Spearman's correlation coefficients between two pairs of variables are shown in the heatmap. Red to blue shades correspond to increasing values of Spearman's correlation coefficient, as shown in the color bar. HEC, healthy endemic controls; HHC, household contacts of HD patients; NC, new cases of HD; IgA, immunoglobulin A; IgM, immunoglobulin M; IgG, immunoglobulin G.



**Figure 5.** The indexes of anti-Mce1A biomarkers can cluster hierarchically. The Clustering result is shown as a dendrogram and heatmap (distance measure using similarity measure - Euclidean distance, and algorithm using clustering to minimize the sum of squares of any two clusters - Ward's linkage). Hierarchical cluster analysis was performed using normalized and transformed antibody indexes. Each sample begins as a separate cluster and the algorithm proceeds to combine them until all samples belong to one cluster for HEC and NC (A), HEC and HHC (B), and HHC and NC (C). The heatmap shows the dendrogram data values

transformed into an average color scale with high values in red and low values in blue. HEC, healthy endemic controls; HHC, household contacts of HD patients; NC, new cases of HD; IgA, immunoglobulin A; IgM, immunoglobulin M; IgG, immunoglobulin G.



**Figure 6.** Proposed model of the stimulus and utility of specific antibodies against Mce1A protein in the laboratory diagnosis of HD based on the level of seropositivity for patients, household contacts and endemic controls. HEC, healthy endemic controls; HHC, household contacts of HD patients; NC, new cases of HD; Mce1A, mammalian cell-entry protein 1A.

## 6 CONCLUSÃO

A análise do desempenho das tecnologias *in vitro* disponíveis para auxílio ao diagnóstico da hanseníase permite concluir que não há exame laboratorial capaz de detectar todas as formas clínicas da hanseníase e indivíduos apenas infectados. Ainda hoje, o diagnóstico baseia-se majoritariamente no exame clínico dermatológico e neurológico. As habilidades e competências necessárias para o diagnóstico, tratamento e gestão por parte dos profissionais de saúde são insatisfatórias, levando a diagnósticos tardios, subdiagnóstico, incapacidades físicas, evolução para deficiências, comprometimento socioeconômico e transmissão continuada do bacilo *M. leprae*.

Nos últimos anos, diferentes metodologias de imunoenaios foram desenvolvidos para detecção de anticorpos  $\alpha$ -PGL-I, o biomarcador espécie específico de *M. leprae* mais estudado, incluindo ELISA e testes rápidos de fluxo lateral que incorporam PGL-I sintético ou glicoconjugados de proteínas. Assim como, a detecção de DNA de *M. leprae* em raspados intradérmicos e/ou biópsias de pele usando PCR convencional ou quantitativa também tem se apresentado muito útil para detectar portadores assintomáticos ou casos complexos, demonstrando-se como uma superioridade na acurácia e sensibilidade diagnóstica quando comparado a sorologia  $\alpha$ -PGL-I. Contudo, a PCR possuiu alto custo e necessidade de avançada infraestrutura laboratorial o que impede a sua utilização fora dos centros de referência e institutos de pesquisa. Logo, esses testes diagnósticos são limitados por possuírem variável desempenho na detecção dos casos em todo o espectro clínico da doença.

Paralelo a isso, as análises de acurácia entre PCR e sorologia  $\alpha$ -PGL-I comparando com a baciloscopia do raspado intradérmico, único teste laboratorial considerando como sinal cardinal para diagnóstico da hanseníase pela OMS, demonstrou que a baciloscopia é um método de baixa sensibilidade, acurácia e valor preditivo negativo devido ao seu insatisfatório desempenho na detecção eficaz dos casos de hanseníase. Sendo o uso da PCR e sorologia mais sensível e acurado para o diagnóstico laboratorial da doença mesmo em indivíduos de baixa carga bacilar.

Por outro lado, diante da necessidade de uma ferramenta simples, de baixo custo e ainda mais sensível e acurada, novas plataformas tecnológicas de diagnóstico para monitorar o tratamento e avaliar as transmissões domiciliares em unidades de saúde de menor complexidade e de forma descentralizada necessitam ser incorporadas no fluxo de busca ativa e cuidados da hanseníase. Assim, a eficácia do ELISA para detecção de anticorpos IgA, IgM e IgG contra a proteína Mce1A demonstrou o seu potencial inovador como teste para diagnosticar a

hanseníase, seguimento dos casos no tratamento, triagem dos contatos intradomiciliares e avaliação do nível de exposição ao bacilo na comunidade baseada na endemicidade da reação.

O ensaio sorológico  $\alpha$ -Mce1A corrige as principais lacunas do teste sorológico  $\alpha$ -PGL-I, pois demonstra maior sensibilidade, independente da forma clínica ou carga bacilar. Com a soropositividade elevada e semelhante entre contatos, casos novos de hanseníase e pacientes tratados com a PQT, o ELISA para pesquisa de anticorpos IgA  $\alpha$ -Mce1A indicou ser um marcador de contato com o bacilo *M. leprae* e, assim, novos casos e seus contatos em regiões com diferentes perfis de endemicidade podem ser identificados, com também, no auxílio do monitoramento de pacientes com alta carga de doença no diagnóstico e nos casos de reexposição antigênica por insuficiência terapêutica. A análise de associação do resultado positivo para os exames e de ter o diagnóstico de hanseníase demonstrou o potencial do ELISA IgM  $\alpha$ -Mce1A positivo para a detecção de doença ativa e rastreio de contatos potencialmente infectados ou oligossintomáticos. Por outro lado, a alta soropositividade e desempenho diagnóstico do ELISA para anticorpos IgG  $\alpha$ -Mce1A em conjunto com a ausência da resposta de anticorpos IgM anti-Mce1A entre pacientes tratados indicaram o valor desses biomarcadores para monitorar a resposta terapêutica.

Em resumo, o diagnóstico da hanseníase é um desafio técnico e prático principalmente nos casos maculares iniciais e os predominantemente neurais. O desenvolvimento tecnológico e o investimento científico na área das doenças negligenciadas, como a hanseníase, é fundamental para o controle da doença como problema de saúde pública nacional e sendo a prospeção de novos exames laboratoriais de maior sensibilidade e acurácia, mantendo especificidade satisfatória uma proposta para eliminação das principais limitações no diagnóstico laboratorial da hanseníase. Assim, novos biomarcadores para alcance das metas da OMS na identificação dos casos iniciais e infectados e para a interrupção da transmissão bacilar satisfaz os pilares de execução das pesquisas com impacto social e retorno ao SUS.

