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

RODRIGO SCALIANTE DE MOURA

Avaliação de diferentes métodos para a classificação de pacientes e de carreadores de antígenos empregados na sorologia de hanseníase

Goiânia
2014

RODRIGO SCALIANTE DE MOURA

Avaliação de diferentes métodos para a classificação de pacientes e de carreadores de antígenos empregados na sorologia de hanseníase

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás para banca de qualificação.

Orientador: Dra. Samira Bührer
Co-orientador: Dra. Mariane Martins de Araújo Stefani

Goiânia
2014

I

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

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Aluno (a):

Orientador (a):

Co-orientador (a):

Membros:

1.

2.

3.

4.

5.

Data:

Dedico este trabalho a todos pacientes de hanseníase.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Samira Bührer, pelo profissionalismo e sabedoria de orientadora e o convívio tão prazeroso de amiga. Por estar sempre presente mesmo enquanto distante, me permitindo assim aprender com meus próprios erros.

À minha co-orientadora, Dra. Mariane Martins de Araújo Stefani, por ter aberto as portas do seu laboratório como quem abre os braços a um amigo e por toda paciência e contribuição com nosso trabalho.

Aos colegas de laboratório, Aline, Danielle, Emerith, Keila, Ludimila, Maria Edileuza, Mônica, Dr. Maurício, Regiane e Yanna pelo convívio, companheirismo e prontidão para ajudar e em especial a Dra. Ludimila cujo apoio foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos demais colegas de pós-graduação pela amizade, companhia principalmente nos momentos "extra-curriculares" e pela troca de experiências. Aos colegas de outros programas, nacionais ou internacionais em especial a Dra. Theresia Abdoel.

Aos meus pais, Paulo Sávio de Moura e Márcia Scaliante Molina de Moura, pela compreensão, apoio incontestável e orações de mãe. Ao meu irmão Bruno Scaliante de Moura, pelo companheirismo incondicional.

À todos os professores da Pós-graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública do IPTSP/UFG, pela enorme contribuição para o meu crescimento. A todos demais profissionais do IPTSP/UFG, desde o corpo administrativo de onde gostaria de citar a diretora Dra. Regina Maria Bringel Martins, e a vice-diretora Dra. Flávia Aparecida de Oliveira, os secretários da pós-graduação José Clementino e Kariny, os demais funcionários, incluindo os funcionários da limpeza, todos tão importantes em propiciar o ambiente que temos para desenvolver nossos trabalhos.

A todos pesquisadores parceiros deste trabalho, em especial ao Dr. Gerson Penna e demais pesquisadores do ensaio clínico MDT-U, Dra. Selma Jerônimo, pessoa pela qual agradeço todo o apoio do Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte pela colaboração fundamental cedendo tempo, equipamento e disponibilidade para que pudéssemos executar etapas importantes do nosso trabalho em seus laboratórios. A Dra. Rozana Castorina Silva e a enfermeira

Maria do Perpétuo Socorro Amador, por disponibilizarem parte das amostras utilizadas nesta pesquisa.

Aos amigos, em especial Jarleo Barbosa, e todos da Panaceia filmes que me ajudaram a aprender algo mais que não só ciência, me livrando assim da monotonia de ser só um. A todos demais amigos que por medo de ter uma lista muito longa, me atenho em apenas dizer “vocês sabem quem são”, pelo companheirismo, paciência e por ajudar a diluir as tensões em cerveja, música e romance.

SUMÁRIO

SUMÁRIO VI

TABELAS, FIGURAS E ANEXOS VII

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS VIII

RESUMO X

ABSTRACT XI

1 INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA 1

1.1. HANSENÍASE 1
1.1.1. Epidemiologia e controle da hanseníase *1*
1.1.2. Classificação *3*
1.1.3. Imunologia da Hanseníase *6*
1.1.4. Diagnóstico e exames auxiliares *11*
1.1.5. Tratamento *19*
1.1.6. Reações Hansênicas *20*
1.1.7. Recidiva *20*
1.2. DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS INFECCIOSAS 21
1.2.1. Importância de testes de diagnóstico rápido *22*
1.2.2. Testes Imunocromatográficos (Fluxo Lateral) *24*
1.2.3. Processo de desenvolvimento de testes rápidos *25*
1.3. O USO DA ALBUMINA BOVINA (BSA) NA SOROLOGIA 29

2 JUSTIFICATIVA 32

3 OBJETIVOS 34

4 MÉTODO(S) 35

4.1. POPULAÇÃO DE ESTUDO 35
4.2. EXAME HISTOPATOLÓGICO 37
4.3. EXAME BACILOSCÓPICO 37
4.4. TESTE DE ELISA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI PGL-I NO SORO 38
4.5. TESTE SOROLÓGICO *ML FLOW* 38
4.6. AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA 39
4.7. ASPECTOS ÉTICOS 39

5 ARTIGOS 41

5.1. ARTIGO 1 – TÍTULO: BRAZIL U-MDT RANDOMIZED CLINICAL TRIAL: COMPARISON OF METHODS FOR LEPROSY CLASSIFICATION. 41
5.2. ARTIGO 2 – TÍTULO: EVALUATION OF A RAPID SEROLOGICAL TEST FOR LEPROSY CLASSIFICATION USING HUMAN SERUM ALBUMIN AS THE ANTIGEN CARRIER. 56
5.3. ARTIGO 3 – TÍTULO: PHENOLIC GLYCOLIPID–I DOES NOT CROSS-REACT WITH VISCERAL LEISHMANIASIS SERA IN A BRAZILIAN SUBSET. 76

6 DISCUSSÃO 81

7 CONCLUSÕES 86

8 REFERÊNCIAS 87

ANEXO 1 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA, TCLE 110

TABELAS, FIGURAS E ANEXOS

Introdução.

Figura 1: Estrutura química do PGL-I. 15

Figura 2: Compontentes de um teste imunocromatográficos. 25

Artigo 1.

Tabela 1: Characteristics of study population. 46

Tabela 2: Clinical and laboratorial features according to R&J classification of leprosy patients. 47

Tabela 3: Positivity to different classification methods according to R&J classification. 48

Tabela 4. Performance parameters for classification methods compared to the R&J classification. 48

Figura 1. ROC curve for all classification methods evaluated. 49

Artigo 2

Tabela 1: Seropositivity to ML Flow BSA and ML Flow HSA of the studied population clustered by endemic or non-endemic area for leprosy. 65

Tabela 2. Concordance between serological tests for all studied groups. 65

Tabela 3. Performance parameters for ML Flow BSA and ML Flow HSA tests. 66

Artigo 3.

Figura 1. PGL-I Serology of visceral leishmaniasis patients. 79

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

BAAR – Bacilo Álcool-Ácido Resistente

BB – Borderline borderline

BCG – Bacilo Calmette & Guérin

BL – Borderline Lepromatoso

BSA – Albumina de Soro Bovino

BT – Borderline Tuberculóide

D-BSA – Dissacarídeo ligado diretamente à BSA

DC – Célula Dendrítica

ELISA – *enzyme-linked immunosorbent assay* (Ensaio Imunoenzimático)

ENH – Eritema Nodoso Hansênico

FDA – *Food and Drug Administration*

FLA-ABS – *Fluorescent leprosy antibody absorption* (Ensaio imunofluorescente para hanseníase)

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

I – Indeterminada

IB – Índice Baciloscópico

IFN -γ – Interferon gamma

IgA – Imunoglobulina da classe A

IgG – Imunoglobulina da classe G

IgM – Imunoglobulina da classe M

IL-1 – Interleucina 1

IL-2 – Interleucina 2

IL-12 – Interleucina 12

KIT BR – *Biomedical Research – Royal Tropical Institute*

LL – Pólo lepromatoso

LV – Leishmaniose visceral

MB – Multibacilar

MHC – Complexo de Histocompatibilidade Principal

M-O-BSA – Monossacarídeo ligado à BSA por um braço octil

MS – Ministério da Saúde

ND-O-BSA – Dissacarídio natural ligado à BSA por um braço octil

NGS – Soro Normal de Cabra

NK – *Natural Killer*

NHDP - *National Hansen's Disease Programs*

NLR - *Netherlands Leprosy Relief*

NP – Neural Pura

NT-P-BSA – Trissacarídio natural ligado à BSA por um radical fosfato

OMS – Organização Mundial da Saúde

ONG – Organização Não Governamental

PB – Paucibacilar

PBMC - Células mononucleares do sangue periférico

PBS – Tampão Salino-Fosfato

PBST – Tampão Salino-Fosfato com Tween 20.

PCR – Polimerase *Chain-Reaction*

PGL-I – Glicolipídio Fenólico I

PHA - Hemaglutinação Passiva

PNCH – Programa Nacional de Controle da Hanseníase

PRR – Receptor Associado a Patógeno

PQT – Poliquimioterapia

RIA – Radioimunoensaio

RR – Reação Reversa

SVS - Secretaria de Vigilância em Saúde

TLR – *Toll Like Receptors* (Receptores Semelhantes a Toll)

TNF-α – Fator de Necrose Tumoral alfa

TT – Pólo tuberculóide

VPP - Valor Preditivo Positivo

VPN - Valor Preditivo Negativo

RESUMO

A sorologia para detecção de anticorpos da classe IgM contra o PGL-I, antígeno específico do *M. leprae,* pode ser utilizada para auxiliar a classificação de pacientes de hanseníase em paucibacilares (PB) e multibacilares (MB). Erros na classificação podem levar ao risco aumentado de recidiva, devido a tratamento insuficiente de pacientes MB ou, por outro lado ao tratamento excessivo de pacientes PB com drogas que apresentam efeitos colaterais consideráveis. A classificação pelo sistema de R&J de 854 pacientes de hanseníase recrutados pelo U-MDT/RCT-BR foi comparada a diversos métodos de classificação visando avaliar a acurácia de cada método. Este estudo também avaliou a possibilidade de melhoria dos testes sorológicos pela substituição da proteína carreadora do antígeno, a albumina bovina (BSA), por uma proteína humana (HSA), visando eliminar ligações não específicas. A especificidade dos testes foi avaliada utilizando amostras de contatos de pacientes, indivíduos saudáveis, pacientes de tuberculose e de leishmaniose visceral de áreas endêmica e não endêmica para hanseníase. Foi observado neste estudo que a sorologia apresenta desempenho semelhante a baciloscopia, um dos padrões utilizados para classificação dos pacientes. Os testes ML Flow utilizando BSA ou HSA foram capazes de alocar corretamente 70,9% e 68,6% dos pacientes PB e, 87% e 81% dos pacientes MB, respectivamente. A sorologia PGL-I não apresentou reatividade cruzada com o soro de pacientes de Leishmaniose Visceral e se confirmou a baixa soropositividade entre os grupos controle. Este estudo sugere que a proteína carreadora do antígeno não influencia de maneira significante na soropositividade dos grupos estudados.

ABSTRACT

Serology to detect IgM antibodies against the PGL-I, a species-specific antigen from *Mycobacterium leprae*, can be used to aid in the classification of leprosy patients into paucibacillaries (PB) or multibacillaries (MB). Misclassification of leprosy patients may lead to relapse, due to inadequate treatment or, in the other hand, may lead to overtreatment of PB patients with drugs that present heavy side effects. R&J classification of 854 patients recruited by the U-MDT/RCT-BR was compared to diverse methods of classification aiming to assess each method's accuracy. This study also evaluated the possibility of enhancement of serological tests by substituting the antigen carrier protein, the bovine serum albumin (BSA) by a human protein (HSA), aiming to eliminate unespecific bindings. The tests specificity was evaluated using samples from household contacts, healthy population, TB patients and Visceral Leishmaniasis from endemic and non-endemic areas. It was observed that PGL-I serology presents a comparable performance to slit skin smears, one of the gold standards used to classify leprosy patients. ML Flow BSA and ML Flow HSA tests correctly allocated 70.9% and 68.6% of patients in the PB group, and 87% and 81% of patients in the MB group, respectively. PGL-I serology did not presented cross-reactions with Visceral Leishmaniasis serum samples and confirmed a low positivity among control groups. The study suggests that the carrier protein of the antigen did not influence significantly in the seropositivity of studied groups.

1 INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA

1.1. Hanseníase

A hanseníase é uma doença que atinge principalmente a pele e nervos periféricos, apresentando uma variedade de manifestações clínicas devido aos diferentes tipos de resposta imune ao agente etiológico, o *Mycobacterium leprae* (SCOLLARD et al. 2006). O *M. leprae* é um bacilo álcool-ácido resistente, de crescimento lento, intracelular obrigatório com tropismo para células de Schwann e macrófagos. Pesquisas sobre novos candidatos para o diagnóstico laboratorial foram dificultadas pela escassa oferta de antígenos desde que o *M. leprae* não pode ser cultivado em meios artificiais.

Os mecanismos de transmissão da hanseníase não são completamente definidos. Van Beers et al. (VAN BEERS et al., 1999) demonstraram que a transmissão do *M. leprae* ocorre em círculos concêntricos ao redor de um paciente, principalmente pacientes com alta carga bacilar não tratados, semelhante ao modelo de "pedra no lago" descrito para tuberculose. Características sócio-econômicas, sanitárias e climáticas precárias além de predisposição genética também parecem desempenhar papel importante no desenvolvimento da doença (FINE et al., 1988; FINE et al., 1981; MIRA et al., 2006).

O período de incubação da doença é difícil de ser determinado, geralmente prolongado, em média compreendendo entre 2 e 5 anos (NOORDEEN 1985). Estudos relatam a ocorrência da doença em recém nascidos (MONTESTRUC; BERDONNEAU, 1954), ou veteranos de guerra vivendo em áreas não endêmicas que manifestaram a doença até 30 anos depois de se exporem a regiões endêmicas por curtos períodos (NOORDEEN, 1985).

1.1.1. Epidemiologia e controle da hanseníase

O controle de uma doença infecciosa envolve redução na sua incidência e prevalência, e por consequência na mortalidade e morbidade ocasionadas pela mesma. A OMS considera a hanseníase eliminada como problema de saúde pública ao se atingir

uma prevalência inferior a um caso por 10.000 habitantes de determinada região (WHO, 1995). Em 1985, o número estimado de casos de hanseníase no mundo era de 12 milhões de pessoas, correspondendo a uma prevalência de 19 casos para 10.000 habitantes (NOORDEEN, 1985). Essa prevalência atingiu taxa de menos de um caso para cada 10.000 habitantes, com 597.000 casos novos registrados no final do ano 2000 (BRITTON & LOCKWOOD, 2004). Este número foi reduzido para 189.018 casos (0,33 casos/10.000 hab) registrados no final de 2012, com 232.857 casos novos (WHO, 2012).

Apesar da drástica redução no número de casos registrados nas últimas duas décadas, a incidência da doença tem caído lentamente. Em 2012, a Ásia apresentou a maior taxa de detecção, 8,98 casos por 100.000 habitantes, seguida das Américas com 4,14 casos por 100.000 habitantes. Nestas regiões os dados foram fortemente influenciados pelo número de casos notificados pela Índia com 134.752 novos casos. No Brasil 33.303 casos novos foram notificados em 2012 representando o segundo país em número absoluto de casos, correspondendo a 92% do total de casos novos nas América (WHO, 2012). Em Goiás, no ano de 2012 foram diagnosticados 2.205 casos novos, o que corresponde a 35,8 casos/100,000 habitantes e a prevalência foi de 3,0/10,000 habitantes (BRASIL, 2013).

O declínio apresentado na prevalência de hanseníase com a implementação de terapias cada vez mais curtas não foi acompanhado de um declínio da incidência, indicando que a prevalência é um parâmetro inadequado para se avaliar o controle da infecção. A taxa de detecção representa um parâmetro mais condizente por refletir a agilidade diagnóstica em função da incidência real. A redução da relação entre a taxa de detecção e a incidência real resulta em aumento no número de casos não diagnosticados (prevalência oculta), considerados os maiores responsáveis pela transmissão da doença (PENNA et al., 2008).

Contatos domiciliares de pacientes com hanseníase, especialmente das formas MB estão em risco aumentado para o adoecimento. Evidências apontam para a possibilidade de transmissão da doença na fase pré-clínica e também sobre a possível infectividade de casos PB (KLATSER et al., 1993; SWAIN et al., 2004). Estudos mais recentes ressaltam evidências de transmissão extra-domiciliar em áreas hiperendêmicas e sugerem a ampliação das ações de intervenção para contatos extra-domiciliares próximos, especialmente os contatos consanguíneos (CALADO et al., 2005; MEIMA et al., 1999; MEIMA et al., 1999; MEIMA et al., 2004; MEIMA et al., 2008). Estudo relatou

eficiência de regime profilático com dose única de rifampicina entre contatos de pacientes nos primeiros dois anos de seguimento. Esta proteção não foi observada aos 4 ou 6 anos de seguimento em região de hiperendemicidade para hanseníase (FEENSTRA et al., 2012).

Estudos encontraram evidências de que a vacinação por BCG pode fornecer uma proteção parcial contra hanseníase (BAKER et al., 1993; BERTOLLI et al., 1997; BOELENS et al., 1995; CUNHA et al., 2004; CUNHA et al., 2004; FINE et al., 1986; LOMBARDI et al., 1996; LWIN et al., 1985; MULIYIL et al., 1991; OREGE et al., 1993; PÖNNIGHAUS et al., 1992; PÖNNIGHAUS et al., 1994; RODRIGUES et al., 1992; STANLEY et al., 1981; THUC et al., 1994; ZODPEY et al., 1999; ZODPEY et al., 1997; ZODPEY et al., 1998; ZODPEY et al., 2005). Revisão sobre o assunto realizada por Velema e Ogbeiwi (VELEMA; OGBEIWI, 2007) apontou uma eficácia média de 70% (variação de 42-80%) da vacinação por BCG na prevenção de hanseníase, o que encoraja a manutenção da vasta cobertura de vacinação no Brasil.

1.1.2. Classificação

Devido ao amplo espectro de manifestações clínicas em que se apresenta, a hanseníase é classificada segundo suas características clínicas, histopatológicas e imunológicas por dois sistemas principais, o de Madri (1953) e Ridley Jopling (RIDLEY; JOPLING, 1966). No sistema de Madri consideram-se dois pólos estáveis e opostos (virchowiano e tuberculóide) e dois grupos instáveis (indeterminado e dimorfo). A classificação proposta por Ridley & Jopling é amplamente utilizada em pesquisas e leva em consideração a imunidade dentro de um espectro de resistência do hospedeiro. Na forma polar tuberculóide (TT), com baixa carga bacilar, predomina a resposta imune celular com baixa ou nenhuma produção de anticorpos. No outro extremo está a forma lepromatosa (LL), com alta carga bacilar, alta produção de anticorpos e baixa ou ausente resposta imune celular. Além das formas polares são descritas formas imunologicamente e clinicamente instáveis que são borderline-tuberculóide (BT), borderline-borderline (BB) e borderline-lepromatosa (BL) (RIDLEY; JOPLING, 1966). Os primeiros sinais da hanseníase dificilmente são notados por pacientes ou até mesmo por profissionais da saúde e este grupo é denominado como forma Indeterminada (JOPLING, 1959). A

doença ainda pode se apresentar sob a forma neural pura, sem manifestações cutâneas e escassos bacilos mesmo em biópsias de nervos (JARDIM et al., 2005).

1.1.2.1 Classificação Clínica

Indeterminada (I)

Esta forma foi descrita por Jopling em 1959, e não foi incluída na classificação apresentada por Ridley e Jopling em 1966. Os primeiros sinais da hanseníase dificilmente são notados por pacientes ou até mesmo por profissionais da saúde. A forma indeterminada se apresenta como poucas lesões pálidas (hipopigmentadas) ou levemente eritematosas, a sensibilidade pode estar preservada ou pouco reduzida e geralmente estão localizadas em áreas expostas da pele. Essas lesões podem curar espontaneamente ou evoluir para formas do espectro da doença (JOPLING, 1959).

Forma tuberculóide (TT)

No pólo tuberculóide da doença as lesões são pouco numerosas, e geralmente menores que 10 cm, pálidas ou cor de cobre com margens bem definidas. A hipopigmentação se deve a redução do número normal de melanócitos (YAWALKAR, 2002). As lesões TT apresentam bordas elevadas, ásperas, sem pêlos e demonstram centro com sinais de regressão ou cura. A superfície da lesão é seca devido à deficiência da sudorese. A perda de sensibilidade e cantos bem definidos das lesões são sinais característicos da forma tuberculóide da hanseníase. Biópsias destas lesões apresentam granulomas bem desenvolvidos que podem ser confluentes com raros bacilos demonstráveis nos tecidos (SCOLLARD et al., 2006).

O acometimento neural é mais comum no pólo tuberculóide (CROFT et al., 2000). É comum observar um nervo cutâneo espessado próximo à lesão. O acometimento pode provocar perda de sensibilidade, dor, fraqueza muscular e até paralisia (YAWALKAR, 2002).

Lesões satélites indicam disseminação da doença devido ao declínio do mecanismo de defesa do paciente e indicam migração para formas borderline da doença (YAWALKAR, 2002).

Formas Borderline (BT, BB, BL)

Pacientes com formas borderline podem ser classificados em Borderline Tuberculóide (BT) Borderline Borderline (BB) e Borderline Lepromatoso (BL). São as formas mais comuns encontradas em hanseníase. Se os pacientes com estas formas instáveis da doença não forem tratados, a doença pode evoluir para o pólo lepromatoso.

Quanto mais próximo do pólo lepromatoso o paciente se encontra, mais numerosas, menos definidas e anestésicas as lesões vão se tornando. Hipoestesia e perda de pêlos são características de hanseníase borderline mais destacadas na forma borderline tuberculóide. São nessas formas que se encontram os casos mais severos de danos neurais (YAWALKAR, 2002).

Forma Lepromatosa (LL)

Máculas aparecem numa fase inicial da forma lepromatosa e são geralmente pequenas, numerosas e distribuídas simetricamente apresentando uma superfície brilhosa, de margens indefinidas. As lesões se tornam mais evidentes após exposição à luz solar. Como as lesões são assintomáticas, discretas no início e sem distinção, geralmente não são percebidas pelos pacientes. Lesões infiltradas surgem numa fase mais tardia e a agressão provocada pelo infiltrado origina nódulos. Os nódulos aparecem geralmente nas orelhas, face, extremidades, articulações e raramente nas genitálias. Alguns pacientes não passam pela fase de máculas e os primeiros sinais notórios de hanseníase podem ser os nódulos, mais comuns nas orelhas. Nariz, testículos e olhos são frequentemente afetados nesta forma da doença, afetando a qualidade de vida do paciente (YAWALKAR, 2002).

Pacientes com a forma LL apresentam uma anergia específica ao *M. leprae* e não montam uma resposta imune celular frente ao bacilo, sem apresentar no entanto deficiência da resposta imune celular a outros patógenos. Os mecanismos responsáveis por esta anergia ao bacilo nos pacientes LL ainda não foram esclarecidos (SCOLLARD et al., 2006).

Forma Neural Pura (NP)

A forma neural pura é de difícil diagnóstico, pois não apresenta manifestação cutânea e o bacilo é difícil de ser identificado. Além disso a biópsia de nervos é um procedimento invasivo que requer profissionais altamente qualificados (JARDIM et al.,

2003). A hanseníase NP caracteriza-se por déficit neural ou espessamento de nervos periféricos. Prejuízo na sensibilidade cutânea, parestesia, dor neuropática e espessamento neural são os sintomas mais comuns desse tipo de hanseníase (JARDIM et al., 2005; JARDIM et al., 2003; JARDIM et al., 2004; RODRIGUES et al., 1992).

O nervo acometido pode se apresentar sensível à palpação ou espontaneamente doloroso. A forma NP pode levar a parestesia, hipotonia e atrofia, particularmente dos músculos das mãos e pés (YAWALKAR, 2002).

1.1.2.2 Classificação operacional

Visando facilitar a classificação para fins de tratamento, a OMS introduziu em 1982 um sistema de classificação baseado principalmente na contagem do número de lesões cutâneas e espessamento neural. Este sistema incluía originalmente o exame baciloscópico. No fim da década de 90 esta classificação foi simplificada levando em conta apenas o número de lesões cutâneas: pacientes apresentando até cinco lesões são considerados paucibacilares (PB) e aqueles com seis ou mais lesões são classificados como multibacilares (MB) (WHO, 1998).

1.1.3. Imunologia da Hanseníase

1.1.3.1 Imunidade Inata

O início da resposta imune inata é dado pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), mediante um grupo de receptores denominados receptores para reconhecimento de padrões (PRRs) presentes em células do sistema imune inato. Um importante grupo de PRRs são os receptores semelhantes a Toll (TLRs). Heterodímeros formados por TLR2 e TLR1 (TLR2/1) são ativados por lipoproteínas triacetiladas presentes no *M. leprae.* (ALIPRANTIS et al., 1999; BRIGHTBILL et al., 1999; MEANS et al., 1999; TAKEUCHI et al., 2002). A associação entre polimorfismos nas regiões codificadoras das moléculas de TLR2 ou TLR1 e suscetibilidade a hanseníase foi descrita (MODLIN, 2010).

Outros PRRs podem estar envolvidos na resposta imune inata frente a infecção pelo *M. leprae*. Dois polimorfismos de uma única base de nucleotídio (SNPs) no gene de

TLR4 estão associados a efeito protetor contra hanseníase (BOCHUD et al., 2009). O receptor TLR9 reconhece CpG DNA bacteriano, participando na resposta contra micobactérias (BAFICA et al., 2005). Estudos mostraram evidências de associação entre polimorfismos no gene de TLR8 e resistência a tuberculose e sugerindo uma possível participação de TLR8 na suscetibilidade a hanseníase (MONTOYA; MODLIN, 2010). Receptores citoplasmáticos da família dos receptores semelhantes a NOD reconhecem peptidoglicanos incluindo aqueles derivados de micobactérias como o muramil-dipeptídio (MDP) (YANG et al., 2007). A relevância da participação de NOD2 na resposta contra hanseníase foi demonstrada num estudo que identificou que SNPs de NOD2 e RIP2 (molécula associada à via bioquímica de sinalização do NOD2) estão associados à suscetibilidade à hanseníase com maior expressão nas formas MB (ZHANG et al., 2009).

Um mecanismo antimicrobiano importante na ativação de TLRs envolve a ativação da CYP27b1, enzima que converte a pró-vitamina D (25D) na sua forma ativa (1,25D), aumentando a expressão do receptor de vitamina D (VDR) e induzindo a síntese de catalecidinas, que são peptídios antimicrobianos (KRUTZIK et al., 2008; LIU et al., 2007; MARTINEAU et al., 2007; WANG et al., 2004). Polimorfismos na molécula do VDR ou moléculas associadas a esta via metabólica como a defensina humana β1 (DEFB1) estão associados à forma MB da hanseníase (MONTOYA et al., 2009; PRADO-MONTES DE OCA et al., 2009). Esta via de atuação está relacionada a expressão de IFN-γ, como foi demonstrado por Teles et al. (TELES et al., 2013).

Os PRRs também atuam promovendo a fagocitose, processo que envolve a captação de partículas ou microrganismos em fagossomas. Vários PRRs da superfície de macrófagos que identificam componentes de micobactérias já foram identificados, como receptores de lectina tipo C, que reconhecem especificamente estruturas de carboidratos encontradas na parede celular (MAEDA et al., 2003) ou receptores do complemento CR1, CR3 e CR4 (KANG; SCHLESINGER, 1998). O receptor CR3 pode facilitar a fagocitose de micobactérias através de opsoninas do complemento ou através de fagocitose mediada por lectinas, na presença do colesterol (CYWES et al., 1996; PEYRON et al., 2000). Geralmente, os fagossomas se desenvolvem e se fundem a lisossomas promovendo a destruição da partícula ou microrganismo englobado. Porém, alguns microrganismos, como o *M. leprae* possuem mecanismos para impedir esta fusão, como a inibição de sinais do TLR2 responsáveis por suprimir a TACO (proteína rica em

triptofano e aspartato) (TANIGAWA et al., 2009). A TACO é responsável por inibir a fusão dos fagossomas ao lisossoma, permitindo a permanência do bacilo nos fagossomas e é expressa em altas concentrações em lesões de pacientes MB (SUZUKI et al., 2006).

O *M. leprae* ainda possui mecanismos de sobrevivência que desviam o metabolismo de lipídeos do hospedeiro de forma a acumular fosfolipídeos oxidados no interior de macrófagos. Estas moléculas são utilizadas pelo bacilo na síntese de seus lipídios e fatores de virulência contribuindo para a patogênese da doença (JAIN et al., 2007; REED et al., 2004).

Um potencial papel das proteínas do complemento na evasão do bacilo foi sugerido por Callegaro-Filho et al. (2010). O PGL-I do *M. leprae* é expresso na membrana de células dendríticas (DC) infectadas pelo bacilo onde pode ativar a cascata do complemento. Callegaro-Filho et al. demonstraram que o PGL-I e o componente do complemento C3 estão co-localizados no raft lipídico na membrana da DC e adentram a sinapse imunológica em culturas de DC infectadas e células T. Nesta localização, o C3 ativado pode ativar células T naïve via proteína do complemento CD46, um processo conhecido por estimular a diferenciação de células T regulatórias secretoras de IL-10.

Além da fagocitose, os macrófagos exercem atividade antimicrobiana na eliminação de patógenos. Embora o infiltrado rico em macrófagos esteja presente nas duas formas da hanseníase, nas lesões PB estas células estão ativadas e raramente contêm bacilos. Nas formas MB, são encontrados inúmeros bacilos e a formação de células xantomatosas denominadas células de Virchow, que resultam do acúmulo de lipídios derivados principalmente do bacilo no interior dos macrófagos (CRUZ et al., 2008). O bacilo ainda possui mecanismos para inibir a atividade de reativos do oxigênio no interior dos macrófagos, como a inibição da síntese de superóxidos provocada pelo PGL-I (CHAN et al., 1989) e a expressão de superóxido-dismutases SodA e SodC que impedem a ação do óxido nítrico (WILLIAMS et al., 2004). O papel do óxido nítrico em humanos é controverso, porém diversos estudos demonstraram a expressão da enzima NO sintase induzida (iNOS) detectada por imunohistoquímica no sítio de lesões causadas por agentes intracelulares a exemplo do *M. leprae* (KHANOLKAR-YOUNG et al., 1998).

Além dos macrófagos, as células dendríticas (DC), denominadas células apresentadoras de antígeno profissionais (APC) são importantes mediadoras da resposta imune inata durante a polarização da resposta imune adaptativa. As DC podem processar

e apresentar antígenos protéicos para células T CD8+ através de moléculas de MHC de classe I, ou para células T CD4+ através de moléculas MHC de classe II. Além disso, as células dendríticas podem apresentar antígenos não protéicos por meio da molécula não polimórfica CD1 para linfócitos T restritos a esta molécula (linfócitos Tγδ). Os linfócitos Tγδ específicos contra antígenos lipídicos de micobactérias produzem altos níveis de IFN-γ e possuem atividade citolítica contra alvos CD1+ (SIELING et al., 1995).

A captura de bacilos pelas APC com subsequente apresentação para linfócitos T e síntese de citocinas e quimiocinas controlam a inflamação no sítio de invasão e polarizam a resposta imune adquirida (MAEDA et al., 2005). As APC podem secretar citocinas pró-inflamatórias como TNF-α, IL-12 e IL-15. Estas citocinas vão instruir uma resposta adaptativa do tipo Th1 (MODLIN, 2010). Os macrófagos podem secretar citocinas como a IL-4 e IL-10, que vão induzir programas inibitórios nas células efetoras da imunidade inata e adquirida (CRUZ et al., 2008; MONTOYA et al., 2009). Em estudo recente, a expressão de IL-10 em pacientes do polo MB foi correlacionado a expressão de IFN-β. Esta via estaria inversamente relacionada a via do receptor de vitamina D induzida pelo IFN-γ supracitada (TELES et al., 2013). Neste mesmo estudo, foi demonstrado que o programa induzido pelo IFN-β é capaz de inibir a resposta imune mediada por IFN-γ, primeiramente por meio da IL-10. Além disso, o IFN-β é capaz de inibir ativadores do inflamasoma na indução da síntese de IL-1, citocina importante na indução da via do VDR.

1.1.3.2 Imunidade Adquirida

O espectro clínico apresentado pela hanseníase é explicado pelos diferentes padrões de resposta imune desenvolvida frente à infecção (RIDLEY; JOPLING, 1966). As células T exercem um papel importante na resistência contra o *M. leprae*, como evidenciado em estudos utilizando camundongos timectomizados ou geneticamente atímicos (COLSTON; HILSON, 1976). Citocinas produzidas principalmente por células T como IL-2, IFN-γ, e linfotoxina são predominantes em lesões de pacientes PB, porém estão praticamente ausentes em lesões de pacientes MB. Por outro lado, ocorre produção mais proeminente das citocinas IL-4, IL-5 e IL-10 em lesões lepromatosas quando comparadas ao pólo tuberculóide. Estes dados revelam dois padrões bem estabelecidos da resposta imune frente a infecção pelo *M. leprae*. Citocinas características de respostas do

tipo Th1 estão presentes em lesões de pacientes PB que conseguem limitar o crescimento do bacilo. Por outro lado, citocinas correspondentes a resposta imune do tipo Th2 são abundantes em lesões do pólo MB que apresentam grande quantidade de bacilos. A resposta imune do tipo Th2 não é eficaz para limitar a replicação do bacilo. O perfil de citocinas presentes nas lesões TT e LL reflete a resposta imune do tipo Th1 e Th2 associadas respectivamente com resistência e suscetibilidade à doença (YAMAMURA et al., 1991).

Além de padrões de citocinas bem definidos, em lesões de pacientes PB, observa-se o dobro de células T CD4+ em relação a células T CD8+. Já no pólo MB observa-se o dobro de células T CD8+ em relação a T CD4+ é encontrado. As células T CD4+ encontradas em lesões de pacientes do pólo PB secretam principalmente IFN-γ, enquanto que em lesões de pacientes MB, estas secretam IL-4 que suprime a resposta imune inibindo a ativação de macrófagos (SALGAME et al., 1991). Attia et al. encontraram níveis aumentados de células T reguladoras (Treg) em pacientes do pólo TT em comparação ao pólo LL. Segundo este estudo, a atividade reguladora das células Treg seria benéfica para pacientes de hanseníase (ATTIA et al., 2010). Em outro estudo foi demonstrada uma alta frequência de células Treg em pacientes MB com menos de 15 anos, sugerindo que a presença de células Treg estaria envolvido no favorecimento da infecção pelo *M. leprae* (FERNANDES et al., 2013). Porém a amostragem foi pequena, reduzindo o valor estatístico do estudo. O papel das células Treg na patogenia da hanseníase não está esclarecido.

Células T CD8+ e CD4+ podem atuar como células citotóxicas restritas ao MHC de classe I e de classe II, respectivamente sendo que ambas conseguem induzir apoptose de macrófagos infectados pelo *M. leprae* (CHIPLUNKAR et al., 1986; HANCOCK et al., 1991; KALEAB et al., 1990). A apoptose de células infectadas ocorre mediante perforinas e proteases como a granzima B, encontrada em linfócitos T e células NK. Outra proteína importante envolvida na defesa contra bactérias tanto na hanseníase como na tuberculose, é a granulisina encontrada em linfócitos T citotóxicos (OCHOA et al., 2001; STENGER et al., 1998).

Estudos sobre a expressão de citocinas em hanseníase descreveram parâmetros da polarização da doença, na qual as lesões do pólo tuberculóide podem ser consideradas manifestações de hipersensibilidade tardia enquanto que as lesões lepromatosas são caracterizadas por evidente produção de anticorpos, mas com incapacidade de montar

uma resposta imune celular eficaz. Entretanto os mecanismos envolvidos na polarização da resposta imune do tipo Th1 e Th2 e na modulação da resposta celular ao longo do espectro clínico da doença não foram ainda totalmente esclarecidos (SCOLLARD et al., 2006).

Estudos mais recentes têm dado relevância ao padrão de células TCD4+ Th17 como discriminante de formas clínicas de hanseníase. Estudo relatou a expressão e liberação aumentada de citocinas do padrão Th17 (IL-17, IL-21, IL-22 e IL-23) no sobrenadante de cultura de PBMC de amostras de contatos de pacientes sem sinais da doença ou no bordo de lesão de pele de pacientes do pólo tuberculoide se comparadas a pacientes do polo lepromatoso (SAINI et al., 2013). O padrão Th17 também estaria envolvido na patogênese de reações tipo II como descrito por Martiniuk et al. (MARTINIUK; GIOVINAZZO, 2012).

1.1.4. Diagnóstico e exames auxiliares

O diagnóstico de hanseníase é clínico e baseia-se no achado de um ou mais sinais cardinais (WHO, 1997) como presença de lesões cutâneas com perda de sensibilidade, nervos periféricos espessados e a detecção de bacilos álcool-ácido resistentes no raspado intradérmico. As lesões de pele na hanseníase podem se manifestar como manchas, placas, infiltração cutânea, nódulos, tubérculos, alopecia, madarose, triquíase e lesões de mucosa (RIDLEY; JOPLING, 1966). Os distúrbios sensitivos nas lesões podem ser causados tanto pela ação do bacilo nos nervos como pela reação do sistema imune ao bacilo. A neurite pode levar a perda de força muscular, com posterior paralisia, o que pode originar incapacidades e deformidades, como articulações anquilosadas (sem movimento) e em garras, ectrópio e lagoftalmia (eversão e desabamento da pálpebra inferior) (RIDLEY, 1955). Outras deformidades também podem se originar de uma infecção secundaria grave devido a traumas em regiões sem sensibilidade, podendo causar necrose, que muitas vezes pode levar a amputação da região ou a osteomielite com um processo de reabsorção das extremidades ósseas, particularmente os dedos dos pés e mãos (YAWALKAR, 2002).