## REFERÊNCIAS

ARRUDA S. et al. Cloning of an *M. tuberculosis* DNA fragment associated with entry and survival inside cells. **Science**, v. 261, n. 5127, p. 1454-7, 1993.

ASTHANA, P. et al. Structural insights into the substrate-binding proteins Mce1A and Mce4A from *Mycobacterium tuberculosis*. **IUCrJ**. v. 8, n. 5, p. 757-774, 2021.

AZEVEDO, M. C. et al. qPCR detection of *Mycobacterium leprae* in biopsies and slit skin smear of different leprosy clinical forms. **Braz J Infect Dis**, v. 21, n. 1, p. 71-78, 2017.

BARRETO, J. G. et al. High rates of undiagnosed leprosy and subclinical infection amongst school children in the Amazon Region. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 107, suppl 1, p. 60-67, 2012.

BECX-BLEUMINK M.; BERHE, D. Occurrence of reactions, their diagnosis and management in leprosy patients treated with multidrug therapy; experience in the leprosy control program of the All Africa Leprosy and Rehabilitation Training Center (ALERT) in Ethiopia. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 60, n. 2, p. 173-84, 1992.

BHAMIDI, S. et al. Detailed structural and quantitative analysis reveals the spatial organization of the cell walls of in vivo grown *Mycobacterium leprae* and in vitro grown *Mycobacterium tuberculosis*. **J Biol Chem**, v. 286, n. 26, p. 23168-77, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde. Departamento de Gestão e Incorporação de Tecnologias e Inovação em Saúde. Coordenação-Geral de Gestão de Tecnologias em Saúde. Coordenação de Monitoramento e Avaliação de Tecnologias em Saúde. **Teste rápido imunocromatográfico para determinação qualitativa de anticorpos IgM anti-*Mycobacterium leprae* para diagnóstico complementar de Hanseníase**. Brasília: Ministério da Saúde, 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde. Departamento de Gestão e Incorporação de Tecnologias e Inovação em Saúde. Coordenação-Geral de Gestão de Tecnologias em Saúde. Coordenação de Monitoramento e Avaliação de Tecnologias em Saúde. **Teste de detecção molecular qualitativa do *Mycobacterium leprae* para o diagnóstico de hanseníase**. Brasília: Ministério da Saúde, 2021.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Guia prático sobre a hanseníase** [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. **Boletim epidemiológico 2021**. Brasília: Ministério da Saúde, 2021.

BRITTON W. J.; LOCKWOOD D. N. Leprosy. **Lancet**, v. 363, n. 9416, p. 1209-19, 2004.

BUHRER-SEKULA, S. et al. Simple and fast lateral flow test for classification of leprosy patients and identification of contacts with high risk of developing leprosy. **J Clin Microbiol**, v. 41, p. 1991-1995, 2003.

COLE, S. T. et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**, v. 393, n. 6685, p. 537-44, 1998.

COLE, S. T. et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. **Nature**, v. 409, n. 6823, p. 1007-11, 2001.

COLE, S.; SUPPLY, P.; HONORÉ, N. Repetitive sequences in *Mycobacterium leprae* and their impact on genome plasticity. **Lepr Ver**, v. 72, p. 449-46, 2001.

CRUZ, D. et al. Host-derived oxidized phospholipids and HDL regulate innate immunity in human leprosy. **J Clin Invest**, v. 118, p. 2917–28, 2008.

de MATTOS, K. A. et al. Deciphering the contribution of lipid droplets in leprosy: multifunctional organelles with roles in *Mycobacterium leprae* pathogenesis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 107, suppl 1, p. 156–66, 2012.

de SOLDENHOFF R. The clinical spectrum of leprosy and a practical approach to classification. **Trop Geogr Med** [Review], v. 46, n. 2, p. 55-8, 1994.

DOUGLAS, J. T. et al. Prospective study of serological conversion as a risk factor for development of leprosy among household contacts. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 11, p. 897–900, 2004.

FADLITHA, V. B. et al. The unique tropism of *Mycobacterium leprae* to the nasal epithelial cells can be explained by the mammalian cell entry protein 1A. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 13, n. 3, e0006704, 2019.

FLESSELLES B et al. Disruption of the mycobacterial cell entry gene of *Mycobacterium bovis* BCG results in a mutant that exhibits a reduced invasiveness for epithelial cells. **FEMS Microbiol Lett**, v. 177, n. 2, p. 237-42, 1999.

FONSECA et al. The influence of innate and adaptative immune responses on the differential clinical outcomes of leprosy. **Infect Dis Poverty**, v. 6, n. 5, 2017.

GIOFFRE, A. et al. Mutation in mce operons attenuates *Mycobacterium tuberculosis* virulence. **Microbes Infect**, v. 7, n. 3, p. 325-34, 2005.

GOULART, I. M. et al. Risk and protective factors for leprosy development determined by epidemiological surveillance of household contacts. **Clin Vaccine Immunol**, v. 15, p. 101–105, 2008.

GURUNG, P. et al. Diagnostic accuracy of tests for leprosy: a systematic review and meta-analysis. **Clin Microbiol Infect**, v. 25, p. 1315-1327, 2019.

HAN, X. Y. et al. A new *Mycobacterium* species causing diffuse lepromatous leprosy. **Am J Clin Pathol**, v. 130, p. 856–864, 2008.

HALVORSEN, B. et al. Interleukin-10 enhances the oxidized LDL-induced foam cell formation of macrophages by antiapoptotic mechanisms. **J Lipid Res**, v. 46, p. 211–9, 2005.