Cerca de 30% dos pacientes não manifestam nenhum dos sintomas acima, dificultando o diagnóstico clínico (ILA, 2002). Aliado a isto, a resistência dos pacientes em procurar atendimento médico torna o diagnóstico clínico frequentemente tardio, com

aparecimento de sintomas irreversíveis como a perda de sensibilidade ou incapacidade motora.

A hanseníase pode ser confundida com outras doenças de pele (Ptiríase Versicolor, Leishmaniose cutânea, Eczemátide, Vitiligo, micoses cutâneas etc) e com outras doenças neurológicas (Síndrome do túnel do carpo, neuralgia parestésica, neuropatia diabética, lesões por esforço repetitivo, etc) que apresentam sinais e sintomas semelhantes aos seus. Portanto, deve ser feito diagnóstico diferencial em relação a essas doenças (BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

Existem poucos exames laboratoriais utilizados na rotina para auxiliar no diagnóstico da hanseníase, a saber, baciloscopia, histopatologia, teste de Mitsuda, sorologia e reação em cadeia da polimerase (PCR), porém estes testes não fazem parte da rotina das unidades de saúde. Embora a sorologia e a reação em cadeia da polimerase (PCR) sejam reivindicadas por profissionais de saúde como ferramentas auxiliares, estes testes são utilizados exclusivamente em pesquisa.

O teste com o uso de monofilamentos para detecção de alterações de sensibilidade nas lesões apresenta limitações, principalmente quando realizado em crianças muito novas, adultos incapazes de compreender as instruções dadas antes de sua execução (ARAÚJO, 2003).

Em áreas não endêmicas, é muito comum não considerar a hanseníase no diagnóstico diferencial podendo levar à detecção tardia de casos (LOCKWOOD & REID, 2001). Este atraso no diagnóstico pode trazer consequências para os pacientes, como dano neural irreversível e sequelas em vários graus até a deficiência física (BRITTON & LOCKWOOD, 2004).

1.1.4.1 Baciloscopia

O *M. leprae* pode ser encontrado na microscopia de raspados intradérmicos ou material de biópsia corados pela técnica de Ziehl-Neelsen. O *M. leprae* apresenta-se como um bacilo curvo com cerca de 0.3μm de espessura e 1-8μm de comprimento, isolado ou em agrupamentos característicos chamados globias. A carga bacilar é expressa como um IB que relata o número de bacilos por campo microscópico em escala logarítmica (SCOLLARD et al., 2006). Geralmente o material de quatro sítios (lóbulos auriculares esquerdo e direito, cotovelos direito e esquerdo ou lesão) é analisado e a carga

bacilar é expressa pelo IB médio dos quatro sítios analisados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

A detecção de bacilo álcool-ácido resistente por baciloscopia de raspado intradérmico tem alta especificidade, mas baixa sensibilidade já que cerca de 70% dos pacientes apresentam resultado negativo (LOCKWOOD et al., 2002). Porém este exame é importante, pois pode identificar pacientes MB que apresentam maior capacidade de transmissão do bacilo e maior risco de recidiva (BRITTON & LOCKWOOD, 2004) e reações hansênicas (VERHAGEN et al., 1999). O teste considerado padrão ouro para o diagnóstico de hanseníase é o exame histopatológico de biópsia da borda de lesão no qual podem ser reconhecidos padrões histopatológicos característicos, o envolvimento de nervos e a presença do bacilo (SCOLLARD et al., 2006).

1.1.4.2 Histopatológico

Os resultados do exame histopatológico de lesões de pele de pacientes de hanseníase diferem de acordo com a classificação destes pacientes. Em resumo, lesões de pacientes tuberculóides (TT) apresentam granulomas compostos por células epitelióides ao redor de elementos neurovasculares que invadem a zona papilar. A pesquisa por bacilos é negativa de forma que o laudo é sugestivo de hanseníase quando houver sinais de agressão aos filetes nervosos. Nos casos borderline (BT, BB e BL) o granuloma é mais difuso que nos casos TT sem a presença de células do tipo gigantes ou manto linfohistiocitário. Não há comprometimento da epiderme pelo granuloma, enquanto nervos são habitualmente comprometidos e identificáveis. Em pacientes lepromatosos (LL) as lesões apresentam hansenomas frouxos constituídos principalmente por macrófagos vacuolizados (célula de Virshow) (EL-DAROUTI et al., 2006).

1.1.4.3 PCR

A identificação do *M. leprae* por PCR é usada para fins de pesquisa e não é recomendado como teste diagnóstico (WHO, 2000). O teste pode ser realizado com vários tipos de amostras biológicas como pêlos, sangue, secreção nasal e linfa (SANTOS et al., 1993), porém, fragmentos de biópsia de pele e nervos, parecem ser de maior sensibilidade para a amplificação do DNA do bacilo (CHEMOUILLI et al., 1996;

GILLIS & WILLIAMS, 1991). A sensibilidade do teste com pacientes PB dificilmente alcança 50%, somado ao custo elevado da técnica, inviabilizando seu uso em países onde a hanseníase é endêmica, sendo mais útil para esclarecer casos suspeitos em países onde a doença é rara. Porém, como ainda não existem métodos de cultura do bacilo disponíveis, a PCR se apresenta como uma ferramenta robusta para a detecção do bacilo em situações clínicas específicas ou ensaios experimentais (CHEMOUILLI et al., 1996; KATOCH, 2004; KRAMME et al., 2004; PARASHAR et al., 2006; SINGH et al., 2004).

1.1.4.4 Sorologia

As técnicas sorológicas têm como alvo a detecção de anticorpos específicos contra o *M. leprae* que reflitam a infecção. Testes sorológicos podem ser úteis no monitoramento da eficácia de terapia, na determinação da prevalência da doença e na avaliação da distribuição da infecção em determinada comunidade (BÜHRER-SEKULA, 1998; MOURA, 2008).

A primeira geração de testes sorológicos descritos para hanseníase foi constituída pelo radioimunoensaio (RIA) utilizando o antígeno 7 (MELSOM, 1978), o teste de imunofluorescência (FLA-ABS) utilizando extrato bruto do *M. leprae* (ABE et al., 1980) e a hemaglutinação passiva (PHA) utilizando bacilos sonicados obtidos do fígado de tatus (JAGANNATH; SENGUPTA, 1981). Posteriormente, ensaios imunoenzimáticos (ELISA) utilizando antígenos brutos ou diferentes proteínas do *M. leprae* ou outras micobactérias foram descritos (AGUADO et al., 1986; BACH et al, 1986; BRETT et al., 1983; CHO et al., 1984; DOUGLAS & WORTH, 1984; GONZALEZ-ABREU & GONZALEZ, 1987; HASAN et al., 1989; YOUNG & BUCHANAN, 1983).

A descoberta e elucidação da estrutura química do PGL-I, antígeno específico do *M.leprae* em 1981 (HUNTER; BRENNAN, 1981), e descrição da sua imunogenicidade em 1982 (PAYNE et al., 1982), permitiram inovações na área de sorologia em hanseníase. A molécula do PGL-I é composta por um trissacarídeo (Figura 1) e o principal determinante imunogênico é a porção terminal da molécula. Estudos com anticorpos monoclonais demonstraram que a remoção da porção glicídica da molécula removeu sua capacidade de se ligar a anticorpos enquanto a longa cadeia de ácidos graxos não possui efeito antigênico. Estes e outros resultados indicaram que a porção sacarídea do PGL-I poderia ser aplicada na sorologia da hanseníase. Pela dificuldade em se obter grandes quantidades do PGL-I natural, se avaliou a opção de produção de

análogos sintéticos. A porção do açúcar foi sintetizada e acoplada a molécula de albumina bovina (BSA) ligadas diretamente ou através de grupos fenil (P) ou octil (O). Os seguintes análogos sintéticos foram produzidos: monossacarídeo ligado à BSA por um braço octil (M-O-BSA) (FUJIWARA, 1987), dissacarídeo ligado diretamente à BSA (D-BSA) (GIGG, 1985), dissacarídio natural ligado à BSA por um braço octil (ND-O-BSA) (CHATTERJEE, 1986) e trissacarídio natural ligado à BSA por um braço fenólico (NT-P-BSA) (FUJIWARA et al, 1987).

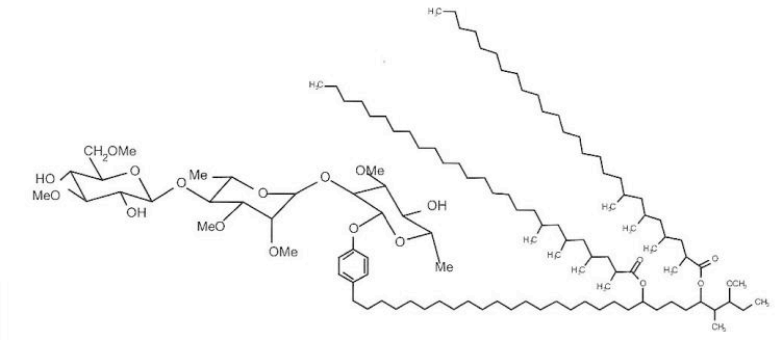


Figura 1: Estrutura química do PGL-I. O principal determinante imunogênico é a porção terminal da molécula.

A maioria dos estudos envolvendo o PGL-I utilizou a técnica de ELISA, uma técnica *in-house* com protocolo bem definido (BRETT et al., 1986). Apesar de a padronização do teste ser relativamente difícil, o baixo custo do ELISA e os resultados quantitativos tornaram a sorologia anti-PGL-I amplamente utilizada na pesquisa. Além do ELISA, foram desenvolvidos ensaios rápidos anti-PGL-I, como o *Dipstick* (BUHRER-SEKULA et al., 1998) e ensaios imunocromatográficos de fluxo lateral como por exemplo o ML Flow (BUHRER-SEKULA et al., 2003) e ML ICA, que são testes mais simples que o ELISA e com resultados reprodutíveis, pois dispensam o emprego de equipamentos laboratoriais ou técnico de laboratório especializado.

Estudo de revisão (MOURA et al., 2008) discutiu a utilização da sorologia anti-PGL-I no controle da hanseníase como ferramenta para classificação dos pacientes, monitoramento de terapia, diagnóstico e predição de reações e recidiva e busca ativa de casos entre contatos. Segundo este estudo, o uso da sorologia PGL-I reduziria o número

de pacientes tratados como MB inadequadamente. Em situações em que testes laboratoriais como a baciloscopia e histopatologia não estão disponíveis, existe uma forte tendência em classificar pacientes como MB. Na Nigéria, por exemplo, 95,7% dos pacientes foram tratados como MB, sendo que somente 19% o seriam se o critério de classificação da OMS (contagem de lesões cutâneas independemente do tamanho) fosse rigorosamente seguido (BÜHRER-SÉKULA et al., 2007). Outro exemplo de baixa confiabilidade na classificação de pacientes é discutido por Declercq (DECLERCQ, 2009) que relata o fato de que nas Filipinas, em 2007 foram notificados 61% de pacientes MB entre os casos novos diagnosticados aumentando para 90% no ano seguinte.

Os métodos sorológicos baseados no PGL-I também podem ser úteis no monitoramento da terapia. Na maioria dos pacientes os níveis de anticorpos anti-PGL-I caem com o tratamento, sendo mais acentuada no início do tratamento (CHO et al., 2001) e geralmente os níveis caem 25 a 50% anualmente (CHATURVEDI, 1991; CHO et al., 1991; DOUGLAS et al., 1988; KLATSER et al., 1989; ROCHE, 1993). A redução nos níveis de anticorpos varia amplamente entre os pacientes sendo que pode ser linear e negativar rapidamente ou levar anos após término da terapia (GELBER et al., 1989).

O uso da sorologia anti-PGL-I como ferramenta auxiliar no diagnóstico de reação tipo I ou II durante ou após o tratamento ou na predição de recidiva não se mostrou eficiente, pois níveis semelhantes de anticorpos podem ser encontrados em pacientes com e sem reação e até mesmo na população saudável (STEFANI et al., 1998). Porém, pacientes com altas concentrações de IgM anti-PGL-I no início do tratamento apresentaram um risco maior de desenvolver reação do tipo I. Além disso, na reação pós alta, pacientes com sorologia PGL-I positivo no momento da alta apresentaram chance 10,4 vezes maior de desenvolver reação quando comparados aos pacientes com sorologia negativa (BRITO, et al., 2008). Desta forma a sorologia anti-PGL-I pode identificar pacientes para monitoramento e tratamento precoce podendo reduzir o dano neural e a incapacidade (ROCHE, 1991). Em ensaio clínico para avaliação de novos esquemas terapêuticos para hanseníase, a soropositividade anti-PGL-I mostrou-se importante na predição do risco de recidiva. Apenas um dos nove pacientes diagnosticados como recidiva não tinha sorologia positiva no início do tratamento e era um caso de resistência a droga (BÜHRER-SÉKULA et al., 2001).

A alta prevalência de soropositivos para PGL-I entre contatos de pacientes de hanseníase MB evidencia que infecção subclínica com *M. leprae* parece ser comum

(DESFORGES et al., 1989; MENZEL et al., 1987; SAAD et al., 1990). A detecção de anticorpos contra o PGL-I identificando contatos infectados sem sinais clínicos aparentes pode ser uma ferramenta auxiliar para os programas de controle da hanseníase. Estudo realizado no Rio de Janeiro verificou benefício da descentralização do atendimento pelo incremento da detecção de novos casos, ampliando a precocidade do diagnóstico e consequentemente reduzindo o número de pacientes incapacitados (CUNHA et al., 2007).

Em estudo que avaliou a possibilidade de implementar o uso do teste ML Flow na rotina dos programas de controle de saúde se constatou que o teste poderia reduzir o percentual de erro de classificação e consequentemente o tratamento insuficiente diminuindo a necessidade da realização do teste baciloscópico (BÜHRER-SÉKULA et al., 2007). Estes resultados ressaltam a importância de um teste simples, de fácil execução e leitura para o sistema de saúde.

Após a descrição do genoma do *M. leprae* (COLE et al., 2001) vários estudos têm identificado novas proteínas ou peptídeos específicos do *M. leprae* com potencial aplicabilidade no diagnóstico laboratorial da hanseníase (ARÁOZ et al., 2006; DUTHIE et al., 2007; GELUK, 2011; HUNGRIA et al., 2012; QIONG-HUA et al., 2013; SAMPAIO et al., 2011; SPENCER et al., 2012; STEFANI, 2008). Em geral, os resultados de sorologia empregando proteínas recombinantes do *M. leprae* refletem o espectro imunológico da doença: altos níveis de anticorpos no pólo lepromatoso e níveis mais baixos de anticorpos no pólo tuberculóide (STEFANI, 2008). Em estudo que avaliou a resposta imune humoral e celular a 33 proteínas recombinantes do *M. leprae*, três destas (ML0405, ML2055, ML2331) foram identificadas como imunogênicas capazes de induzir tanto a resposta imune celular específica em pacientes PB quanto resposta humoral pela produção de IgG em pacientes MB (SAMPAIO et al., 2011). Foram encontradas diferenças nos padrões de resposta imunológica a proteínas do *M. leprae* entre populações do Brasil e das Filipinas, porém as proteínas ML0405 e ML2331 foram reconhecidas por pacientes MB dos dois países. Portanto, uma nova proteína (LID-1) oriunda da fusão destas foi gerada mantendo a imunoreatividade das duas proteínas isoladas indicando potencial aplicação no diagnóstico sorológico, principalmente na detecção precoce de casos (DUTHIE et al., 2007). Um teste rápido baseado na detecção de anticorpos contra o LID-1 e o PGL-1 em plataforma única foi desenvolvido e está em fase de avaliação. Os resultados preliminares indicam um desempenho semelhante aos testes rápidos baseados na sorologia PGL-1 (CARDOSO et al., 2013).

1.1.4.5 Ensaios Celulares

Mesmo antes da finalização do sequenciamento genético do *M. leprae* já eram realizados estudos com proteínas purificadas de micobactérias na tentativa de desenvolver um método para o diagnóstico precoce da hanseníase. Ainda na era pré genômica, um estudo testou doze antígenos micobacterianos brutos purificados quanto à indução de IFNγ por células mononucleares periféricas (PBMC) de pacientes com hanseníase e indivíduos saudáveis. Essas proteínas induziram a produção de IFNγ em células de pacientes TT/BT mas não em células de paciente LL/BL. Porém essas proteínas induziram a produção de IFNγ em indivíduos saudáveis vacinados com BCG (DOCKRELL et al., 1996). No ano 2000, outro estudo do mesmo grupo testou oitenta e um peptídeos do *M. leprae* quanto à capacidade de induzir respostas de células T em PBMC de pacientes com hanseníase, contatos domiciliares de pacientes com hanseníase (HHC) e indivíduos saudáveis do Brasil, Etiópia, Nepal, Paquistão e Inglaterra. Os peptídeos induziram fraca resposta imune celular e a maioria deles ainda foi reconhecida pelas PBMCs dos indivíduos saudáveis. Esse trabalho mostrou que os grupos que mais produziram IFNγ em resposta aos peptídeos foram os pacientes TT/BT e o grupo HHC (DOCKRELL et al., 2000; DOCKRELL et al., 2000).

O uso de proteínas recombinantes do *M. leprae* impulsionou as pesquisas no campo dos testes celulares (ARÁOZ et al., 2006; DUTHIE et al., 2007; GELUK, 2011; HUNGRIA et al., 2012; QIONG-HUA et al., 2013; SAMPAIO et al., 2011; SPENCER et al., 2012; STEFANI, 2008). Os primeiros antígenos avaliados, como as proteínas de 10kDa (GroES), 18kDa (DOCKRELL et al., 1989; HUSSAIN et al., 1992) 35kDa (CHUA-INTRA et al., 1998) 45kDa (BRAHMBHATT et al., 2002; MACFARLANE et al., 2001), hsp65 (THOLE et al., 1995) e Ag85 (LAUNOIS et al., 1991; LAUNOIS et al., 1994; LAUNOIS et al., 1995; LAUNOIS et al., 1992; LAUNOIS et al., 1993; LAUNOIS et al., 1993) apresentaram um valor limitado pela reatividade cruzada com outras micobactérias, o que se torna particularmente problemático em regiões de alta endemicidade para tuberculose, cobertura vacinal de BCG ou exposição a micobactérias ambientais. O desenvolvimento de testes baseados em imunologia celular para hanseníase foi encorajado pelo desenvolvimento de IGRAs, sigla em inglês para ensaios de secreção de IFN-γ para o diagnóstico específico da tuberculose (GELUK et al., 2011). Porém, a secreção de IFN-γ tem sido observada em amostras de contatos domiciliares e controles

saudáveis de regiões endêmicas, limitando a aplicação destes ensaios em fornecer um diagnóstico claro da doença (GELUK et al., 2009; SAMPAIO et al., 2011).

1.1.4.6 Teste de Mitsuda

Vários testes cutâneos de hipersensibilidade tardia ao *M. leprae* foram testados como avaliadores da resposta imune celular à hanseníase (BRENNAN et al., 1996). Entre eles o melhor avaliado é o teste de Mitsuda ou lepromina que usa extrato bruto de *M. leprae* esterilizado por autoclave. A lepromina consiste na injeção intradérmica de 0,1 ml de solução de Mitsuda na face ventral do antebraço, e a leitura da reação é feita após 24 a 28 dias. A solução de Mitsuda contém 4,0 x 10^7 bacilos autoclavados por ml (CONVIT et al., 1975).

Outras proteínas purificadas nativas do *M. leprae* já foram avaliadas com a finalidade de se desenvolver um teste cutâneo eficiente no diagnóstico da hanseníase, como o MLSA-LAM (preparado de *M. leprae* derivado de tatus infectados sem LAM) e o MLCwA (derivado de antígenos de parede do *M. leprae*) (BRENNAN et al., 1996; BRENNAN, 2009). Peptídeos sintéticos do *M. leprae* também foram testados quanto à imunorreatividade cutânea de pacientes com hanseníase e seus contatos em regiões endêmicas para avaliar sua utilidade no desenvolvimento de teste cutâneo específico para o diagnóstico da hanseníase (DOCKRELL et al., 2000). Porém, as provas cutâneas de imunidade celular testadas, inclusive o Mitsuda não apresentam a especificidade necessária para servirem como método diagnóstico da hanseníase, devido a forte reatividade cruzada contra micobactérias ambientais não patogênicas e a vacinação BCG (BRENNAN, 2009).

1.1.5. Tratamento

O tratamento de hanseníase tem mudado ao longo dos anos. Na década de 1960 o *M. leprae* começou a desenvolver resistência a dapsona e em 1981 a OMS recomendou a introdução da poliquimioterapia (PQT) (WHO, 1998). As drogas combinadas na PQT incluem a rifampicina, clofazimina e dapsona. Inicialmente, o tratamento se estendia até a negativação da baciloscopia, sendo limitado, posteriormente a duração de 24 doses para pacientes MB e seis doses para PB colocando limite à terapia que antes era por toda a

vida e dificultava a adesão dos pacientes. Estudos posteriores revelaram que a terapia poderia ser mais reduzida resultando em recomendação de um regime de doze doses de três fármacos: rifampicina, clofazimina e dapsona para pacientes MB, administrados em até dezoito meses e seis doses de dois fármacos: rifampicina e dapsona para pacientes PB, administradas em até nove meses (WHO, 1997). Quando o tratamento é administrado adequadamente, as recidivas são raras, porém o acompanhamento continuado dos pacientes é importante na vigilância à resistência medicamentosa. Pacientes que iniciam o tratamento com elevada carga bacilar estão mais sujeitos a recidivar. Atualmente a OMS avalia a possibilidade de introduzir uma terapia uniforme de 6 doses com rifampicina, clofazimina e dapsona, independente da classificação dos pacientes.

1.1.6. Reações Hansênicas

Episódios reacionais são as maiores complicações em hanseníase podendo ocorrer em pacientes virgens de tratamento, durante e/ou após tratamento (NAAFS, 2000) e geralmente deixam sequelas. Reação tipo I ou reação reversa (RR) é um episódio de inflamação aguda na pele e nervos periféricos resultado de uma hipersensibilidade tardia contra antígenos do bacilo que ocorre em aproximadamente 30% dos pacientes (REGO et al., 2007). A reação tipo II geralmente se manifesta como eritema nodoso (ENH) ou multiforme e pode ocorrer em pacientes do pólo lepromatoso. Reação do tipo II se apresenta como um quadro febril debilitante com o aparecimento de nódulos papulares cutâneos acompanhado de inflamação nos nervos, olhos e testículos (BRITTON & LOCKWOOD, 2004). Os diferentes tipos de reação parecem ter mecanismos imunológicos distintos que ainda são pouco compreendidos.

1.1.7. Recidiva

A recidiva é consequência de replicação e dispersão de bacilos sobreviventes ao tratamento. O diagnóstico de recidiva é feito através de IB aumentado e a presença de bacilos íntegros, que pode ser confirmada mediante a inoculação em patas de camundongo para comprovar a presença de bacilos viáveis (RATLEDGE et al., 1989; WATERS et al., 1986).

O diagnóstico de recidiva é mais difícil nos pacientes PB, pois seus sinais e sintomas em muito se assemelham aqueles de reação reversa. Alguns profissionais de saúde diferenciam recidiva de RR baseados na velocidade do aparecimento dos sintomas já que a recidiva se estabelece mais gradualmente. Porém, os pacientes geralmente não sabem dizer se os sinais apareceram ou não de forma gradual. Diferenciar recidiva de reação tem importância na terapêutica já que a recidiva é tratada com um novo regime de PQT e reação hansênica com corticoesteróides (BECX-BLEUMINK, 1992).

Um parâmetro empregado para diferenciar recidiva de RR é o tempo após fim do tratamento. Sinais que aparecem dentro de 5 anos após término de PQT são provavelmente devido à reação e aqueles que aparecem após esse período, possivelmente representam recidiva (PANNIKAR et al., 1989). Porém, sabe-se que reações podem ocorrer em pacientes até mesmo dez anos após término de tratamento e não há dados para afirmar até quando reações tardias podem ocorrer (BAOHONG, 2001; CELLONA et al., 2003; JAMET et al., 1994; JAMET & JI, 1995; PANNIKAR et al., 1989; SHAW et al., 2000; SHETTY et al., 2001).

1.2. Diagnóstico de doenças infecciosas

O método mais seguro para se diagnosticar uma infecção é o isolamento e a caracterização do agente infeccioso. Entretanto isto nem sempre é possível ou prático por várias razões tais como; localização em sítios de difícil acesso (ex.: encéfalo) ou pela inexistência de métodos simples, práticos ou seguros para o isolamento ou cultivo (ex.: infecções por vírus, *Mycobaterium leprae*), ou devido ao uso de drogas que impedem o crescimento do agente infeccioso *in vitro* (BANOO et al., 2006; WHO & TDR, 2010). Nessas circunstâncias, as técnicas de imunodiagnóstico são importantes ferramentas que permitem confirmar a infecção através da presença de antígenos dos agentes infecciosos ou, mais frequentemente, a identificação de componentes das respostas imunológicas como os anticorpos e os linfócitos (GUYATT et al., 1986).

Os métodos de imunodiagnóstico podem envolver precipitação, floculação, aglutinação, imunofluorescência, testes imunoenzimáticos e radioimunoensaios. Cada método apresenta aplicações e limitações próprias. A maioria das técnicas exige a disponibilidade de equipamento especializado, manipulação de reagentes e podem representar procedimentos demorados e que exigem treinamento específico. Diante disso,

as técnicas imunoenzimáticas, como ELISA, imunofluorescência e a imunocromatografia se destacam como ferramentas simples e de fácil execução, portanto, mais adequadas principalmente na realização de monitoramento de um grande número de amostras (KORDE et al., 2003; LEE et al., 2004; LIPIGORNGOSON et al., 2003; NILÜFER & BOYACIOGLU, 2002).

1.2.1. Importância de testes de diagnóstico rápido

Testes de diagnóstico confiáveis e fáceis de utilizar são uma necessidade para o controle de um amplo espectro de doenças incluindo HIV, tuberculose, malária, dengue, esquistossomose, hanseníase entre outras. Alguns testes são complexos para serem aplicados em áreas onde laboratórios são escassos ou mal equipados e onde os recursos humanos receberam treinamento precário. Nestas circunstâncias há necessidade de transporte de amostras ou vários deslocamentos do paciente até obter os resultados de seus exames. Dependendo da disponibilidade de tempo e recursos financeiros o retorno do paciente pode não acontecer acarretando em perda do seguimento ou falha no tratamento (PEELING et al., 2006). O diagnóstico correto, rápido e precoce permite intervenções apropriadas, prevenção de sequelas, interrupção da cadeia de transmissão e vigilância epidemiológica da infecção (MABEY et al., 2004).

Quando os sintomas não são claros ou suficientemente específicos para permitir um diagnóstico puramente clínico, os testes rápidos podem apoiar decisões terapêuticas, ou ainda confirmar ou excluir um diagnóstico baseado em sintomas inespecíficos. A utilização de testes rápidos na vigilância epidemiológica de doenças pode ser útil desde a identificação de casos assintomáticos, verificação da prevalência ou eliminação de doenças em determinadas populações, sendo especialmente importantes na investigação de surtos (PEELING et al., 2006). Além disso, o surgimento e aumento no número de patógenos com mutações associadas à resistência a drogas como pode ocorrer na malária, AIDS e tuberculose, indicam a necessidade de testes diagnósticos que identifiquem cepas com resistência medicamentosa para se definir novas estratégias de tratamento. Outra importante abordagem é o desenvolvimento de testes rápidos para triagem inicial de infecção, especialmente em bancos de sangue e em programas de prevenção de transmissão materno-infantil de patógenos como os vírus HIV e o vírus da Hepatite B (PEELING et al., 2006).

A produção e desenvolvimento de kits diagnósticos para doenças infecciosas negligenciadas não representam prioridade para grandes empresas de biotecnologia, pois a demanda concentra-se em países em desenvolvimento ou não exige uma produção em escala. O envolvimento de fabricantes de pequeno porte e controle de qualidade inadequado costumam ser frequentes e apesar de haver fabricantes responsáveis, as informações acerca do desenvolvimento de testes podem não ser confiáveis. De fato, a responsabilidade de avaliar os testes lançados no mercado que não passam por processos de avaliação mais rigorosos acaba recaindo sobre os profissionais de saúde, o que é eticamente inadequado (RIDLEY, 2006). Além disso, é de importância estratégica que instituições acadêmicas estejam envolvidas neste processo de forma a conferir maior credibilidade e entendimento do significado dos processos de avaliação de testes diagnósticos (WHO & TDR, 2010). A Organização Mundial de Saúde (OMS) considera que o desenvolvimento de testes diagnósticos rápidos, práticos, sensíveis, específicos e de baixo custo representa uma estratégia essencial para tratamento adequado, monitoramento, vigilância e controle de doenças infecciosas, incluindo verificação de eliminação da infecção. Acreditando no caráter promissor da imunocromatografia, a OMS iniciou a montagem de bancos de amostras e organismos para implementar programas de avaliação de testes rápidos para várias doenças infecciosas. Esta iniciativa tem como exemplo o "*Programme on Research and Training in Tropical Diseases"* (TDR) que desenvolve ações para fortalecer o controle de doenças negligenciadas, incluindo a avaliação de testes rápidos para malária, sífilis, clamídia, gonorréia e leishmaniose visceral e o "*Global Programme on Aids"* (GPA) que foi responsável pela avaliação dos testes rápidos para HIV (BELL & PEELING, 2006; WHO & TDR, 2010).

A escassez de opções de kits para o diagnóstico de doenças negligenciadas no mercado, aliada ao reduzido acesso a testes diagnósticos de boa qualidade, contribuem para a enorme carga nos serviços de saúde pública e nos programas de controle. A disponibilidade de testes sensíveis e específicos, de fácil execução e que forneçam resultados em curto espaço de tempo, permite redução de custos e maior eficiência no diagnóstico e controle de doenças infecciosas consideradas negligenciadas. É importante que estes testes possam ser utilizados diretamente pelos profissionais das unidades básicas de saúde, que não requeiram equipamentos ou condições especiais de armazenamento e que apresentem longo prazo de validade (RIDLEY, 2006).

1.2.2. Testes Imunocromatográficos (Fluxo Lateral)

Um amplo número de testes de diagnóstico rápido baseados em princípios de imunocromatografia para diversos fins estão disponíveis no mercado. O primeiro teste foi desenvolvido para detecção de gonadotrofina coriônica humana (hCG) (WONG, 2009). Atualmente existem testes disponíveis para monitorar a ovulação, detecção de agentes infecciosos, drogas de abuso e medição de vários analitos importantes para a fisiologia humana. Além destes produtos voltados para a área médica, existem testes rápidos voltados para as áreas forense, ambiental e agropecuária. Enquanto que os testes inicialmente desenvolvidos apresentavam resultados qualitativos (presença ou ausência) o desenho dos testes tem sido aprimorado no sentido de fornecer resultados semi-quantitativos e até quantitativos com a implementação de leitores eletrônicos (RIDLEY, 2006).

A maioria dos testes imunocromatográficos é desenvolvida a partir de um imuno-ensaio já existente. A imunocromatografia representa uma tecnologia inovadora que concentra a reação antígeno-anticorpo em uma única fase sólida, podendo ser mantida em temperatura ambiente e utilizada diretamente no momento do atendimento ao paciente pelo agente de saúde. Além de possuir sensibilidade e especificidade elevadas, a imunocromatografia possui baixo custo, pois não exige equipamento específico para realizar o teste ou interpretar o resultado (HOLLAND; KIECHLE, 2005).

Existem vários formatos de testes imunocromatográficos e o mais utilizado é composto por uma membrana de nitrocelulose para detecção. Esta membrana é flanqueada em uma extremidade por uma zona receptora de reagente, constituída por fibra de algodão ou celulose e uma microfibra de vidro contendo o reagente cromógeno e na outra extremidade por uma zona de absorção (Figura 1). O reagente cromógeno mais utilizado é composto por nanopartículas de ouro coloidal, um reagente mais estável que reagentes fluorescentes ou enzimáticos (TANAKA et al., 2006). O reagente detector (antígeno ou anticorpo) é inserido na forma de uma linha na membrana de nitrocelulose, denominada linha teste. O alvo para o conjugado é depositado numa segunda linha paralela à linha teste e funciona como controle do reagente. Este conjunto é apoiado por um suporte e cortado em fitas com tamanho adequado para caber em cassete plástico com um receptáculo circular para aplicação da amostra e uma janela quadrada posicionada sobre a área de detecção. Os testes normalmente são lidos em 15 minutos após aplicação

de amostras que podem ser sangue total, soro, urina, saliva, ou outros líquidos corporais quando se consideram apenas as possibilidades clínicas do uso da imunocromatografia (NAKAMURA; KARUBE, 2003).

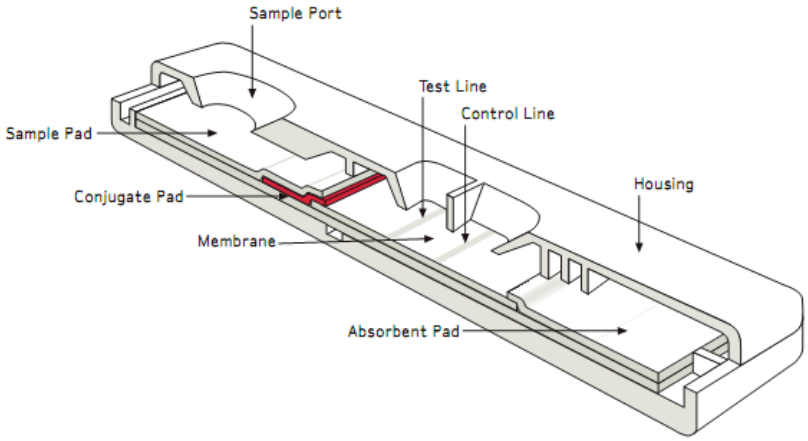


Figura 2: Compontentes de um teste imunocromatográfico. Desenho esquemático de um teste imunocromatográfico (fluxo lateral) montado em cassete plástico ("Housing") apresentando os filtros para amostra ("Sample Pad") posicionado abaixo do receptáculo da amostra ("Sample Port"), suporte do conjugado ("Conjugate Pad"), e absorvente ("Absorbant Pad"), além da membrana de nitrocelulose ("Membrane") com as linhas teste ("Test Line") e controle ("Control Line").

1.2.3. Processo de desenvolvimento de testes rápidos

O desenvolvimento de um teste rápido geralmente segue um caminho que se inicia na identificação de alvos para o diagnóstico, como antígenos ou anticorpos específicos e que possuam imunogenicidade conhecidas, escolha de reagentes e componentes do teste com o desenvolvimento de um protótipo até este ser utilizado na rotina médica. Estudos de "prova do princípio" são realizados para determinar se o teste é capaz ou não de detectar o alvo diagnóstico pretendido. O protótipo então é submetido a testagem com amostras conhecidas, chamadas "de conveniência", quando são avaliados parâmetros de sensibilidade, especificidade e valores preditivos. Posteriormente o

protótipo é submetido a avaliação com a população alvo. Os resultados destes estudos são utilizados para se obter aprovação em órgãos reguladores para que o teste possa ser comercializado. Após a aprovação e comercialização do teste, podem ser realizados estudos de aplicabilidade e implementação para demonstrar a custo-efetividade do teste (WHO & TDR, 2010).

1.2.3.1 Parâmetros de avaliação dos testes

Segundo Kettler et al. (KETTLER et al., 2004) os seguintes parâmetros de um teste em desenvolvimento devem ser avaliados:

Desempenho: A sensibilidade e especificidade, assim como valores preditivos positivos e negativos de um teste em desenvolvimento são fatores importantes a se considerar. É exigida alta sensibilidade de um teste a ser aplicado onde um diagnóstico negativo implica em sérias consequências na epidemiologia da doença ou para o paciente. Baixa especificidade importa menos nos casos em que o tratamento não traz efeitos adversos, porém é uma desvantagem séria no caso do tratamento apresentar toxicidade.

Praticidade: A complexidade e número dos procedimentos a serem realizados, assim como necessidade de processamento do material biológico a ser utilizado como amostra implicam no tempo de treinamento e supervisão.

Condições de uso e armazenamento: O teste deve ser de manuseio seguro, de fácil execução, rápido, interpretação de resultados simples e não depender de equipamentos especiais ou refrigeração. Em condições de calor e umidade elevadas a preleção por testes resistentes condicionados em pacotes individuais com sílica é uma prioridade.

Validade: Testes com validade prolongada reduzem a pressão na cadeia de fornecimento e a probabilidade de desperdício de testes. Testes com validade superior a 18 meses são recomendados para atender áreas remotas e de recursos escassos.

1.2.3.2 Conceitos para validação de testes

Como os agentes infecciosos podem compartilhar sequências antigênicas, determinado antígeno utilizado em um teste de imunodiagnóstico pode apresentar

reatividade cruzada com anticorpos induzidos por outros agentes infecciosos. A ocorrência de reações cruzadas dificulta a interpretação dos testes. Entretanto, o teste deverá apresentar sempre títulos mais elevados na presença de anticorpos específicos para o antígeno, que para anticorpos decorrentes de reatividade cruzada. Há, portanto, necessidade de se estabelecer pontos-de-corte ("*cut-off*") para cada técnica, ou seja, os títulos (ou outra medida de quantificação) a partir dos quais os resultados positivos indicam a presença de anticorpos específicos (RIEGELMAN, 2000).

Para se medir a eficiência de testes para diagnóstico rápido, são utilizados os conceitos de sensibilidade e especificidade. A sensibilidade de um teste sorológico refere-se à capacidade do teste em detectar corretamente amostras verdadeiramente positivas, ou seja, a porcentagem de resultados positivos pelo teste na população de indivíduos doentes (ALTMAN, 1991).