- HIRATA, T. Electron microscopic observations of cell wall and cytoplasmic membrane in murine human leprosy bacilli. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 53, p. 433–440, 1985.
- IRGENS, L. M. The discovery of *Mycobacterium leprae*. A medical achievement in the light of evolving scientific methods. **Am J Dermatopathol**, v. 6, n. 4, p. 337-43, 1984.
- JULLIEN, D. et al. IL-15, an immunomodulator of T cell responses in intracellular infection. **J Immunol**, v. 158, p. 800–6, 1997.
- KOHWIWATTANAGUN, J. et al. Mycobacterial mammalian cell entry protein 1A (Mce1A)-mediated adherence enhances the chemokine production by A549 alveolar epithelial cells. **Microbiol Immunol**, v. 51, n. 2, p. 253-61, 2007.
- KRUTZIK, S. R. et al. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. **Nat Med**, v. 9, p. 525–32, 2003.
- LASTÓRIA, J. C.; ABREU, M. A. Leprosy: review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects - part 1. **An Bras Dermatol**, v. 89, n. 2, p. 205-218, 2014.
- LOCKWOOD, D. N. J. et al. Comparing the clinical and histological diagnosis of leprosy and leprosy reactions in the infir cohort of indian patients with multibacillary leprosy. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 6, 2012.
- MARTINEZ, A.; RIBEIRO-ALVES, M.; SARNO, E. Evaluation of qPCR-based assays for leprosy diagnosis directly in clinical specimens. **PLoS Negl Trop Dis**, v. p. e1354, 2011.
- METZ, C. E. Basic principles of ROC analysis. **Semin Nucl Med**, v. 8, n. 4, p. 283-98, 1978. **Microbiol**, v. 54, p. 881–941, 2000.
- MOSCHELLA, S. L. An update on the diagnosis and treatment of leprosy. **J Am Acad Dermatol**, v. 51, p. 417–26, 2004.
- NAAFS B. Leprosy reactions. New knowledge. **Trop Geogr Med** [Review], v. 46, n. 2, p. 80-4, 1994.
- NARAYAN, N. P. et al. Correlation of clinical, histological and immunological features across the leprosy spectrum. **Indian J Lepr**, v. 73, n. 4, p. 329-42, 2001.
- Nascimento CS. **Avaliação da Resposta Imune à Proteína MCEP (*Mycobacterium cell entry protein*) em Indivíduos com Tuberculose Pulmonar**. 1999. 68 f. Dissertação (Mestrado em imunologia) - Universidade Federal da Bahia, UFBA, Salvador. 1999.
- NG, V. et al. Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. **Cell**, v. 103, n. 3, p. 511-24, 2000.
- NISHIURA, M. et al. An electron microscope study of the band structure of the leprosy bacillus and other mycobacteria. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 37, p. 225–238, 1969.

Organização Mundial da Saúde (OMS). **Estratégia Global de Hanseníase 2021–2030 “Rumo à zero hanseníase”**. Nova Delhi: Organização Mundial da Saúde, Escritório Regional para o Sudeste Asiático; 2021.

Organização Mundial da Saúde (OMS). **Global leprosy update, 2018: moving towards a leprosy. Weekly epidemiological record**. [S. l.: s. n.], 2019. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/326775/WER9435-36-en-fr.pdf>.

Organização Mundial da Saúde (OMS). **Global leprosy update, 2020: impact of COVID-19 on global leprosy control**. *Weekly Epidemiol Rec Genebra*, v. 36, p. 421-44, 2021.

OSKAM, L.; SLIM, E.; BUHRER-SEKULA, S. Serology: recent developments, strengths, limitations and prospects: a state of the art overview. **Lepr Ver**, v. 74, p. 196–205, 2003.

PHILIPPIDIS, P. et al. Hemoglobin scavenger receptor CD163 mediates interleukin-10 release and heme oxygenase-1 synthesis: antiinflammatory monocyte-macrophage responses in vitro, in resolving skin blisters in vivo, and after cardiopulmonary bypass surgery. **Circ Res**, v. 94, p. 119–26, 2004.

PIERNEEF, L. et al. Detection of anti-*M. leprae* antibodies in children in leprosy-endemic areas: A systematic review. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 15, n. 8, e0009667, 2021.

QUEIROZ, A.; RILEY, L. Bacterial immunostat: *Mycobacterium tuberculosis* lipids and their role in the host immune response. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 50, n. 1, p. 9-18, 2017.

RATLEDGE, C.; DOVER, L. G. Iron metabolism in pathogenic bacteria. **Annu Rev Microbiol**, v. 54, p. 881-941, 2000.

RIDLEY, D. S. Histological classification and the immunological spectrum of leprosy. **Bull World Health Organ**, v. 51, p. 451–65, 1974.

RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 34, n. 3, p. 255-73, 1966.

RODRIGUES JUNIOR, I. A. et al. Leprosy classification methods: a comparative study in a referral center in Brazil. **Int J Infect Dis**, v. 45, p. 118–22, 2016.

RUSSELL, D. G. et al. Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. **Nat Immunol**, v. 10, p. 943–8, 2009.

SADHU, S. et al. Reciprocity between regulatory T cells and Th17 cells: relevance to polarized immunity in leprosy. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, e0004338, 2016.

SATO, N. et al. Recombinant *Mycobacterium leprae* protein associated with entry into mammalian cells of respiratory and skin components. **J Dermatol Sci**, v. 46, n. 2, p. 101-10, 2007.

SHIMONO, N. et al. Hypervirulent mutant of *Mycobacterium tuberculosis* resulting from disruption of the *mce1* operon. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 100, n. 26, p. 15918-23, 2003.

SKERMAN, V. B. D.; MCGOWAN, V.; SNEATH, P. H. A. (editors). Approved lists of bacterial names. **Int J Syst Bacteriol**, v. 30, p. 225-420, 1980.

SKINSNES, O. K. The immunopathologic spectrum of leprosy. In *Leprosy in theory and practice*. **John Wright & Sons Ltd, Bristol**, p. 152-182, 1964.

SPENCER, J. S. et al. 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**, v. 18, p. 260-267, 2011.

SPENCER, J. S. et al. Identification of serological biomarkers of infection, disease progression and treatment efficacy for leprosy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 107, suppl 1, p. 79-89, 2012.

STEFANI, M. M. et al. Comparison of two rapid tests for anti-phenolic glycolipid-I serology in Brazil and Nepal. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 107, suppl 1, p. 124-131, 2012.

TOMASELLI, P. J. et al. Primary neural leprosy: clinical, neurophysiological and pathological presentation and progression. **Brain**, awab396, 2021.

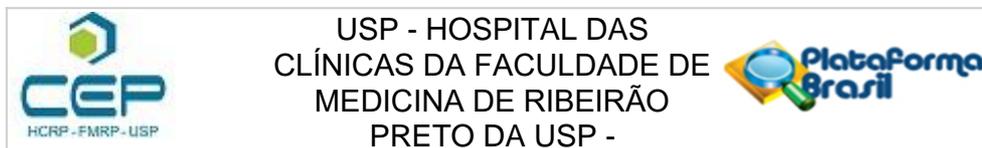
UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO. UNA-SUS/UFMA. **A Hanseníase e a Vigilância em Saúde**. São Luís, 2017.

WALKER, S. L.; LOCKWOOD, D. N. The clinical and immunological features of leprosy. **Br Med Bull**, v. 77-78, p. 103-21, 2006.