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\text{verdadeiros positivos}}{\text{verdadeiros positivos + falsos-negativos.}}$$

A especificidade de um teste sorológico é definida pela porcentagem de resultados negativos pelo teste nos indivíduos não doentes, ou seja, a habilidade do teste em detectar amostras verdadeiramente negativas (ALTMAN, 1991).

$$\text{Especificidade} = \frac{\text{verdadeiros negativos}}{\text{verdadeiros negativos + falsos-positivos.}}$$

O Valor Preditivo de um Resultado Positivo (VPP) pode ser calculado pela proporção de indivíduos doentes entre os resultados positivos obtidos no teste em estudo, portanto se refere à probabilidade de doença quando o resultado do teste é positivo (ALTMAN, 1991).

$$\text{Valor Preditivo Positivo} = \frac{\text{verdadeiros positivos}}{\text{verdadeiros positivos + falsos-positivos.}}$$

O Valor Preditivo de Resultado Negativo (VPN) pode ser calculado pela proporção de indivíduos não doentes entre os resultados negativos do teste em estudo, portanto se refere à probabilidade de não ocorrência de doença quando o resultado do teste é negativo (ALTMAN, 1991).

$$\text{Valor Preditivo Negativo} = \frac{\text{verdadeiros negativos}}{\text{verdadeiros negativos + falsos-negativos.}}$$

Estes parâmetros precisam ser definidos baseados na aplicação do teste. Por exemplo, testes utilizados para confirmar um diagnóstico, preferencialmente apresentam uma alta especificidade, enquanto testes com alta sensibilidade são utilizados na exclusão de um diagnóstico provável, como os utilizados em bancos de sangue. Neste estudo foi produzido um novo protótipo de teste rápido para hanseníase (ML Flow) substituindo-se o carreador do antígeno na linha teste. O novo protótipo foi avaliado utilizando os parâmetros de sensibilidade e especificidade já determinados para o teste ML Flow original.

Outra abordagem que deve ser levada em consideração no desenvolvimento de testes rápidos são as recentes evidências de interação entre a microbiota do trato gastrointestinal e o sistema imune do hospedeiro. Apesar de os microrganismos terem sido classicamente vistos como patogênicos, agora está bem estabelecido que a maioria das interações entre bactérias e o hospedeiro são de simbiose (TURNBAUGH et al., 2013). Esforços recentes para sequenciar o genoma bacteriano de toda microbiota (conhecido como microbioma) revelaram que ele contém cerca de 150 vezes o número de genes não redundantes do genoma humano (QIN et al., 2010). Dois achados sugerem que

o desenvolvimento de susceptibilidade ou resistência a determinada doença pode ter muito mais a ver com variações no microbioma que no próprio genoma humano (LEE & MAZMANIAN, 2010). A primeira é a confirmação pelo projeto do genoma humano que o DNA humano é 99.9% semelhante entre todas as pessoas (BARANZINI et al., 2010; REICH et al., 2002), e Segundo, o fato de que a concordância de surgimento de doença entre gêmeos monozigóticos é de 20–40% (BARANZINI et al., 2010).

Estudos recentes demonstrando a relação entre o microbioma e eficácia de vacinação (BJÖRKSTÉN, 2012; MATSUDA et al., 2011; RODRÍGUEZ-LECOMPTE et al., 2012; SOH et al., 2009), surgimento de doenças autoimunes como alergias, diabetes mellitus ou artrite reumatoide (BOYTON et al., 2013; CHU & MAZMANIAN, 2013; KHOSRAVI & MAZMANIAN, 2013; RIVAS et al., 2012) levam a crer que uma melhor compreensão de como a microbiota interage com a modulação do sistema imune e secreção de anticorpos naturais poderá oferecer nova abordagens para o desenvolvimento de vacinas e de ferramentas diagnósticas.

1.3. O uso da albumina bovina (BSA) na sorologia

O BSA é uma das proteínas mais bem estudadas, sua sequência completa de aminoácidos foi determinada em 1990 (HIRAYAMA et al., 1990). Estudo de Habbeb e Borella (HABEEB; BORELLA, 1966) considerou como um fator importante a presença de pontes dissulfeto e sua estrutura terciária na manutenção dos determinantes antigênicos nativos. Porém, outros estudos demonstraram que a capacidade antigênica é apenas parcialmente dependente desta estrutura terciária ou poderia ser mantida inclusive utilizando apenas pequenos fragmentos peptídicos da proteína de BSA (ATASSI et al., 1976; FERGUSON et al., 1983; KARJALAINEN et al., 1992; PETERS et al., 1977; RESTANI et al., 1995; WAHN et al., 1981).

O destino das proteínas ingeridas é, naturalmente, a digestão, porém pequenas quantidades de proteínas podem ser absorvidas pelo trato gastrointestinal intactas. A quantidade de proteínas absorvidas desta forma pode variar atingindo até 1% de toda proteína ingerida (HILGER et al., 2001). Dentre os anticorpos contra proteínas comuns da dieta, aqueles contra proteínas do leite e de ovos são os mais estudados. (HUSBY, 2000). Estudos têm demonstrado a presença de anticorpos contra o BSA no soro de indivíduos saudáveis, pacientes de doenças hepáticas, doenças auto-imunes ou Diabettes

tipo Mellitus (KARJALAINEN et al., 1992; LENKEI & GHETIE, 1977; MIHĂESCU et al., 1981; ROTHBERG & FARR, 1965; SAUKKONEN et al., 1994; SJÖWALL et al., 2011).

Alguma importância foi dada a estes anticorpos anti-BSA por se acreditar que estariam relacionados com a patogênese do Diabetes tipo Mellitus em indivíduos geneticamente predispostos (KARJALAINEN et al., 1992; SAUKKONEN et al., 1994) mas nenhuma associação significativa foi encontrada (CISLAK et al., 1998; FUCHTENBUSCH et al., 1997; IVARSSON et al., 1995; KROKOWSKI et al., 1995; OYARZUN et al., 2003; PARDINI et al., 1996; SAUKKONEN et al., 1995; YOKOTA et al., 1990). As propriedades antigênicas do BSA também foram relatadas em numerosos estudos acerca de alergias ao leite (GOLDMAN et al., 1963; GOLDMAN et al., 1963; RESTANI et al., 1995), pêlos de animais (PRAHL et al., 1978; SZÉPFALUSI et al., 1993) ou outras respostas humorais após exposição ao BSA (MACKENSEN et al., 2000; MACY et al., 1989; MORALES et al., 1994).

O BSA é um alérgeno importante presente no leite e carne de bovinos, o que significa que a exposição pode se iniciar precocemente na vida do ser humano. BSA está presente também em grande número de preparações de vacinas e medicamentos. Poucos estudos demonstraram a resposta de anticorpos após uma exposição conhecida ao BSA em humanos. Em um estudo, 6 entre 7 pacientes apresentaram anticorpos anti-BSA após administração de vacina de células dendríticas preparadas em meio de cultura contendo BSA (MACKENSEN et al., 2000). Macy et al. relataram um caso de anafilaxia e formação de IgE anti-BSA em um paciente que recebeu uma infusão de células tronco autólogas da medula óssea preparadas em BSA (MACY et al., 1989).

O uso de um agente de bloqueio na sorologia por ELISA como o BSA ou outras proteínas do leite previne a ligação de anticorpos aos microespaços presentes na superfície da microplaca que não foram cobertos pelo antígeno ou anticorpo usado na sensibilização destas. O BSA também pode ser usado na sorologia como carreador de antígenos não proteicos, como o exemplo do NT-P-BSA, empregado nos ensaios de ELISA e no teste rápido ML Flow. Portanto, a eventual presença de anticorpos anti-BSA no soro de diversos indivíduos pode interferir nos resultados da sorologia. Como descrito adiante, no ELISA padronizado para PGL-I, cada amostra é testada em um poço contendo apenas a proteína carreadora do antígeno, seja BSA ou HSA de forma que nos resultados finais as ligações eventualmente presentes contra esta porção da molécula

antigênica são descontados. Como não é possível utilizar este artifício na plataforma do ML Flow, a especificidade do teste poderia ficar prejudicada pela presença dos anticorpos anti-BSA. A especificidade dos testes sorológicos poderia ser melhorada com a substituição da albumina de soro bovino (BSA) pela albumina de soro humano (HSA) como proteína carreadora do antígeno. Em princípio, esta substituição poderia reduzir as ligações inespecíficas relacionadas à presença de anticorpos contra a BSA (HAROUN, 2005).

2 JUSTIFICATIVA

A hanseníase é uma doença crônica e potencialmente incapacitante com focos de endemia por todo o globo (WHO, 2012). O Brasil tem a segunda maior taxa de incidência do mundo, com quase 40.000 novos casos registrados anualmente (BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013; WHO, 2012) e este número permanece praticamente constante ao longo da última década (WHO, 2012). Como os casos não diagnosticados (prevalência oculta) são considerados os maiores responsáveis pela transmissão da doença, a constância do número de novos casos pode ser atribuída a uma baixa taxa de detecção ou baixa agilidade diagnóstica (Penna et al., 2008b).

Desde que a classificação de pacientes de hanseníase define o regime de tratamento empregado, erros na classificação podem levar ao risco aumentado de recidiva, devido a tratamento insuficiente de pacientes MB ou, por outro lado ao tratamento excessivo de pacientes PB com drogas que apresentam efeitos colaterais consideráveis. Como demonstrado por Goulart et al. (2002), cerca de 37% dos pacientes apresentam algum efeito colateral relacionado a PQT, e segundo Talhari & Neves (1997), praticamente todos os doentes tratados com clofazimida apresentam pele ressecada ou ictiose. Além destes, a dapsona também pode causar uma variedade de efeitos adversos como anemia hemolítica, dano hepático, nefrite, hipotiroidismo entre outros como revisado por Bucaretchi et al. (2004). Em situações nas quais o exame de baciloscopia não está disponível, profissionais de saúde tendem a diagnosticar pacientes com hanseníase como MB, numa tentativa de evitar tratamento insuficiente. Além disso, o sistema de classificação da hanseníase baseado apenas na contagem do número de lesões cutâneas com perda de sensibilidade pode levar a um sub-diagnóstico de casos de hanseníase MB. Determinar as melhores metodologias de classificação e suas limitações fornecerá mais segurança aos profissionais de saúde na tomada de decisões terapêuticas.

A presença de anticorpos anti-BSA identificada em amostras de vários grupos de indivíduos, inclusive saudáveis e a sua possível interferência em testes sorológicos gera a hipótese de melhoria do desempenho dos testes para hanseníase que empregam o BSA como carreadora de antígenos e agente de bloqueio. A substituição do BSA por uma

albumina humana (HSA) deverá melhorar especialmente a especificidade dos testes sorológicos por diminuir o número de falsos positivos devido a ligações de anticorpos contra a porção carreadora do antígeno. No contexto do controle da hanseníase, a melhora na especificidade do teste rápido *ML Flow* com HSA poderá facilitar o uso do mesmo na rotina laboratorial pelo aumento de confiabilidade nos seus resultados.

3 OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo é contribuir na classificação da hanseníase para fins de tratamento através da comparação dos critérios utilizados e melhora do teste sorológico rápido ML Flow.

Os objetivos específicos deste estudo foram:

1. Comparar diferentes métodos para classificação de pacientes de hanseníase, entre eles os procedimentos clínicos, a classificação operacional baseada na contagem de lesões de pele, o exame histopatológico de biópsia da lesão de pele, exame baciloscópico do raspado intradérmico e a sorologia pelo teste *ML Flow*;
2. Comparar o desempenho do teste *ML Flow* utilizando-se a albumina de soro humano (HSA) como proteína carreadora do antígeno em substituição à albumina de soro bovino (BSA).
3. Avaliar se pacientes de Leishmaniose visceral apresentam reatividade cruzada na sorologia PGL-I.

4 MÉTODO(S)

4.1. População de estudo

Para compor o grupo dos pacientes de hanseníase, o presente estudo utilizou amostras e banco de dados do estudo "*Clinical Trial for Uniform Multidrug Therapy regimen for leprosy patients in Brazil (U-MDT/RCT-BR)*". O ensaio clínico U-MDT/RCT-BR, registrado no www.clinicaltrials.gov (identificador NCT00669643), foi concebido, desenhado e desenvolvido pelo *Royal Tropical Institute* de Amsterdã em parceria com o Núcleo de Medicina Tropical da Universidade de Brasília (UnB), o projeto U-MDT teve parecer técnico-científico da International Federation of Anti-leprosy Association Medical Commission (Diana Lockwood, Paul Saunderson, Piet Feenstra e Ji Bahong). A coleta de amostras e classificação de pacientes foi realizada seguindo protocolos rigorosos do *National Institutes of Health* (NIH) de Boas Práticas Clínicas. O ensaio clínico U-MDT tem como objetivo verificar se todos os pacientes de hanseníase podem receber o mesmo regime terapêutico (seis meses com três fármacos - rifampicina, clofazimida e dapsona) sem comprometer a eficácia do tratamento. O estudo está em fase de seguimento dos pacientes recrutados e seus resultados poderão embasar as recomendações do Ministério da Saúde e da Organização Mundial da Saúde (OMS) em relação ao regime terapêutico empregado no tratamento da hanseníase.

Foi utilizado um total de 854 amostras de soro de pacientes de hanseníase recrutados para o ensaio clínico U-MDT entre março de 2007 e fevereiro de 2012 em dois Centros de Referência Nacionais do Ministério da Saúde (Centro de Dermatologia Sanitária Dona Libânia em Fortaleza - CE, Fundação Alfredo da Matta em Manaus - AM). Todos pacientes foram rigorosamente classificados segundo procedimentos clínicos, classificação operacional baseada na contagem de lesões de pele, exame histopatológico de biópsia da lesão de pele, exame baciloscópico do raspado intradérmico e o teste *ML Flow*. A classificação final dos pacientes, considerada padrão ouro para comparação dos demais métodos de classificação foi realizada segundo o padrão de

Ridley & Jopling (RIDLEY; JOPLING, 1966) tomando por base os dados clínicos, o exame histopatológico e baciloscópico.

Os critérios para inclusão de indivíduos no estudo U-MDT foram:

- Idade entre 5-75 anos;
- Não apresentar doença associada;

Os critérios para exclusão de indivíduos no estudo U-MDT foram:

- Não aceitar o termo livre esclarecido;
- Tratamento prévio para hanseníase;
- Abaixo de 5 anos de idade ou mais de 75 anos de idade
- Incapaz de comparecer às visitas mensais
- Associação com outras doenças, incluindo HIV/Aids e risco de vida
- Ausência de lesões hansênicas ou hanseníase neural pura
- Intolerância a drogas da MDT

O grupo controle para a avaliação da albumina humana como carreadora do antígeno incluiu amostras de regiões endêmica (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil) e não endêmica (Santiago, Chile) para hanseníase. Foram coletadas amostras de 68 indivíduos saudáveis, (profissionais de saúde do Hospital Eduardo de Menezes, Belo Horizonte – MG, policiais, doadores de sangue e voluntários da população geral, sem sintomas clínicos de doenças e sem relato de contato com pacientes de hanseníase) e 26 portadores de tuberculose, moradores de área endêmicas. A população estudada de área não endêmica de hanseníase foi constituída de 27 pacientes de tuberculose atendidos no "Servicio de Medicina Interna do Hospital Del Salvador", em Santiago do Chile (Universidad de Chile, Sede Oriente) e 30 profissionais de saúde do referido serviço, sem sintomas clínicos de doenças.

Contatos domiciliares de pacientes de hanseníase (n=182) foram recrutados entre 2009 e 2010 na cidade de Rondonópolis, Mato Grosso. A todos os indivíduos que aceitaram participar da pesquisa, foi procedida a anamnese e quando necessário foram realizados exames laboratoriais confirmatórios (baciloscopia, histopatologia e teste de Mitsuda). Os contactantes de pacientes MB incluídos foram examinados e não apresentavam sinais e sintomas clínicos de hanseníase (HUNGRIA et al., 2012).

Foram inclusas ainda 503 amostras de pacientes de Leishmaniose Visceral (LV), dos quais 470 apresentavam diagnóstico claro de LV e 33 foram submetidos a prova terapêutica que confirmou o diagnóstico de LV. Estes pacientes foram recrutados no Rio Grande do Norte no período de 2010 a 2013.

As amostras de sangue coletadas por venopunção foram centrifugadas a 4000 rotações por minuto (rpm) por 3 minutos, aliquotadas em tubos e armazenadas em freezer -20ºC. Amostras de sangue foram manuseadas de acordo com as normas de biossegurança e os materiais utilizados foram devidamente descartados conforme as normas da Vigilância Sanitária (SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA CLÍNICA, 2005; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2004).

4.2. Exame histopatológico

As lesões de pele de pacientes com hanseníase PB e MB foram biopsiadas com "punch" descartável de 5,0mm. Os fragmentos de tecidos coletados foram fixados em formol tamponado a 10%, processados em 24 horas para corte em parafina e corados pela hematoxilina-eosina (HE) e Wade. As avaliações histopatológicas foram realizadas por patologista com experiência em dermatopatologia e diagnóstico da hanseníase após ter participado de *workshop* de padronização dos resultados. Os seguintes parâmetros foram observados nas avaliações histopatológicas: presença de granulomas, agressão neural, bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) na lesão, vasculite na derme e/ou hipoderme, paniculite, infiltrado celular, estratificação e espessamento de tecidos. Os pacientes foram classificados histopatologicamente segundo critérios de Ridley & Jopling seguindo rigorosamente o protocolo do ensaio clínico *U-MDT/RCT-BR* para homogeneização de descrição e interpretação de resultados.

4.3. Exame Baciloscópico

A presença de BAAR foi pesquisada em raspados intradérmicos de pacientes PB e MB, colhidos em quatro locais (cotovelos, lóbulos e lesões cutâneas em atividade) e corados pelo método de Ziehl-Nielsen. O índice baciloscópico (IB) foi calculado pela média de BAAR íntegros encontrados no raspado.

4.4. Teste de ELISA para detecção de anticorpos anti PGL-I no soro

Teste de ELISA para detecção de anticorpos IgM contra o PGL-I do *M. leprae* foi realizada como descrito anteriormente (BRETT et al., 1986) usando NT-P-BSA ou NT-P-HSA como análogo sintético do PGL-I. O antígeno foi diluído com base na sua concentração de açúcar (0,01 μg de açúcar/ml) em tampão volátil de acetato de amônia carbonado (pH 8.2). Placas para ELISA (Nunc Maxisorp) foram sensibilizadas e deixadas para secar em temperatura ambiente. BSA ou HSA foram usados como controle na sensibilização das placas. Antes da utilização das placas, os sítios não sensibilizados pelo antígeno foram bloqueados por incubação de 60 minutos com solução de PBS 1% (m/v) BSA. Após quatro lavagens com PBS 0,1% (v/v) Tween-20 (PBST), adicionou-se soro diluído 1:300 em PBST contendo 10% (v/v) soro normal de cabra (NGS). As placas foram incubadas a 37^{o}C por 60 minutos, seguido por outro passo de lavagem. Conjugado anti IgM humana ligada a peroxidase (Capple) foi adicionado diluído a 1:2000 em PBST-10% NGS. Após incubação a 37^{o}C por 60 minutos, o procedimento de lavagem foi repetido e o substrato tetrametilbenzidina (TMB) líquido (Sigma) foi adicionado a cada poço. Visando controlar a variação intra teste, um soro de referência foi incluído em quadruplicata em cada placa. A reação foi interrompida adicionando-se H_2SO_4 quando a densidade óptica (OD) do soro de referência atingia um valor de 0.6 a 450 nm. Todas as amostras de soro foram testadas em duplicata e os resultados de ELISA foram expressos como a média de absorbância das duplicatas. Para garantir a especificidade das ligações, o valor final de OD foi calculado subtraindo do valor de OD de cada soro frente ao PGL-I a média dos valores de OD obtidos para cada amostra nos poços sensibilizados com BSA ou HSA, considerados ligações inespecíficas (BUHRER-SEKULA et al., 1998).

4.5. Teste sorológico *ML Flow*

O *ML Flow* é composto por uma fita de nitrocelulose para detecção de anticorpos. Esta fita é flanqueada em uma extremidade por uma zona receptora de amostra constituída por fibra de celulose e uma fita de microfibra de vidro contendo o anticorpo anti-IgM humana marcado com ouro coloidal e na outra extremidade por uma zona de absorção. Toda composição é apoiada por um suporte e cortada em fitas de 5 mm de largura abrigadas em cassete plástico.

Além do teste original contendo NT-P-BSA como antígeno detector, o presente estudo padronizou a produção de um protótipo do teste ML Flow contendo o antígeno NT-P-HSA. O protocolo de execução dos testes é idêntico para ambos antígenos. Em resumo, amostras de soro na quantidade de 5 µl são adicionadas com 130 µl de solução tamponante. A leitura dos resultados é realizada visualmente após dez minutos. O teste *ML Flow* só é válido se houver coloração da linha controle. A linha teste deverá corar quando o teste for positivo, o que revela a presença dos anticorpos IgM específicos para o PGL-I do *M. leprae* na amostra testada (BUHRER-SEKULA et al., 2003). O resultado negativo é indicado pela ausência de uma linha na faixa do teste e a presença de uma linha na faixa de controle. Se houver a presença de uma linha tênue na faixa de teste, o resultado é considerado negativo, já que o objetivo do teste é detectar indivíduos com carga bacilar relativamente alta (BUHRER-SEKULA et al., 2003).

4.6. Avaliação estatística

Os dados coletados serão analisados e interpretados utilizando os softwares SPSS versão 21 e EpiInfo versão 6. O teste Kappa foi empregado para analisar a concordância entre os resultados individuais dos testes estudados assim como a aplicação de antígenos combinados. O teste Kappa é um coeficiente de concordância que corrige o erro devido ao acaso. O coeficiente de Kappa pode variar de 0 (discordância completa) a 1 (concordância completa). Utilizamos neste estudo, a escala de Landis onde a concordância é classificada como: pobre (abaixo de 0), discreta (0-0,2), fraca (0,21-0,4), moderada (de 0,41-0,6), substancial (0,61-0,8), quase perfeita (0,81-1) (LANDIS; KOCH, 1977).

O teste de Mann-Whitney foi aplicado para comparação das medianas entre dois grupos. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando os valores de p foram menores 0,05.

4.7. Aspectos éticos

O estudo não entra em conflito com os aspectos éticos. Todos os procedimentos envolvendo seres humanos satisfazem as regras locais. O projeto U-MDT/RCT-BR responsável pelo recrutamento de pacientes e coleta das amostras foi aprovado pelos

comitês de ética das instituições participantes e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). O presente estudo foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana e Animal do Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Goiânia (CEMHA/HC/UFG) (Protocolo 166/2011). Os indivíduos que autorizaram a coleta de amostras assinaram termo de consentimento livre e esclarecido que autorizava o uso do material biológico para pesquisas futuras não sendo expostos a nenhum perigo ou riscos aumentados como resultado do estudo.

O uso de amostras armazenadas por pesquisa prévia atende as exigências da Resolução Nº 347 do Conselho Nacional de Saúde, em particular o disposto no item 1.3. "Toda nova pesquisa a ser feita com o material será submetida para aprovação do CEP da instituição e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa-CONEP"; e no item 4. "No caso de pesquisa envolvendo mais de uma instituição, deve haver acordo - formal - entre as instituições participantes, contemplando formas de operacionalização e de utilização do material armazenado".

5 ARTIGOS

5.1. Artigo 1 – Título: Brazil U-MDT Randomized Clinical Trial: Comparison of methods for leprosy classification.

Autores: Rodrigo Scaliante De Moura, Gerson Oliveira Penna, Ludimila Paula Vaz Cardoso, Maria Araci De Andrade Pontes, Rossilene Cruz, Heitor De Sá Gonçalves, Maria Lúcia Fernandes Penna, Mariane Martins De Araújo Stefani; Samira Buhrer-Sékula

Revista: Submetido a *American Tropical Medicine And Hygiene Journal*.

Title: Comparison of methods for leprosy classification: Brazil U-MDT Randomized Clinical Trial

Rodrigo Scaliante De Moura, Gerson Oliveira Penna, Ludimila Paula Vaz Cardoso, Maria Araci De Andrade Pontes, Rossilene Cruz, Heitor De Sá Gonçalves, Maria Lúcia Fernandes Penna, Mariane Martins De Araújo Stefani; Samira Bührer-Sékula

Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil; Núcleo de Medicina Tropical, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brasil; Centro de Dermatologia Dona Libânia, Fortaleza, Ceará, Brasil; Fundação de Dermatologia Tropical e Venereologia Alfredo da Matta, Manaus, Amazonas, Brasil; Departamento de Epidemiologia e Bioestatística, Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

Abstract. The present study used the "*Clinical Trial for Uniform Multidrug Therapy regimen for leprosy patients in Brazil (U-MDT/RCT-BR)*" database to compare available tools to classify MB and PB leprosy patients. A total of 854 newly diagnosed, previously untreated leprosy patients were included. All patients were classified by R&J criteria taking into account clinical data and slit skin smear results. ML Flow rapid tests were also performed. Slit skin smears presented the higher agreement with R&J final classification, followed by ML Flow tests and WHO classification. Using the WHO classification alone lead to 0.8% (4/486) of MB leprosy patients receiving insufficient treatment, nevertheless 54.4% (187/344) of PB patients would be over-treated. In this study population, most BB, BL and LL cases had more than 10 lesions. Our study reinforces the importance of using the slit skin smears in referral centers to avoid misclassification of MB/PB leprosy cases.

INTRODUCTION

Leprosy is a chronic and curable infectious disease which affects mainly skin and peripheral nerves, presenting a spectrum of clinical manifestations associated with different immune responses to *Mycobacterium leprae*. Due to this broad spectrum of clinical manifestations, leprosy classification is complex and may include clinical,

histophatological, microbiological and immunological features as proposed by Ridley & Jopling (R&J). In one extreme of the spectrum is the polar tuberculoid leprosy form (TT) with low bacterial load, predominant cell mediated immunity (CMI) and low or absent production of specific antibodies. The polar lepromatous form (LL) is in the other extreme, in which, patients show high bacterial load and respond to infection with high production of antibodies and lower or absent *M. leprae*-specific CMI. Between the polar forms lye immunological and clinical unstable forms: borderline-tuberculoid (BT), borderline-borderline (BB) and borderline-lepromatous (BL)[1]. The first clinical manifestations of leprosy, known as indeterminate leprosy may be hardly noticed by patients or even by healthcare workers, and they can evolve to the tuberculoid or lepromatous pole[2].

For operational purposes, the World Health Organization (WHO) proposed in the late 90`s, a simplified leprosy classification system based on the number of skin lesions. Patients showing up to five skin lesions are considered paucibacillary (PB) and are treated with 6 monthly supervised doses of rifampicin and dapsone. Patients with 6 or more skin lesions are considered multibacillary (MB) and are prescribed with 12 monthly supervised doses of rifampicin, clofazimine and dapsone and daily self-administered doses of clofazimine and dapsone[3]. This leprosy classification methodology, based on counting skin lesions with sensitivity loss, can lead to under diagnosis of MB leprosy cases[4]. In situations where slit skin smears are not available, healthcare workers tend to over diagnose MB leprosy in an attempt to avoid insufficient treatment[5]. A study performed in Nigeria showed that among 96% of patients receiving MB treatment, 19% would be classified as MB leprosy cases if WHO classification criteria was correctly applied[6].

Several studies have shown that the bacterial load of a leprosy patient correlates with the presence of IgM antibodies to *M. leprae* specific phenolic glycolipid-I (PGL-I): 15–40% of PB patients are seropositive, compared with 80–100% of MB patients[7–14]. Detection of anti PGL-I antibodies may thus be a useful adjunct method for discriminating PB and MB leprosy[12,15]. The validity of any test criterion to classify MB and PB leprosy for treatment purposes must take into consideration its sensitivity or its capacity to correctly identify the true MB positive patients and true PB negative patients. By moving towards leprosy elimination era, misclassification of MB cases is of concern

as these cases may relapse, due to inadequate treatment and represent a reservoir of infection in areas of low endemicity[16].

Serological tests performed at the point of care are user-friendly and can be used at the moment of diagnosis, with no need of displacement to a specialized lab and do not require patients return to get results. Moreover, classifying correctly patients as MB and PB leprosy patients is important since they present different risks for leprosy reactions, nerve impairment, relapse or handicaps[17].

The present study took advantage of the "*Clinical Trial for Uniform Multidrug Therapy regimen for leprosy patients in Brazil (U-MDT/RCT-BR)*" database to compare and discuss available tools to classify MB and PB leprosy patients: serological tests, bacterial load, counting of skin lesions and the R&J classification. The U-MDT/RCT-BR is a randomized, open-label clinical trial to evaluate if the effectiveness of a uniform multidrug therapy, based on six months of MB-MDT regimen, with three drugs, for leprosy equals the regular regimen, to determine the acceptability of the U-MDT regimen and to identify prognostic factors for reactions and relapses.

METHODS

Study groups. The study population included 859 newly diagnosed, previously untreated PB and MB leprosy patients. Patients were recruited from March 2007 until February 2012 at two national leprosy referral centres from two Brazilian states: "Centro Dermatológico Dona Libânia" (Fortaleza, Ceará State northeast Brazil) and "Fundação Alfredo da Matta" (Manaus, Amazonas State north Brazil), according to the rationale and design of the study[18]. In short, the number of lesions was registered at diagnosis and patients were prescribed with specific treatment according to WHO classification criteria. The exact number of skin lesions was registered up to ten lesions and, those with numerous lesions or presenting diffuse infiltration were reported as having more than 10 lesions. In addition, slit skin smears were taken providing the identification of patients with a high bacteriological index (BI). A point of care test, the ML Flow test, was used to detect anti-*M.leprae* PGL-I antibodies[15,19]. Punch biopsies were taken for histopathological analysis. Clinical data and slit skin smear results were taken into consideration for the final R&J classification, used as the gold standard for data analyses. Five patients were excluded from the analysis since serology results were not available.

R&J criteria[1] was used to classify patients for analysis. Patients classified as TT and BT were grouped as PB, and BB, BL and LL patients were grouped as MB; 24 indeterminate patients were not included in this analysis.

Statistical analyses. Descriptive analyses of clinical and epidemiological variables and their frequencies were performed. The agreement between results of different classification methods was calculated by cross-tabulation and results were expressed as percentage with the graduated kappa index (κ): low (0-0.5), moderate (0.51-0.75) and excellent (0.76-1.0)[20]. The sensitivity (capacity to correctly detect MB cases among leprosy patients), the specificity (ability to correctly exclude PB patients), and positive and negative predictive values (PPV and NPV) were calculated and the corresponding Receiver Operating Characteristic (ROC) curves were plotted to assess the performance of each method to correctly classify leprosy patients compared to the R&J classification. Data analysis was performed with SPSS version 21.

Ethical Aspects. The U-MDT/RCT-BR study was designed under the international (Helsinki) and Brazilian research regulations and was approved by three regional ethical committees from all the states involved and by the National Ethics Commission of Research (CONEP) of the National Health Council (CNS) Ministry of Health (MS) (protocol 12949, approval 631/2006). All individuals enrolled had signed the informed consent and were not exposed to any risk or danger as a result of the study. For patients under the age of 18 years, the informed consent was signed by one of the parents or by the legal guardian.

RESULTS

Main characteristics of enrolled leprosy patients. The characteristics of the study population are summarized in Table 1. The total number of included participants was 830 leprosy patients, of which 660 (79.5%) were from Ceará State ("Dona Libânia" reference center) and 170 (20.5%) were from Amazonas State (Alfredo da Matta reference center). The median age of participants was 40 years (range 6-75 years) and 60.2% (500/830) were male.

Table 01 – Characteristics of study population

	Brazilian cities		Total
	Fortaleza	Manaus	
	N 660	N 170	N (%) 830 (100)
Age (years) Median (range)	41 (7-75)	35 (6-68)	40 (6-75)
Gender			
Male	385	115	500 (60.2%)
Female	275	55	330 (39.8%)
Operational Classification			
MB	551	118	669 (78.8%)
PB	109	52	161 (21.2%)
Slit Skin Smear			
Positive	400	91	491 (59.2%)
Negative	260	79	339 (40.8%)
R&J Classification			
TT	31	18	49 (5.9%)
BT	239	56	295 (35.5%)
BB	145	13	158 (19.0%)
BL	146	43	189 (22.8%)
LL	99	40	139 (16.7%)
ML Flow test			
Positive	421	104	525 (63.3%)
Negative	239	66	305 (36.7%)

MB – Multibacillary leprosy patients
PB – Paucibacillary leprosy patients
TT –Tuberculoid
BT – Borderline tuberculoid
BB - Borderline Borderline
BL – Borderline lepromatous
LL –Lepromatous

Based on the number of skin lesions 78.8% (669/830) of patients were considered MB leprosy, and 21.2% (161/830) were classified as PB leprosy patients. Among MB cases, 398 (46.6%) patients presented 11 or more lesions and 118 (13.8%) presented diffuse infiltration. Based on R&J classification 52.2% (486/830) of patients were merged as MB group (BB, BL and LL forms) and, 41.4% (344/830) were merged as PB group (BT and TT).

Performance of different methods of classification compared to R&J classification. Clinical and laboratory features of patients were compared to the R&J classification (Table 2). Serological method, counting of skin lesions and slit skin smears showed a

positive correlation with the spectrum of the disease. A gradual increase in number of skin lesions, and antibodies production along with slit skin smears positivity was observed towards the MB pole. In the BT group, 63.4% presented 6 or more skin lesions while 10.5% had positive BI and 32.5% had positive ML Flow tests.

Table 02. Clinical and laboratorial features according to R&J classification of leprosy patients

R&J Classification	**Number of lesions (mean/st.dev.)**	**> 6 lesions** N (%)	**Slit Skin Smear** N pos (%)	**ML Flow** N pos(%)
TT	1.2 (0.49)	0 (0)	0 (0)	5 (10.2)
BT	6.3 (3.78)	187 (63.4)	31 (10.5)	96 (32.5)
BB	9.9 (1.99)	154 (97.5)	134 (84.8)	125 (79.1)
BL	10.8 (0.80)	189 (100)	187 (98.9)	172 (91.0)
LL	10.8 (0.80)	139 (100)	139 (100)	127 (91.4)

TT –Tuberculoid
BT – Borderline tuberculoid
BB - Borderline Borderline
BL – Borderline lepromatous
LL –Lepromatous

Taking the R&J classification as MB and PB (Table 3), ML Flow tests correctly allocated 70% of patients in the PB group, and 87% of patients in the MB group. The classification based on counting of skin lesions correctly allocated 46% and 99% of PB and MB leprosy cases, respectively. Slit skin smears correctly classified 91% and 97% of PB and MB patients, respectively.

Table 03. Positivity to different classification methods according to R&J classification.

		R&J Classification*	
		PB	**MB**
ML Flow test	Negative	243 (70%)	62 (13%)
	Positive	101 (30%)	424 (87%)
Operational Classification	PB	157 (46%)	4 (1%)
	MB	187 (54%)	482 (99%)
Bacterial Index	Negative	313 (91%)	26 (5%)
	Positive	31 (9%)	460 (95%)

*TT and BT patients were grouped as PB and BB, BL and LL patients were grouped as MB. Indeterminate leprosy patients were excluded.

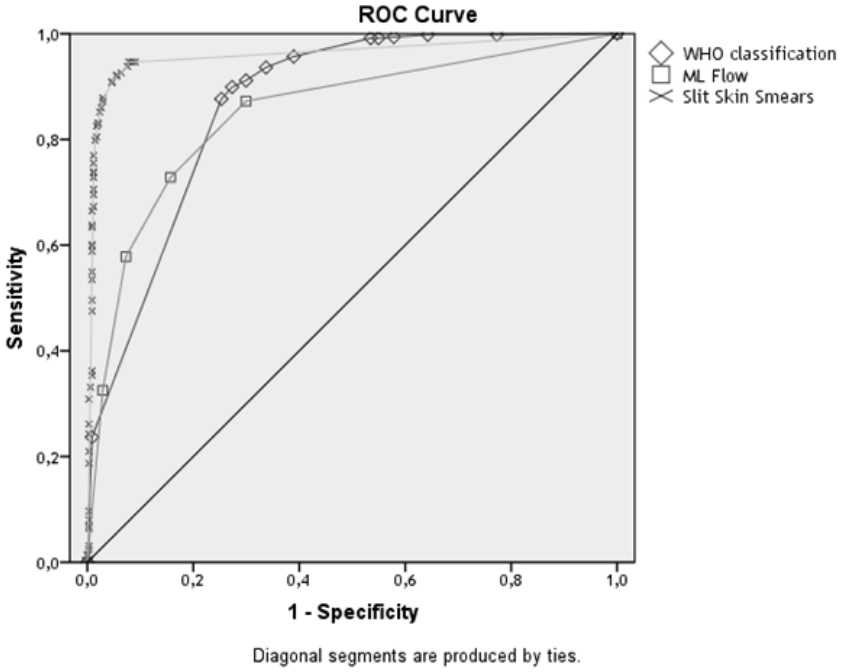
Slit skin smear results showed the highest area under the curve (AUC) followed by the ML Flow test and by the number of skin lesions (Figure 1). The WHO classification criteria showed the highest sensitivity to detect MB cases but the lowest specificity among PB patients, which lowered the PPV of this criteria. All performance parameters are presented in Table 4. The ROC curve shows a sensitivity of 99.2% and specificity of 46.5% when using the cut-off of 5 lesions as WHO recommendation. The best performance of WHO classification criteria to discriminate MB and PB leprosy was for the threshold of 10 lesions with a sensitivity of 87.7% and specificity of 74.7%.