WANG, C. R. et al. Evaluation of humoral immunity on leprosy patients in Taiwan: a preliminary report. **Taiwan Yi Xue Hui Za Zhi**, v. 88, n. 7, p. 669-72, 1989.

## ANEXOS

### ANEXO 1 – Parecer Consubstanciado do CEP



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** ANTICORPOS ANTI-MCE1A E ANTI-LIPÍDIOS COMO BIOMARCADORES SOROLÓGICOS NA HANSENÍASE: DIAGNÓSTICO, AVALIAÇÃO DE CONTATOS E SEGUIMENTO

**Pesquisador:** Filipe Rocha Lima

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 33925020.1.0000.5440

**Instituição Proponente:** Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP -

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.142.534

##### Apresentação do Projeto:

Trata-se do projeto de doutorado do biomédico FILIPE ROCHA LIMA, sob orientação do Prof. Dr. Marco Andrey Cipriani Frade. Trata-se de um estudo de corte transversal retrospectivo e prospectivo com uma amostra por conveniência. O estudo retrospectivo será desenvolvido no Laboratório de Cicatrização e Hanseníase da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) da Universidade de São Paulo (USP) com amostras de soros (N=1000) coletadas dos pacientes com hanseníase e seus comunicantes. A avaliação prospectiva será executada em

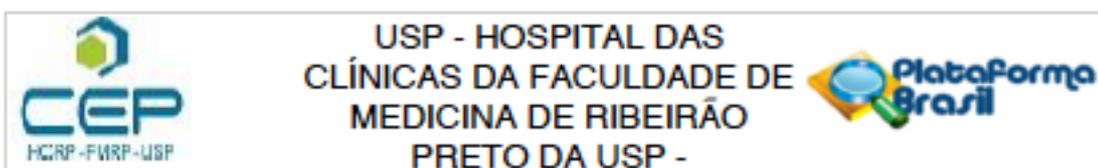
colaboração com o ambulatório de referência no Brasil em diagnóstico da hanseníase, modelo em assistência, vigilância epidemiológica, ensino e pesquisa do Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) – Universidade de São Paulo (USP) executando a coleta de sangue para obtenção de soro de pacientes com hanseníase (N=80) classificados em casos resistentes (n=50) e/ou casos novos (n=30) com alta

carga bacilar. Os soros serão utilizados em ensaios imunoenzimáticos (ELISA indireto) com intuito de desenvolver testes sorológicos propostos para serem usados como um método fácil, não invasivo e de baixo custo para suporte ao diagnóstico na hanseníase.

##### Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO GERAL

**Endereço:** CAMPUS UNIVERSITÁRIO  
**Bairro:** MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900  
**UF:** SP **Município:** RIBEIRÃO PRETO  
**Telefone:** (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 4.142.534

Identificar anticorpos IgA, IgM, IgG total e subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 anti-Mce1A e anti-lipídios como potenciais biomarcadores para o diagnóstico e seguimento de pacientes com hanseníase e seus comunicantes.

#### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar anticorpos com potencial de diagnóstico dos indivíduos infectados por *M. leprae* antes do aparecimento dos sinais e sintomas dermatoneurológicos;
- Identificar biomarcadores sorológicos de seguimento clínico, bacteriológico e terapêutico dos pacientes com hanseníase durante o uso da PQT;
- Detectar anticorpos capazes de indicar o desenvolvimento de estados reacionais da hanseníase;
- Obter resultados para prospecção de plataformas tecnológicas de diagnóstico, monitoramento e prognóstico de baixo custo e aplicável à atenção básica de saúde (kit para ELISA e testes rápidos);
- Correlacionar os níveis dos anticorpos anti-Mce1A e anti-lipídios com dados clínicos (exame dermatológico, USG, estesiometria), laboratoriais (baciloscopia, DNA/RNA, marcadores neurais), os níveis de anticorpos anti-PGL1 e anti-LID dos pacientes e comunicantes.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os pesquisadores descreveram de maneira adequada todos os riscos e benefícios inerentes aos participantes dessa pesquisa, bem como elencaram estratégias para minimizar os riscos. Será feita apenas uma consideração quanto ao risco da coleta de sangue no TCLE.

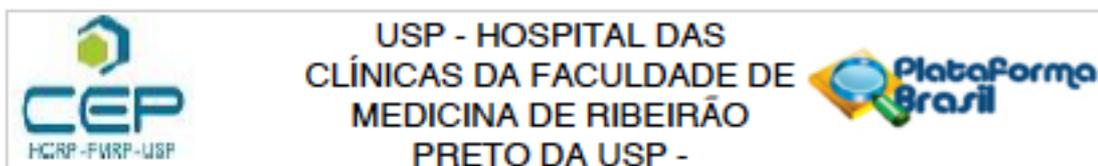
#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Conforme dito anteriormente, a pesquisa terá uma parte retrospectiva e outra parte prospectiva. O estudo retrospectivo será desenvolvido no Laboratório de Cicatrização e Hanseníase da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) da Universidade de São Paulo (USP). A avaliação prospectiva será executada em colaboração com o ambulatório de referência no Brasil em diagnóstico da hanseníase, modelo em assistência, vigilância epidemiológica, ensino e pesquisa do Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) – Universidade de São Paulo (USP). No método encontram-se descritas todas as etapas do projeto, tipo de amostra, participantes, número de participantes, local de recrutamento, protocolo da coleta e análise dos dados. Vinculado ao projeto, os pesquisadores solicitaram a apreciação de um novo biorrepositório. Tal solicitação encontra-se adequadamente apresentada, contendo todos os elementos necessários.

#### Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os documentos necessários para a apreciação do projeto e do biorrepositório foram

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO  
 Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900  
 UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO  
 Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 4.142.534

adequadamente apresentados.

**Recomendações:**

Solicita-se uma adequação no último parágrafo da página 2 do TCLE: "Quanto ao material, será coletado aproximadamente 5 mL de sangue. Não haverá riscos em decorrência da coleta uma vez que será executado por profissional habilitado."

Solicita-se que seja descrito que o risco é pequeno, e que pode haver a formação de uma mancha roxa (hematoma), mas, para minimizar esse risco, um profissional habilitado fará a coleta do sangue.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012, o projeto de pesquisa, assim como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Guarda de Material Biológico versão 1 data 16/03/2020, podem ser enquadrados na categoria APROVADO.

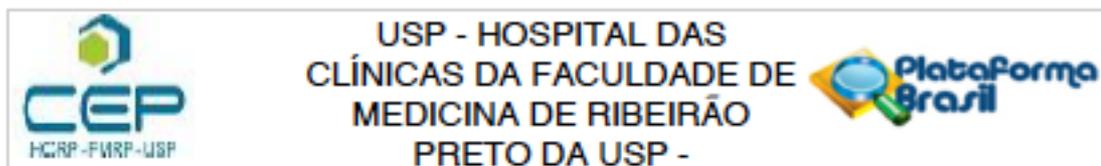
**Considerações Finais a critério do CEP:**

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1525611.pdf	22/06/2020 15:49:41		Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	CARTA_BIORREPOSITARIO.pdf	22/06/2020 15:47:18	Filipe Rocha Lima	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_biorrepositorio_v_2.pdf	15/06/2020 14:27:34	Filipe Rocha Lima	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DECLARACAO_FRL.pdf	10/06/2020 18:57:32	Filipe Rocha Lima	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DECLARACAO_MACF.pdf	10/06/2020 18:57:17	Filipe Rocha Lima	Aceito

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO  
 Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900  
 UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO  
 Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 4.142.534

Declaração de Instituição e Infraestrutura	UPC_2684.pdf	10/06/2020 18:51:22	Filipe Rocha Lima	Aceito
Outros	MAPA_AMOSTRAS.pdf	10/06/2020 18:29:47	Filipe Rocha Lima	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	10/06/2020 18:22:34	Filipe Rocha Lima	Aceito
Folha de Rosto	UPC2684.pdf	10/06/2020 18:21:00	Filipe Rocha Lima	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIBEIRAO PRETO, 08 de Julho de 2020

---

Assinado por:  
**MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA**  
 (Coordenador(a))

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO  
 Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900  
 UF: SP Município: RIBEIRAO PRETO  
 Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br

## ANEXO 2 – TCLE

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO E PARA GUARDA  
DE MATERIAL BIOLÓGICO**

**Título da pesquisa: “Anticorpos anti-Mce1A e anti-lipídios como biomarcadores sorológicos na hanseníase: diagnóstico, avaliação de contatos e seguimento”.**

**Pesquisadores responsáveis:** MSc. Filipe Rocha Lima / Orientador: Prof. Dr. Marco Andrey Cipriani Frade – (16) 3315-3374.

O (a) senhor (a) está sendo convidado (a) a participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte deste estudo, assine ao final deste documento em duas vias. Caso o (a) senhor (a) não aceite participar da pesquisa, não será penalizado (a) de forma alguma e seu atendimento não será prejudicado na Instituição.

O objetivo da pesquisa é desenvolver testes de diagnósticos laboratoriais para hanseníase utilizando o sangue como amostra. Esse sangue será processado para obter a parte líquida da amostra e ser testado os níveis de substâncias (anticorpos) contra a bactéria causadora da hanseníase. Atualmente, o diagnóstico da hanseníase não possuiu um forma simples, barata, confiável e disponível para unidades básicas de saúde, portanto a pesquisa visa uma alternativa para facilitar o controle e diagnóstico precoce da doença.

Ao decidir participar e assinar este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), o senhor (a) receberá uma via do TCLE assinado e rubricado em todas as páginas pelo senhor (a) e pelo pesquisador responsável e assim estará cedendo 5 mL (1 colher de chá) de sangue por uma punção venosa no braço ou na mão. O sangue será colocado num tubo de coleta e levado para o laboratório sob responsabilidade do pesquisador. No laboratório, o sangue será processado para obter a parte líquida e seguir com os exames de medição das substâncias (anticorpos) presentes. A quantidade restante será congelada a -80 °C em um freezer para confirmações de resultados, quando necessário.

O senhor (a) está ciente que o risco dessa pesquisa é mínimo e se diz respeito a quebra de sigilo ou confidencialidade dos dados do prontuário eletrônico, porém o pesquisador tomará todas as medidas para que isso não aconteça. Como benefício indireto, o senhor (a) está contribuindo com a doação de seu sangue, que visa inovar os estudos para teste de novos exames para facilitar o diagnóstico de pacientes com

Rubrica do pesquisador	Rubrica do participante/responsável
------------------------	-------------------------------------

hanseníase. Sua participação nesta pesquisa é voluntária e o (a) senhor (a) tem liberdade de deixar de participar a qualquer momento, é só avisar algum dos pesquisadores.

Será mantido sigilo absoluto dos dados obtidos individualmente neste estudo, para assegurar a privacidade dos participantes. Caso o (a) senhor (a) se sinta prejudicado em participar desta pesquisa, o (a) senhor (a) poderá buscar indenização de acordo com as normas vigentes no país.

Os pesquisadores estarão disponíveis para qualquer dúvida a qualquer momento durante o estudo e o Sr. (a) tem a garantia de acesso aos resultados da pesquisa.

Caso tenha dúvidas sobre aspectos éticos desta pesquisa o (a) senhor (a) também poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Um Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) é composto por um grupo de pessoas que são responsáveis por supervisionarem pesquisas em seres humanos que são realizadas na instituição e tem a função de proteger e garantir os direitos, a segurança e o bem-estar de todos os participantes de pesquisa que se voluntariam a participar da mesma. O CEP do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto é localizado no subsolo do hospital e funciona de segunda a sexta-feira, das 8:00 às 17:00hs, telefone de contato (016) 3602-2228.

Esta pesquisa está vinculada ao biorrepositório “Biomarcadores Sorológicos” criado no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto ou na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP com o objetivo de guardar amostras de soro para fins de pesquisa e análise científica. Gostaríamos de convidá-lo (a) a autorizar a coleta, o depósito, o armazenamento e a utilização do material biológico humano (sangue e/ou soro) para fins de pesquisa e análise científica.

Este material será coletado durante seu atendimento no ambulatório do HC-FMRP-USP. Após coletado será guardado em biorrepositório no Laboratório de Cicatrização e Hanseníase da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP/SP – Av. Bandeirantes, 3900 – Monte Alegre – telefone: (16) 33153374, onde as amostras serão armazenadas por 05 anos. Os pesquisadores responsáveis pela equipe se comprometem a identificar as amostras e os dados coletados de modo que garanta o seu sigilo e a sua confidencialidade, para isso a sua amostra de tecido será identificada por meio de números.

Quanto ao material, será coletado aproximadamente 5 mL de sangue. Não haverá riscos em decorrência da coleta uma vez que será executado por profissional habilitado.

Rubrica do pesquisador	Rubrica do participante/responsável
------------------------	-------------------------------------

Sua participação é voluntária, tendo liberdade de aceitar ou não que sua amostra seja guardada, sem risco de qualquer penalização ou prejuízo no atendimento que lhe for prestado. O (A) Sr. (a) também tem o direito de retirar seu consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado a qualquer momento.