Table 04. Performance parameters for classification methods compared to the R&J classification

	ML Flow	WHO classification	Bacterial Index
Sensitivity	87.2	99.2	94.7
Specificity	70.6	45.7	91.0
PPV	80.8	72.0	93.7
NPV	79.7	97.5	92.3
LR+	2.97	1.82	10.5
LR-	0.18	0.02	0.06

PPV: Positive Predictive Value
NPV: Negative Predictive Value
LR+: Positive Likelihood Ratio
LR-: Negative Likelihood Ratio

a



b

Cut-off (N lesions)	Sens. (%)	Spec. (%)
1	99.8	22.7
2	99.8	35.8
3	99.4	42.2
4	99.2	45.1
5	**99.2**	**46.5**
6	95.7	61.0
7	93.6	66.3
8	91.2	70.1
9	89.9	72.7
10	87.7	74.7

c

Classification Methodology	AUC*	Std. Error[a]	95% Confidence Interval	
			Lower	Upper
Slit Skin Smears	0,960	0,007	0,946	0,975
ML Flow	0,849	0,014	0,823	0,876
WHO Classification	0,843	0,015	0,812	0,873

*Area Under the Curve.
Std. Error: Standart Error

Figure 1. ROC curve for all classification methods evaluated. In a. Plotted ROC curve for WHO classification criteria (blue), Slit Skin smears (green) and ML Flow test (yellow). In b. parameters of sensibility of specificity for different cut-off values for WHO classification criteria. And in c. Area under the curve and standard error for all classification methods.

DISCUSSION

Since the classification of leprosy patients into MB and PB determines the duration and the drugs used in their treatment, misclassification might lead to increased risk of relapse due to insufficient treatment of MB patients or overtreatment of PB patients with drugs that potentially present severe side effects. The R&J classification of well characterized patients enrolled in the uniform therapy regimen randomized clinical trial (U-MDT/RCT-BR) was compared with the WHO operational classification criteria, slit skin smears and serological tests aiming to assess the most accurate method for classification of leprosy patients.

It was observed that slit skin smears results, serological tests and the WHO classification criteria are consistent with the R&J classification. The bacillary load, number of skin lesions and humoral immune response are directly correlated as they gradually increase towards the LL pole of the spectrum. Similar results were observed by others[6–8,13,19,21–29]. As slit skin smears results are taken into account in the R&J classification, it obviously presented a higher performance as shown by the ROC curve. In terms of AUC, the slit skin smears BI (AUC = 0.946–0.975) outperforms the ML Flow test (AUC = 0.823–0.876), and the WHO classification criteria (AUC = 0.812–0.873), which showed the lowest agreement.

There are benefits and limitations in using clinical criteria for classification of leprosy. While it is easy and simple to apply in the field by general health workers, there is always the risk of a certain proportion of patients being either under/over treated. Our results show that using the WHO classification criteria alone 0.8% (4/486) of MB leprosy patients would receive insufficient treatment but still 54.4% (187/344) of PB patients would be over-treated. Several studies[30,31] (Hagges D and others, unpublished data) have evaluated the WHO operational classification criteria based on counting of skin lesions and found among the MB patients between 7.2%, - 11.4%, of patients, would be under-treated and from 13.4% - 37.7% of PB patients would be over-treated.

In this study population, most of BB, BL or LL cases had more than 10 skin lesions. These results are not in agreement with findings from India by Gupta et al[16] in which a cut-off of three skin lesions was ideal to separate PB from MB patients. The PPV and negative predictive (NPV) values depend on the sensitivity and specificity of the test (test accuracy) and also depend on the real size of each group to be classified, thus the ideal cut-off may change in distinct scenarios. In a study in Nigeria, it was difficult to implement the use of number of skin lesions since health workers tend to over-classify

patients, in this country, where 96% of patients were being treated as MB, only 19% would be classified as MB leprosy cases if WHO classification criteria was correctly applied[6]. We need to consider the introduction of a bias when comparing the percentage of over-treated PB patients because the clinical trial favored the recruitment of MB patients since they have a higher risk of relapses.

All the approaches investigated herein had limitations, actions that improve sensitivity of rapid tests such as the evaluation of new antigens or newer technologies in test compositions should carefully be evaluated before any of these tests are implemented as auxiliary tools for classification of leprosy patients. Since the risk of relapse is mostly related to MB leprosy cases, higher priority should be given to improve sensitivity of MB cases detection instead of specificity, i.e. the capability to correctly classify PB patients [5]. In this context, the WHO classification fulfills this criteria as it showed a high sensibility (99%) to detect MB cases with a low specificity (46%) compared to 87% and 70% of ML Flow sensibility and specificity, respectively.

In conclusion, our study shows that among the laboratory methods employed in reference centers to classify MB and PB leprosy patients, the slit skin smears presented the highest sensitivity and specificity. We therefore reinforce the importance of using at least the slit skin smears in referral centers or hospitals to avoid misdiagnosis, misclassification and under/over treatment of leprosy cases.

Acknowledgements: We thank all patients for donating their blood and information for these studies and all medical staff involved in sample and data collection.

Financial support: R.S. Moura is beneficiated by a financial support from CNPq (Process #152678/2011-5) and L.P.V. Cardoso was supported by a fellowship from CAPES (Process #02479/09-5). U-MDT Leprosy clinical trial – Brazil was funded by the Department of Science and Technology (DECIT) of Brazilian Ministry of Health and the Brazilian Council for Research (CNPq process # 40.3293/2005-7). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The NT-P-BSA used for the production of the ML Flow tests was kindly provided by Dr. Fujiwara, Institute for Natural Science, Nara University, Nara, Japan.

Authors addresses: Rodrigo Scaliante De Moura, Ludimila Paula Vaz Cardoso, Mariane Martins De Araújo Stefani and Samira Bührer-Sékula, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Departamento de Imunologia, sala 335. Rua 235 s/n Setor Leste

Universitário Goiânia – GO, Brazil CEP 74605-050. Gerson Oliveira Penna, Universidade de Brasília, Núcleo de Medicina Tropical, Campus Universitário Darci Ribeiro, Brasília – DF, CEP 70919-970, Maria Araci De Andrade Pontes and Heitor De Sá Gonçalves, Centro de Referência Nacional Dona Libânia – CDERM, Rua Pedro I, no 1033, Centro, Fortaleza – CE, CEP 60101-035, Rossilene Cruz, Centro de Referência Nacional Alfredo da Matta – FUAM, Av. Codajás, n. 24, Cachoeirinha, Manaus – AM, CEP 69065-130, Maria Lúcia Fernandes Penna, Universidade Federal Fluminense, Centro de Ciências Médicas, Instituto de Saúde da Comunidade. Rua Marques do Paraná, 303 Centro, Niteroi, RJ – CEP 24033-900.

REFERENCES

1. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1966;34(3):255–73.

2. Jopling WH. Indeterminate leprosy. *Proc R Soc Med*. 1959;52(5):370–1.

3. WHO. Drugs used in leprosy. 1998:-.

4. ILA. Report of the International Leprosy Association Technical Forum. Paris, France, 22-28 February 2002 -The Diagnosis and Classification of Leprosy. *IntJLeprOther MycobactDis*. 2002;70(1 Suppl):S23–31.

5. Van Brakel WH, de Soldenhoff R, McDougall AC. The allocation of leprosy patients into paucibacillary and multibacillary groups for multidrug therapy, taking into account the number of body areas affected by skin, or skin and nerve lesions. *Lepr Rev*. 1992;63(3):231–46.

6. Bührer-Sékula S, Visschedijk J, Grossi MAF, Dhakal KP, Namadi AU, Klatser PR, Oskam L. The ML flow test as a point of care test for leprosy control programmes: potential effects on classification of leprosy patients. *Lepr Rev*. 2007;78(1):70–9.

7. Buhrer-Sekula S, Smits HL, Gussenhoven GC, van Ingen CW, Klatser PR, Bührer S. A simple dipstick assay for the detection of antibodies to phenolic glycolipid-I of Mycobacterium leprae. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 1998;58(2):133–136.

8. Bührer-Sékula S, Cunha MG, Foss NT, Oskam L, Faber WR, Klatser PR. Dipstick assay to identify leprosy patients who have an increased risk of relapse. *Trop Med Int Health*. 2001;6(4):317–23.

9. Chanteau S, Cartel JL, Celerier P, Plichart R, Desforges S, Roux J. PGL-I antigen and antibody detection in leprosy patients: evolution under chemotherapy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1989;57(4):735–43.

10. Hussain R, Jamil S, Kifayet A, Firdausi F, Dockrell HM, Lucas S, Hasan R. Quantitation of IgM antibodies to the M. leprae synthetic disaccharide can predict early bacterial multiplication in leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1990;58(3):491–502.

11. Klatser PR, Cho SN, Brennan PJ. The contribution of serological tests to leprosy control. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1996;64(4 Suppl):S63–6; discussion S66–7.

12. Moura RS, Calado KL, Oliveira ML, Buhrer-Sekula S. Leprosy serology using PGL-I: a systematic review. *RevSocBrasMedTrop*. 2008;41 Suppl 2:11–18.

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

14. Petchclai B, Khupulsup K, Hiranras S, Sampatavanich S, Sampoonachot P, Leelarusamee A. A passive hemagglutination test for leprosy using a synthetic disaccharide antigen. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1988;56(2):255–8.

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

16. Gupta R, Kar HK, Bharadwaj M. Revalidation of various clinical criteria for the classification of leprosy--a clinic-pathological study. *Lepr Rev*. 83(4):354–362.

17. Britton WJ, Lockwood DN. Leprosy. *Lancet*. 363(9416):1209–1219.

18. Penna GO, Pontes MA, Cruz R, Goncalves HS, Penna ML, Buhrer-Sekula S. A clinical trial for uniform multidrug therapy for leprosy patients in Brazil: rationale and design. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 107 Suppl :22–27.

19. Buhrer-Sekula S, Smits HL, Gussenhoven GC, van Leeuwen J, Amador S, Fujiwara T, Klatser PR, Oskam L, Bührer-Sékula S. Simple and fast lateral flow test for classification of leprosy patients and identification of contacts with high risk of developing leprosy. *J Clin Microbiol*. 2003;41(5):1991–1995.

20. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977;33(1):159–74.

21. Chanteau S, Plichart R, Boutin JP, Roux J, Cartel JL. Finger-prick blood collection and computer-assisted enzyme-linked immunosorbent assay for large-scale serological studies on leprosy. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1989;83(3):414–6.

22. Buhrer-Sekula S, Sarno EN, Oskam L, Koop S, Wichers I, Nery JA, Vieira LM, de Matos HJ, Faber WR, Klatser PR. Use of ML dipstick as a tool to classify leprosy patients. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 2000;68(4):456–63.

23. Cho SN, Cellona R V, Villahermosa LG, Fajardo TT, Balagon M V, Abalos RM, Tan E V, Walsh GP, Kim JD, Brennan PJ. Detection of phenolic glycolipid I of Mycobacterium leprae in sera from leprosy patients before and after start of multidrug therapy. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2001;8(1):138–42.

24. Groenen G, Pattyn SR, Ghys P, Tshilumba K, Kuykens L, Colston MJ. A longitudinal study of the incidence of leprosy in a hyperendemic area in Zaire, with special reference to PGL-antibody results. The Yalisombo Study Group. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1990;58(4):641–50.

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

26. Schuring RP, Moet FJ, Pahan D, Richardus JH, Oskam L. Association between anti-pGL-I IgM and clinical and demographic parameters in leprosy. *Lepr Rev*. 2006;77(4):343–55.

27. Stefani MM de A, Grassi AB, Sampaio LH, Sousa ALOM de, Costa MB, Scheelbeek P, Neupane KD, Hagge DA, Macdonald M, Cho S-N, Oskam L, Bührer-Sékula S. Comparison of two rapid tests for anti-phenolic glycolipid-I serology in Brazil and Nepal. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012;107 Suppl :124–31.

28. Sulçebe G, Nakuçi M. Anti-phenolic glycolipid 1 IgM antibodies in leprosy patients and in their household contacts. *Lepr Rev*. 1990;61(4):341–6.

29. Cavalcanti AAL, Lucena-Silva N, Montarroyos UR, Albuquerque PMCC de. Concordance between expected and observed bacilloscopy results of clinical forms of leprosy: a 6-year retrospective study in Recife, State of Pernambuco, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2012;45(5):616–9.

30. Santos VS, de Mendonça Neto PT, Falcão Raposo OF, Fakhouri R, Reis FP, Feitosa VLC. Evaluation of agreement between clinical and histopathological data for classifying leprosy. *Int J Infect Dis*. 2013;17(3):e189–92.

31. Norman G, Joseph G, Richard J. Validity of the WHO operational classification and value of other clinical signs in the classification of leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 2004;72(3):278–83.

5.2. Artigo 2 – Título: Evaluation of a rapid serological test for leprosy classification using human serum albumin as the antigen carrier.

Autores: Rodrigo Scaliante de Moura, Gerson Oliveira Penna, Tsuyoshi Fujiwara, Maria Araci de Andrade Pontes, RossileneCruz, Heitor de Sá Gonçalves, Maria Lúcia Fernandes Penna, Mariane Martins de Araújo Stefani, Samira Buhrer-Sékula

Revista: A ser submetido a Journal of Immunological Methods

EVALUATION OF A RAPID SEROLOGICAL TEST FOR LEPROSY CLASSIFICATION USING HUMAN SERUM ALBUMIN AS THE ANTIGEN CARRIER

Rodrigo Scaliante de Moura[a], Gerson Oliveira Penna[b], Tsuyoshi Fujiwara[c], Maria Araci de Andrade Pontes[d], Rossilene Cruz[e], Heitor de Sá Gonçalves[d], Maria Lúcia Fernandes Penna[f], Mariane Martins de Araújo Stefani[a], Samira Buhrer-Sékula[a]

[a]Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil, [b]Núcleo de Medicina Tropical, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil, [c]Institute for Natural Science Nara University, Nara, Japan, [d]Centro de Dermatologia Dona Libânia, Fortaleza, CE, Brasil, [e]Fundação de Dermatologia Tropical e Venereologia Alfredo da Matta, Manaus, AM, Brasil, [f]Departamento de Epidemiologia e Bioestatística, Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

corresponding author: Rodrigo Scaliante de Moura
e-mail: rodrigoscaliant@gmail.com
Phone: +55 62 3209-6111
Postal Address:
Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
Departamento de Imunologia, sala 335.
Rua 235 s/n Setor Leste Universitário
Goiânia – GO, Brasil
CEP 74605-050.

Abbreviations:

BSA, Bovine Serum Albumin; HAS, Human Serum Albumin; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; MB, Multibacillary leprosy patient; PB, Paucibacillary leprosy patient; PGL-I, Phenolic Glycolipid I; TT, Tuberculoid leprosy patients; BT, Borderline Tuberculoid leprosy patients; BB, Borderline borderline leprosy patients; BL, Borderline Lepromatous leprosy patients; LL, Lepromatous leprosy patients; EA HC, Endemic area healthy controls; EA TB, Endemic area Tuberculosis patients; HHC, Household contacts of leprosy patients; NEA HC, Non - endemic area healthy controls; NEA TB, Non - endemic area Tuberculosis patients; PPV, Positivity Predictive Value; NPV, Negative Predictive Value.

Abstract

The presence of anti-BSA antibodies may interfere in serological tests, as ELISA or immunochromatographic assays. BSA is frequently used as a blocking agent or as "inert" carrier of antigens, such as the NT-P-BSA, the semi-synthetic analogue of the PGL-I, antigen from the cell wall of the *Mycobacterium leprae*. The same antigen was prepared and linked to human serum albumin based in the hypothesis that replacing BSA by a human protein carrier would enhance the leprosy serological tests performance. A total of 1162 samples were tested in ELISA and in the ML Flow rapid test using NT-P-BSA or NT-P-HSA. When grouping patients as PB or MB according to the Ridley & Jopling classification, ML Flow BSA and ML Flow HSA tests correctly allocated 70.9% and 68.6% of patients in the PB group, and 87% and 81% of patients in the MB group, respectively. Concordant results were found in 82.0% (953/1162) (kappa value = 0.637; sd = 0.023) of samples between ML Flow tests and 85.7% (996/1162) (kappa value = 0.703; sd= 0.021) between ELISA tests. The ML Flow didn`t show statistical differences nor the ELISA tests using HSA or BSA. However, we noticed a tendency to minor capability to detect MB patients accompanied by a higher detection among PB patients, HHC, TB patients and healthy controls by the HSA antigen carrier in both methods. The PGL-I serology performed by the ML Flow test with BSA or HSA as antigen carriers can be a useful, friendly auxiliary tool to classify patients for treatment purposes.

Keywords: Leprosy, BSA, Serology

1. Introduction

The first report of antibody production against the bovine serum albumin (BSA) was made by Rothberg and Farr (1965). Studies have reported the presence of anti-BSA antibodies in the sera of healthy individuals, patients with liver disease, autoimmune diseases and diabete mellitus patients (Karjalainen et al. 1992; Lenkei and Ghetie 1977; Mihăescu et al. 1981; Saukkonen et al. 1994; Sjöwall et al. 2011). The antigenic properties of BSA have also been reported by numerous studies involving milk allergy (Goldman et al. 1963, 1963; Restani et al. 1995), allergy to animal hair (Prahl, Weeke, and Løwenstein 1978; Szépfalusi et al. 1993) or other antibody responses after BSA exposure (Mackensen et al. 2000; Macy et al. 1989; Morales et al. 1994). The decline in antibody titer with age has been related to tolerance induction and to a decrease in gut permeability (Scott et al. 1985; Vaarala et al. 1995), but could also be related to a better enzymatic digestion of dietary proteins.

BSA is a major allergen present in bovine milk and meat, which means that human exposure to BSA antigens can begin early in life. BSA is also present in significant amounts in preparations of vaccines and medications. Some studies have demonstrated the antibody response after an identified exposure to BSA in humans. In one study, 6 out of 7 patients presented anti-BSA antibodies after administration of a vaccine of dendritic cells prepared in tissue culture medium containing BSA (Mackensen et al. 2000). Another study reported anaphylaxis and anti-BSA IgE formation in a patient who received an autologous bone marrow infusion of stem cells prepared in BSA (Macy et al. 1989).

The presence of anti-BSA antibodies may interfere in serological tests, such as Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), which frequently uses BSA as a blocking agent or as "inert" carrier of antigens (Sjöwall et al. 2011). The use of a

blocking agent, such as BSA or other milk proteins, prevents unspecific antibody binding to microspaces in the microplate surface not occupied by the antigen. BSA is also used as a carrier of non-proteic antigens in immunoassay compositions, such as the NT-P-BSA, which is a semi-synthetic trisaccharide, analogous to the PGL-I from the cell wall of the *Mycobacterium leprae*, Hansen's disease causative agent. A rapid serological test, the ML Flow test, was developed for leprosy using the NT-P-BSA. The agreement between the ML Flow test and the ELISA using the same antigen was 91% (Buhrer-Sekula et al. 2003). As a control, in the ELISA assay, each sample is tested in an additional well with BSA only, aiming to discount bindings to the carrier portion of the antigen.