Solicitamos também os dados de contato do (a) senhor (a), para que seja possível encontrá-lo (a) posteriormente. Através dos contatos, garantimos fornecer as informações de seu interesse, além de receber eventuais benefícios provenientes do estudo com seu material biológico. Também solicitaremos sua autorização, se necessário, para o descarte do material armazenado caso não haja necessidade de uso para a pesquisa científica.

Declaramos para os devidos fins que a cada a nova pesquisa o Sr. (a) será contatado para a utilização do seu material biológico armazenado neste biorrepositório, e também a nova pesquisa será submetida à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) institucional e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Solicitamos seus dados de contato e sua assinatura, tendo recebido as informações acima, para confirmação de aceitação de participação. Também afirmamos que uma via deste documento, devidamente assinada e rubricada, será entregue ao senhor (a).

**Dados do participante:**

Nome: \_\_\_\_\_, RG: \_\_\_\_\_,

Endereço: \_\_\_\_\_, n° \_\_\_\_\_,

Bairro \_\_\_\_\_, cidade \_\_\_\_\_, telefone \_\_\_\_\_

Abaixo também seguem os dados de contato do pesquisador responsável, caso o(a) senhor(a) tenha alguma dúvida posteriormente.

**Nome do participante:** \_\_\_\_\_

**Assinatura:** \_\_\_\_\_ **data:** \_\_\_\_\_

**Nome do pesquisador:** \_\_\_\_\_

**Assinatura:** \_\_\_\_\_ **data:** \_\_\_\_\_

Rubrica do pesquisador	Rubrica do participante/responsável
------------------------	-------------------------------------

**Dados do responsável legal ou testemunha (caso aplicável):**

Nome legível: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ data: \_\_\_\_\_

Rubrica do pesquisador	Rubrica do participante/responsável
------------------------	-------------------------------------

## ANEXO 3 – Artigo 1 correlacionado publicado durante o doutorado

BERNARDES-FILHO, F.; LIMA, F. R.; VOLTAN, G.; de PAULA, N. A.; FRADE, M. A. C. Leprosy case series in the emergency room: A warning sign for a challenging diagnosis. **Braz J Infect Dis**, v. 25, n. 5, p. 101634, 2021. doi: 10.1016/j.bjid.2021.101634.

BRAZ J INFECT DIS. 2021;25(5):101634



The Brazilian Journal of  
INFECTIOUS DISEASES

[www.elsevier.com/locate/bjid](http://www.elsevier.com/locate/bjid)



### Case report

## Leprosy case series in the emergency room: A warning sign for a challenging diagnosis



Fred Bernardes-Filho, MD, PhD <sup>a,b,c</sup>, Filipe Rocha Lima, Msc <sup>a,c</sup>,  
Glauber Voltan, MD <sup>a,c</sup>, Natália Aparecida de Paula, PhD <sup>a,c</sup>,  
Marco Andrey Cipriani Frade, MD, PhD <sup>a,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Dermatology Division, Department of Medical Clinics, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

<sup>b</sup> Emergency Department, Hospital Imaculada Conceição da Sociedade Portuguesa de Beneficência, Ribeirão Preto, SP, Brazil

<sup>c</sup> Center of National Reference in Sanitary Dermatology focusing on Leprosy of Ribeirão Preto Clinical Hospital, Ribeirão Preto, SP, Brazil

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 23 June 2021

Accepted 20 September 2021

Available online 12 October 2021

##### Keywords:

Leprosy  
Emergency medicine  
Peripheral nerves  
Neuritis

#### ABSTRACT

Leprosy can be considered a dissimulated disease, mainly when presented as atypical cases leading to mistaken diagnosis at the emergency setting. Herein we report six patients referred to the emergency room with hypotheses of acute myocardial infarction and arterial and venous thrombosis, although with chronic neurological symptoms; the seventh patient was referred with a wrong suspicion of infected skin ulcer. Positive findings included hypo-anesthetic skin lesions and thickened nerves; 100% were negative for IgM anti-phenolic glycolipid-I, while 71.4%, 100% and 42.8% were positive for IgA, IgM and IgG Mce1A. RLEP-PCR was positive in all patients. Ultrasound of peripheral nerves showed asymmetric and focal multiple mononeuropathy for all patients. Unfortunately, in many patients leprosy is often misdiagnosed as other medical conditions for long periods thus delaying initiation of specific treatment. This paper is intended to increase physicians' awareness to recognize leprosy cases presented as both classical and unusual forms, including in emergency department.

© 2021 Sociedade Brasileira de Infectologia. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

#### Introduction

Leprosy diagnosis is still a challenge worldwide mainly because of the multifaceted clinical presentation. Leprosy expertise is declining among physicians, even in endemic areas, and focusing almost exclusively on cutaneous signs results in a non-timely diagnosis.<sup>1</sup> In contrast, the

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [f9filho@gmail.com](mailto:f9filho@gmail.com) (F. Bernardes-Filho), [rfilipelima@gmail.com](mailto:rfilipelima@gmail.com) (F.R. Lima), [gvoltan@usp.br](mailto:gvoltan@usp.br) (G. Voltan), [npbiomed@yahoo.com.br](mailto:npbiomed@yahoo.com.br) (N.A. de Paula), [mandrey@fmrp.usp.br](mailto:mandrey@fmrp.usp.br) (M.A.C. Frade).

<https://doi.org/10.1016/j.bjid.2021.101634>

1413-8670/© 2021 Sociedade Brasileira de Infectologia. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

## ANEXO 4 – Artigo 2 correlacionado publicado durante o doutorado

SILVA, C. M. L.; BERNARDES FILHO, F.; VOLTAN, G.; SANTANA, J. M.; LEITE, M. N.; LIMA, F. R.; SANTANA, L. A.; de PAULA, N. A.; ONOFRE, P. T. B. N.; MARQUES-JUNIOR, W.; TOMAZ, V. A.; PINESE, C. S. V.; FRADE, M. A. C. Innovative tracking, active search and follow-up strategies for new leprosy cases in the female prison population. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 15, n. 8, e0009716, 2021. doi: 10.1371/journal.pntd.0009716.

## PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASES

## RESEARCH ARTICLE

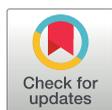
## Innovative tracking, active search and follow-up strategies for new leprosy cases in the female prison population

Claudia Maria Lincoln Silva<sup>1,2</sup>, Fred Bernardes Filho<sup>1,2</sup>, Glauber Voltan<sup>1,2</sup>, Jaci Maria Santana<sup>1,2</sup>, Marcel Nani Leite<sup>1,2</sup>, Filipe Rocha Lima<sup>1,2</sup>, Luisiane de Avila Santana<sup>1,2</sup>, Natália Aparecida de Paula<sup>1,2</sup>, Patricia Toscano Barreto Nogueira Onofre<sup>3</sup>, Wilson Marques-Junior<sup>3</sup>, Vanessa Aparecida Tomaz<sup>4</sup>, Carmem Sílvia Vilela Pinese<sup>4</sup>, Marco Andrey Cipriani Frade<sup>1,2</sup>\*

1 Dermatology Division, Department of Medical Clinics, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, 2 Center of National Reference in Sanitary Dermatology focusing on Leprosy of Ribeirão Preto Clinical Hospital, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, 3 Department of Neuroscience and Behavioral Sciences, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, 4 Ribeirão Preto Female Penitentiary, Penitentiary Administration Secretariat, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

☉ These authors contributed equally to this work.

\* mandrey@fmrp.usp.br



## OPEN ACCESS

**Citation:** Silva CML, Bernardes Filho F, Voltan G, Santana JM, Leite MN, Lima FR, et al. (2021) Innovative tracking, active search and follow-up strategies for new leprosy cases in the female prison population. *PLoS Negl Trop Dis* 15(8): e0009716. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009716>

**Editor:** Carlos Franco-Paredes, Hospital Infantil de Mexico Federico Gomez, MEXICO

**Received:** May 19, 2021

**Accepted:** August 7, 2021

**Published:** August 20, 2021

**Peer Review History:** PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009716>

**Copyright:** © 2021 Silva et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the manuscript.

### Abstract

#### Background

Regarding the leprosy transmission through the upper airways, overcrowded locations such as prisons can become a risk to get sick. Like the leprosy hidden endemic demonstrated in male prison population, being interesting to assess the leprosy scene also among confined women.

#### Methods

A prospective descriptive study conducted at Female Penitentiary, Brazil. Leprosy Suspicion Questionnaire (LSQ) were applied to the participants, and submitted to specialized dermatoneurological exam, peripheral nerve ultrasonography, and anti-PGL-I serology.

#### Findings

404 female inmates were evaluated, 14 new cases were diagnosed (LG-leprosy group), a new case detection rate (NCDR) of 3.4%, 13 multibacillary, while another 390 constituted the Non-Leprosy group (NLG). Leprosy cases were followed up during multidrug therapy with clinical improvement. The confinement time median was 31 months in LG, similar to NLG, less than the time of leprosy incubation. Regarding LSQ, the neurological symptoms reached the highest  $\chi^2$  values as Q1—numbness (5.6), Q3—anesthetizes areas in the skin (7.5), Q5—Stinging sensation (5.8), and Q7—pain in the nerves (34.7), while Q4—spots on the skin was 4.94. When more than one question were marked in the LSQ means a 12.8-fold higher to have the disease than a subject who marked only one or none. The high 34% rate

## ANEXO 5 – Artigo 3 correlacionado publicado durante o doutorado

BERNARDES-FILHO, F.; LIMA, F. R.; FRADE, M. A. C. Innovative mapping of skin sensitivity by monofilaments to record the diagnosis and therapeutic follow-up of leprosy. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 55, p. e0386-2021, 2022. doi: <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0386-2021>.

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical  
Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine  
Vol.:55 | (e0386-2021) | 2022  
doi: <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0386-2021>



## Images in Infectious Diseases

## Innovative mapping of skin sensitivity by monofilaments to record the diagnosis and therapeutic follow-up of leprosy

Fred Bernardes Filho<sup>[1],[2]</sup>, Filipe Rocha Lima<sup>[1],[2]</sup>  
and Marco Andrey Cipriani Frade<sup>[1],[2]</sup>

[1]. Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Clínica Médica, Divisão de Dermatologia, Ribeirão Preto, SP, Brasil.  
[2]. Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Hospital das Clínicas, Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária com Ênfase em Hanseníase, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

A 53-year-old previously healthy woman presented with a 5-month history of numbness of the hands and feet, tingling sensation, and nerve pain in the legs. Positive findings on physical examination included hypochromic, anesthetic, and anhidrotic macules, with incomplete endogenous histamine tests on the right knee (Figure 1), electric shock-like pain on common fibular nerves, and altered tactile sensitivity of the hands and feet (Figure 2). She was positive for IgM anti-phenolic glycolipid-I, IgA, and IgM anti-mammalian cell entry 1A protein of *Mycobacterium* antibodies. *Mycobacterium leprae* DNA-specific repetitive element polymerase chain reaction (RLEP-PCR) was positive on skin biopsy and slit skin smear. Ultrasonography of peripheral nerves showed asymmetric and focal multiple mononeuropathies without an intraneural Doppler signal. Borderline leprosy was diagnosed clinically and by laboratory tests, and she was prescribed multidrug therapy. Cutaneous lesion mapping (Figure 3) and hands/feet tactile sensitivity tests (Semmes-Weinstein monofilaments) were performed monthly. There was a significant improvement in dermatological signs and neurological symptoms under specific treatment of leprosy with antimicrobials.

Recent studies have demonstrated the importance of appreciating neurological symptoms over dermatological signs in the diagnosis of leprosy<sup>1</sup>. Hypochromic macules with altered sensitivity are a common presentation in the entire spectrum of leprosy<sup>2,3</sup>. The exclusive linkage of macular lesions to indeterminate



FIGURE 1: (A) Hypochromic macule on the right knee; (B) altered tactile skin sensitivity mapped by Semmes Weinstein monofilaments ranging from 0.07 gram-force (gf) to 300-gf (normal skin tactile threshold = green monofilament, 0.07-gf); (C) the macule is more evident due to the erythema surrounding the lesion after local anesthesia for skin biopsy, like the incomplete endogenous histamine test. Legend: green (0.07-gf); blue (0.2-gf); violet (2-gf); red (4-gf); orange (10-gf); pink (300-gf).

leprosy is an incorrect paradigm in leprosy that leads to inadequate and insufficient treatment. The innovative mapping of cutaneous lesions using monofilaments and the usual hands/feet sensitivity evaluation is an objective assessment that documents the hallmark focality and asymmetry of leprosy at diagnosis and during follow-up.

Corresponding author: Prof. Dr. Marco Andrey Cipriani Frade. e-mail: [mandrey@fmrp.usp.br](mailto:mandrey@fmrp.usp.br)

Authors' contribution: FBF: Study conception and design, Acquisition of data, Analysis and interpretation of data, Drafting of manuscript, Critical revision; FRL: Study conception and design, Acquisition of data, Analysis and interpretation of data, Drafting of manuscript, Critical revision; MACF: Study conception and design, Acquisition of data, Analysis and interpretation of data, Drafting of manuscript, Critical revision.

Conflict of interest: The authors declare that there is no conflict of interest.

Financial Support: This work was supported by the Center of National Reference in Sanitary Dermatology focusing on Leprosy of Ribeirão Preto Clinical Hospital, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil; the Brazilian Health Ministry (MS/FAEP/AMRP-USP.749145/ 2010 and 767202/2011); Fiocruz Ribeirão Preto - TED 163/2019 - Processo: N° 25380.102201/2019-62/ Projeto Fiotec: PRES-009-FIO-20.



## ANEXO 6 – Artigo 4 correlacionado publicado durante o doutorado

FRADE, M. A. C.; BERNARDES FILHO, F.; SILVA, C. M. L.; VOLTAN, G.; LIMA, F. R.; ABI-RACHED, T. L. C.; de PAULA, N. A. Evaluation of altered patterns of tactile sensation in the diagnosis and monitoring of leprosy using the Semmes-Weinstein monofilaments. *PLoS One*, v. 17, n. 8, p. 0272151. doi: 10.1371/journal.pone.0272151.

## PLOS ONE

## RESEARCH ARTICLE

## Evaluation of altered patterns of tactile sensation in the diagnosis and monitoring of leprosy using the Semmes-Weinstein monofilaments

Marco Andrey Cipriani Frade <sup>1,2</sup>\*, Fred Bernardes Filho <sup>1,2</sup>\*, Claudia Maria Lincoln Silva <sup>1,2</sup>‡, Glauber Voltan <sup>1,2</sup>, Filipe Rocha Lima <sup>1,2</sup>, Thania Loyola Cordeiro Abi-Rached <sup>1,2</sup>‡, Natália Aparecida de Paula <sup>1,2</sup>✉

**1** Dermatology Division, Department of Clinical Medicine, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil, **2** National Reference Center in Sanitary Dermatology, Focusing on Leprosy, of Ribeirão Preto Clinical Hospital, Ribeirão Preto, Brazil

✉ These authors contributed equally to this work.

‡ CMLS and TLCAR also contributed equally to this work.

\* mandrey@fmrp.usp.br



### OPEN ACCESS

**Citation:** Frade MAC, Bernardes Filho F, Silva CML, Voltan G, Lima FR, Abi-Rached TLC, et al. (2022) Evaluation of altered patterns of tactile sensation in the diagnosis and monitoring of leprosy using the Semmes-Weinstein monofilaments. *PLoS ONE* 17(8): e0272151. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0272151>

**Editor:** George Vousden, Public Library of Science, UNITED KINGDOM

**Received:** May 30, 2021

**Accepted:** July 13, 2022

**Published:** August 10, 2022

**Peer Review History:** PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0272151>

**Copyright:** © 2022 Frade et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its [Supporting Information files](#).

### Abstract

#### Background

Leprosy neuropathy is the most common peripheral neuropathy of infectious etiology worldwide; it is characterized as asymmetric and focal multiple mononeuropathy. Semmes-Weinstein monofilament (SWM) test is a simple method to assess sensory nerve function.

#### Methods and findings

In this prospective cohort study, a dermatologist carried out hands and feet tactile sensation test with SWM in 107 multibacillary leprosy patients at diagnosis and in 76 patients at the end of treatment from 2016 to 2019. At diagnosis, 81/107 (75.7%) patients had some degree of functional disability, and 46 (43%) of them had altered SWM-test in the hands and 94 (87.9%) of them in the feet. After one year of multibacillary multidrug therapy, the disability decreasing to 44/76 patients (57.9%) and decreasing of the percentual of patients with altered SWM-test to 18% for the hands, and to 28.7% for the feet. At the end of treatment, the number of SMW-test points presented improvement in the hands of 22 (28.9%) patients, and in the feet of 47 (61.8%). In the hands, by SWM-test, only the radial nerve point demonstrated a significant asymmetry, while in the feet, the difference between the sum of altered SWM-test points showed significant asymmetry between both sides, highlighting the tibial nerve for the establishment of asymmetric leprosy neuropathy. In Spearman's correlation analysis, a positive correlation with statistical significance was observed between the number of hands and feet SWM altered points at diagnosis and the degree of disability at diagnosis (0.69) and at the end of the treatment (0.80).

## ANEXO 7 – Registro do artigo referente ao capítulo 3 da tese aceito para publicação

frontiers About us ▾ All Journals All articles [Submit your research](#)

Frontiers in Medicine Sections ▾ Articles Research Topics Editorial Board About Journal ▾

Front. Med.  
Sec. Pathology  
Volume 10 - 2023 | doi: 10.3389/fmed.2023.1048759

## Serological testing for Hansen's Disease Diagnosis: Clinical significance and performance of IgA, IgM, and IgG antibodies against Mce1A protein

 Filipe R. Lima<sup>1, 2</sup>,  Mateus Simões<sup>1, 2</sup>,  Gabriel M. Manso<sup>1, 2</sup>,  Diana M. Toro<sup>3</sup>,  
 Vanderson Mayron Granemann Antunes<sup>1, 2</sup>,  Giovani C. Felisbino<sup>1, 2</sup>, Gabriela F. Dias<sup>1, 2</sup>,  
 Lee W. Riley<sup>4</sup>,  Sergio M. Arruda<sup>5</sup>,  Natália A. De Paula<sup>1, 2</sup>, Helena B. Lugão<sup>2</sup>,  
 Fernanda André Martins Cruz<sup>2</sup>, Norma T. Foss<sup>1, 2</sup> and  Marco A. Frade<sup>1, 2\*</sup>

<sup>1</sup> Healing and Hansen's Disease Laboratory, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo., Brazil  
<sup>2</sup> National Referral Center for Sanitary Dermatology and HD, Dermatology Division, Internal Medicine Department, Clinical Hospital of the Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Brazil  
<sup>3</sup> Department of Clinical, Toxicological and Bromatological Analysis, School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil  
<sup>4</sup> Division of Infectious Diseases and Vaccinology, School of Public Health, University of California, Berkeley, United States  
<sup>5</sup> Advanced Public Health Laboratory, Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Brazil

Provisionally accepted: The final, formatted version of the article will be published soon.

 Notify me