In confirmed leprosy patients, high antibody levels correlate with high bacterial index and, in the other hand, the absence of specific antibodies signifies a negative bacterial index (Klatser, Cho, and Brennan 1996). Thus, after diagnosis of a leprosy patient, the antibody response to PGL-I can be used for the classification of patients as multibacillary (MB) or paucibacillary (PB) forms of leprosy (Buhrer-Sekula et al. 2000). This classification can orient the choice of the specific treatment regimen for leprosy patients: six months with rifampicin and dapsone for PB patients or twelve months with rifampicin, clofazimine and dapsone for MB patients. In addition, the test may be used as a marker of infection for research purposes. Recent data, from a pilot study, showed a high positivity in the ML Flow test among healthcare workers in Rio Grande do Sul, south region of Brazil, a state known to present a low endemicity for leprosy (Saúde 2007). One hypothesis to explain this high positivity can be related to unespecific BSA bindings. Theoretically, the use of bovine serum albumin as the carrier of a semi-synthetic antigen could lead to false-positive results (Beretta et al. 2001; Restani et al. 2004) and if this is true, replacing BSA by a human protein carrier, as human serum albumin (HSA), can improve the specificity of the test.

This study investigated if the use of HSA as protein carrier improves the specificity of anti-PGL-I serology and therefore its performance to correctly classify PB and MB leprosy.

2. Methods

2.1. Study groups

Leprosy patients: 830 newly diagnosed leprosy patients were included, 49 TT, 295 BT, 158 BB, 189 BL and 139 LL classified according to Ridley and Jopling criteria (Ridley and Jopling 1966). These patients were recruited from March 2007 until February 2012 at two national leprosy referral centres from two Brazilian states: “Centro Dermatológico Dona Libânia” (Fortaleza city, Ceará State northeast Brazil) and "Fundação Alfredo da Matta" (Manaus city, Amazonas State north Brazil) (Penna et al. 2012). For the analysis, MB and PB groups were defined based on the R&J classification in which BB, BL and LL leprosy patients were considered as MB and BT and TT leprosy patients were considered as PB leprosy. Therefore, whenever serology results were positive for MB patients or negative for PB patients, serological tests were considered able to correctly classify patients for treatment purposes.

Healthy controls from a leprosy endemic area (EA HC) included 68 volunteers (blood donors, police officers and healthcare workers) (Brazil) recruited at Eduardo de Menezes Hospital, which is the referral centre for sanitary dermatology in Minas Gerais state. Thirty healthy controls from a non-endemic area (NEA HC) were recruited at the internal medicine sector of the Hospital del Salvador, University of Chile (Santiago, Chile). Tuberculosis patients were recruited in the same endemic (EA TB) and non-endemic areas (NEA TB) for leprosy. The group of TB patients was composed by 26 participants from each area (Silva et al. 2008).

Household contacts (n=182) of leprosy patients (HHC) were also recruited from 2009 to 2010 after clinical examination (Hungria et al. 2012).

2.2. The NT-P-HSA antigen production

The trisaccharide antigen of PGL-I was chemically synthesized carrying p-hydroxyphenylpropionate as a linker arm (NT-P) and then coupled to HSA by acyl azide method (Lemieux, Bundle, and Baker 1975). In this process one molecule of HSA contained 33.7 NT-P sugar molecules.

2.3. The ML Flow serological tests

The ML Flow test composition has been previously described elsewhere (Buhrer-Sekula et al. 2003). It is composed by a nitrocellulose detection strip that is flanked at one end by a reagent pad made from fiber-fleece containing the dried colloidal gold-labeled anti-human IgM antibody and the sample application pad, at the other end goes an absorption pad. The ML Flow HSA test is a new prototype of the original ML Flow test that uses the natural trisaccharide linked to human serum albumin (NT-P-HSA) as the antigen in substitution to the NT-P-BSA employed originally. The execution of ML Flow HSA test is identical to the ML Flow BSA test. Briefly, the assay is performed by the addition of 5 µl of undiluted serum or whole blood to the sample well followed by the addition of 130 µl of running buffer (phosphate buffered saline containing 0.66 mg of BSA/ml and 3% Tween 20). The test result is only considered valid when the control line is clearly visible. The visual readings of both tests were performed 10 minutes after buffer addition. Results were registered according to the scale of positivity: 0 and 0.5 = negative; 1 +, 2 +, 3 + and 4 + = positive.

2.4. ELISA for detection of anti-PGL-I IgM antibodies

The ELISA for the detection of IgM antibodies to PGL-I of *M. leprae* was performed as described (Buhrer-Sekula et al. 2000) using 0.01μg/ml of NT-P-BSA or NT-P-HSA as the semi-synthetic analogue of the PGL-I. Bovine serum albumin (BSA) or human serum albumin (HSA) were used to discount nonspecific bindings to the carrier portion of the antigen. The cut-off value for positivity was OD=0.200.

2.5. Statistical analyses

Descriptive analyses of clinical and epidemiological variables and their frequencies were performed. The agreement between results of serological methods was calculated by cross-tabulation and results were expressed as percentage with the graduated kappa index (κ): low (0-0.5), moderate (0.51-0.75) and excellent (0.76-1.0) (Landis and Koch 1977). The sensitivity (capacity to correctly detect MB leprosy patients) and the specificity (capacity to correctly exclude MB leprosy cases) were accessed. Data analysis was performed with SPSS version 17.

2.6. Ethical Aspects

The U-MDT/CT-BR study was designed under the international (Helsinki) and Brazilian research regulations and was approved by three regional ethical committees from all the states involved and by the National Ethics Commission of Research (CONEP) of the National Health Council (CNS) Ministry of Health (MS) (protocol 12949, approval 631/2006). The collection of healthy controls and TB patients samples were performed within previous studies properly approved by the respective ethical committees from the Hospital Eduardo de Menezes, Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais, and from the Universidade Federal de Minas Gerais, both from Minas Gerais, Brazil, and from the Hospital Del Salvador, in Santiago, Chile.Additionally, this

study in particular was also approved by the human and animal research ethics committee from Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Goiás (CEMHA/HC/UFG).

All individuals enrolled in this study had signed the informed consent and were not exposed to any risk or danger as a result of the study. For individuals under the age of 18 years old, the informed consent was signed by one of the parents or the legal guardian.

3. Results

A total of 1162 samples were tested. The median of age of all participants was 40 years old (range 6-83 years old) and 62% (722/1162) were male.

Seropositivity to all groups in the serological tests using BSA or HSA as the antigen carrier is presented in Seropositivity among HHC, EA HC and EA TB was higher using NT-P-HSA than with NT-P-BSA in both tests. ELISA HSA was positive in 8.2% (15/182) of HHC, 1.4% (1/69) of EA HC and 15.3% (4/26) of EA TB cases. The ELISA BSA was positive in 5.5% (10/182) of HHC, 0% (0/69) of EA HC and 11.5% (3/26) of EA TB cases. The ML Flow test was positive in 3.8% (7/182) of HHC, 4.3% (3/69) of EA HC and 11.5% (3/26) of EA TB using HSA. Seropositivity in the ML Flow using BSA was 1.6% (3/182) in the HHC group, 2.9% (2/69) of EA HC and 7.7% (2/26) of EA TB. No positive results were found in the studied groups from the non-endemic area.

Table 1. When grouping patients as PB or MB according to the Ridley & Jopling classification, ML Flow BSA and ML Flow HSA tests correctly allocated 70.9% and 68.6% of patients in the PB group, and 87% and 81% of patients in the MB group, respectively. There was no statistical difference between ML Flow BSA or ML Flow HSA tests to correctly classify leprosy patients into MB or PB groups (p=0.17).

Seropositivity among HHC, EA HC and EA TB was higher using NT-P-HSA than with NT-P-BSA in both tests. ELISA HSA was positive in 8.2% (15/182) of HHC, 1.4%

(1/69) of EA HC and 15.3% (4/26) of EA TB cases. The ELISA BSA was positive in 5.5% (10/182) of HHC, 0% (0/69) of EA HC and 11.5% (3/26) of EA TB cases. The ML Flow test was positive in 3.8% (7/182) of HHC, 4.3% (3/69) of EA HC and 11.5% (3/26) of EA TB using HSA. Seropositivity in the ML Flow using BSA was 1.6% (3/182) in the HHC group, 2.9% (2/69) of EA HC and 7.7% (2/26) of EA TB. No positive results were found in the studied groups from the non-endemic area.

Table 1. Seropositivity to ML Flow BSA and ML Flow HSA of the studied population clustered by endemic or non-endemic area for leprosy.

Group	N	ELISA BSA n	%	ML Flow BSA n	%	ELISA HSA n	%	ML Flow HSA n	%
MB	486	375	77,2%	424	87,2%	360	74,1%	394	81,1%
PB	342	88	25,7%	100	29,2%	82	24,0%	108	31,6%
HHC	182	10	5,5%	3	1,6%	15	8,2%	7	3,8%
EA HC	69	0	0,0%	0	0,0%	1	1,4%	3	4,3%
EA TB	26	3	11,5%	1	3,8%	4	15,3%	3	11,5%
NEA HC	30	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
NEA TB	27	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
TOTAL	1162	476	40,9%	528	45,4%	462	39,7%	515	44,3%

EA HC - Endemic area healthy controls
EA TB - Endemic area Tuberculosis patients
HHC - Household contacts of leprosy patients
NEA HC - Non - endemic area healthy controls
NEA TB - Non - endemic area Tuberculosis patients

Concordance of results between ELISA assays and between ML Flow tests is presented in table 2. Concordant results between ML Flow HSA and ML Flow BSA tests were observed in 82.0% (953/1162) of samples. A good strength of agreement was observed between the ML Flow HSA and ML Flow BSA tests (kappa value = 0.637; sd = 0.023). Agreement between ELISA assays using BSA or HSA was 85.7% (996/1162) (kappa value = 0.703; sd= 0.021).

Table 2. Concordance between serological tests for all studied groups

Studied Group	ELISA BSA		Total	ML Flow BSA		Total
	neg	pos		neg	pos	

Total	ELISA HSA	neg	610	90	700	ML Flow HSA	neg	536	111	647
		pos	76	386	462		pos	98	417	515
	Total		686	476	1162	Total		634	528	1162

Performance parameters were calculated for all tests taking into account their capability to correctly classify MB leprosy patients (sensitivitiy) or correctly exclude leprosy (specificity). There was no statistical difference between tests. All parameters calculated are presented in **Error! Not a valid bookmark self-reference.**. The specificity of the ML Flow BSA and ML Flow HSA tests, taking into account all control groups was 78% and 79%, respectively.

Table 3. Performance parameters for ML Flow BSA and ML Flow HSA tests

	ML Flow BSA	ML Flow HSA	ELISA BSA	ELISA HSA
Sensitivitiy	87.2	81.1	77.2	74.1
Specificity	98.8	96.7	96.4	94.2
PPV	76.9	76.4	96.9	95.0
NPV	88.3	83.7	74.1	71.1

PPV - Positivity Predictive Value
NPV - Negative Predictive Value

4. Discussion

Bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins are frequently used in biochemical studies since they have a similar folding, a well-known primary structure, and they have been associated with the binding of many different categories of small molecules. The presence of anti-BSA antibodies in the sera of healthy individuals was reported (Rothberg and Farr 1965) and therefore these antibodies may interfere in results of serological tests (Sjöwall et al. 2011). We evaluated if the use of an human protein as the antigen carrier has any impact on the PGL-I ELISA and ML Flow tests performance, specially on its specificity. Samples from leprosy patients, household contacts, healthy controls and TB patients from endemic an non-endemic areas for leprosy were used in these comparisons.

Overall the PGL-I seropositivity rate varies from 80 to 100% for MB leprosy patients and up to 30% for PB leprosy patients as revised by Moura et al. (2008). Studies have shown seropositivity in as many as 18.4% of HHC, with lower levels obtained in contacts of PB patients and higher levels in MB contacts (Moura 2008). Seropositivity rate among leprosy patients varies and appears to be dependent on the leprosy incidence rate in the community (Bakker et al. 2002, 2004; van Beers, Hatta, and Klatser 1999; Cartel et al. 1990; Cellona et al. 1993; Douglas et al. 1992; González-Abreu et al. 1996; Groenen et al. 1990). While different rates of seropositivity in endemic areas, as opposed to non-endemic areas, may reflect subclinical infection (Klatser et al. 1996), as yet, no evidence exists of a correlation between seroprevalence of PGL-I and the incidence of leprosy.

We observed a possible evidence of the importance of using the BSA to subtract unespecific bindings in the ELISA assay. We found that 29% (100/342) of PB patients presented positive results in the ML Flow BSA. Among those 100 PB patients with positive results in the ML Flow BSA test, only 37% (37/100) were positive in the ELISA BSA assay (data not shown) which confirms that discounting of BSA bindings in the ELISA assay corrects false positive results found in the ML Flow tests in 63% of PB cases. The same pattern of correction was found in only 32% of cases in the HSA coated plates (data not shown). It suggests that nonspecific binding might interfere in epidemiological studies in low endemic areas.

The ML Flow HSA results didn`t show statistical differences with the ML Flow BSA test nor the ELISA tests using HSA or BSA as antigen carriers. However, we noticed a tendency to minor capability to detect MB patients accompanied by a higher detection among PB patients, HHC, TB patients and healthy controls by the HSA antigen carrier in both methods. These results are accordingly to Lobato et al. (2011) and Qiong-

Hua (2013) where antigens using HSA as the carrier protein had a lower capacity to correctly classify leprosy patients. Zhang et al. (2010) found different results when binding the sugar (ND-O) to different proteins (HSA or BSA) whereas higher sensitivity of ND-O-HSA was explained by the higher incorporation of ND to HSA, i.e. a higher sugar/protein ratio. This explanation does not fit our study because the antigens had a lower incorporation to HSA (sugar/protein ratio = 33.7) than to BSA (sugar/protein ratio = 39.7) and since the concentration of antigens used in both tests was corrected by the sugar ratio.

In addition, as the sugar portion of NT-P-BSA and NT-P-HSA is completely the same, it cannot explain differences in seroreactivity between the two antigens tested. Maybe there are minor interactions between the saccharide and the two carrier proteins that could be able to alter the antigenic capacity of the two molecules as suggested by previous studies (Bojko et al. 2010; Gelamo et al. 2002; Guo, He, and Lu 2012; He and Carter 1992).

These small differences might also be due to interaction between the gut microbiota and the immune response. Although microbes have been classically viewed as pathogens, it is now well established that the majority of host-bacterial interactions are symbiotic (Turnbaugh et al. 2013). Recent efforts to sequence the bacterial genomes of the microbiota (known as the microbiome), have revealed it contains over 150 times the number of non-redundant genes than in the human genome (Qin et al. 2010). Two evidences suggest that the development of resistance or susceptibility patterns to a given disease may have much more to do with the variation in the genes found in our microbiome than in our own genes (Lee and Mazmanian 2010). First, the confirmation by the Human Genome Project that the human DNA is 99.9 percent alike among all people around the world (Baranzini et al. 2010; Reich et al. 2002), and second, the fact that

concordance rates for disease among monozygotic twins averages between 20–40% (Baranzini et al. 2010).

Better characterization of how the microbiome interacts with the modulation of immune responses or natural antibodies secretion may offer interesting novel approaches for diagnostic tools development and may explain some controversial results as the presence of antibodies among PB patients. It may also explain the failure to fit some diseases, as leprosy for example, in the Th1/Th2 paradigm. To date, however, all these venues remain largely speculative.

It was found that the sensibility and specificity of rapid tests were higher than the ELISA assays using both antigens. If these tests were applied for classification of leprosy patients for treatment purposes, 87.2% and 81.1% of MB patients would be correctly classified by ML Flow BSA and ML Flow HSA, respectively. Meanwhile, 29.2% or 31.5% of PB patients would be over-treated using only ML Flow BSA or ML Flow HSA, respectively. Although not significant ($p=0.08$), a higher difference between the two rapid tests was found among non-leprosy individuals, i.e, HHC, HC and TB, where 2.5% or 4.7% would be detected by ML Flow BSA or ML Flow HSA, respectively.

It was shown before that patients may harbor bacteria in the deeper tissues or in nerves and present a low or negative BI in their skin (Ponnighaus et al. 1997). Since antibodies to PGL-I are a reflection of the total bacterial load in the body, one could argue that PB patients with a positive serology result may have a higher bacterial load and therefore should receive longer treatment. False-positive classification into MB and consequent overtreatment, although slightly affecting cost-effectiveness of the control program and putting the patient into risk of side effects, can nevertheless be favored over false-negativity and under-treatment, since that would result in a less effective control

program due to the emergence of relapses (Van Brakel, de Soldenhoff, and McDougall 1992).

5. Conclusion

The study suggests that the carrier protein of the antigen did not influence significantly in the seropositivity of studied groups. The results confirmed a low seropositivity among healthy population and HHC.

The PGL-I serology performed by the ML Flow rapid test using both BSA or HSA as antigen carriers can be a useful, friendly auxiliary tool to classify patients for treatment purposes. The HSA did not enhance the performance of both serological tests in this study.

Acknowledgements: We thank all patients for donating their blood and information for these studies and all medical staff involved in sample and data collection.

Financial support: R.S. Moura is beneficiated by a financial support from CNPq (Process #152678/2011-5) and L.P.V. Cardoso was supported by a fellowship from CAPES (Process #02479/09-5). U-MDT Leprosy clinical trial – Brazil was funded by the Department of Science and Technology (DECIT) of Brazilian Ministry of Health and the Brazilian Council for Research (CNPq process # 40.3293/2005-7). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

6. References

Bakker, Mirjam I. et al. 2004. "Population Survey to Determine Risk Factors for Mycobacterium Leprae Transmission and Infection." *International journal of epidemiology* 33(6):1329–36.

Bakker, Mirjam I., Mochammad Hatta, Agnes Kwenang, Paul R. Klatser, and Linda Oskam. 2002. "Epidemiology of Leprosy on Five Isolated Islands in the Flores Sea, Indonesia." *Tropical medicine & international health : TM & IH* 7(9):780–87.

Baranzini, SE et al. 2010. "Genome, Epigenome and RNA Sequences of Monozygotic Twins Discordant for Multiple Sclerosis." *Nature* 464(7293):1351–56.

Van Beers, S. M., M. Hatta, and P. R. Klatser. 1999. "Patient Contact Is the Major Determinant in Incident Leprosy: Implications for Future Control." *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association* 67(2):119–28.

Beretta, B. et al. 2001. "Antigenic Determinants of Bovine Serum Albumin." *International archives of allergy and immunology* 126(3):188–95.

Bojko, B., A. Sułkowska, M. Maciazek-Jurczyk, J. Równicka, and W. W. Sułkowski. 2010. "Influence of Myristic Acid on Furosemide Binding to Bovine Serum Albumin. Comparison with Furosemide-Human Serum Albumin Complex." *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy* 76(1):6–11.

Van Brakel, W. H., R. de Soldenhoff, and A. C. McDougall. 1992. "The Allocation of Leprosy Patients into Paucibacillary and Multibacillary Groups for Multidrug Therapy, Taking into Account the Number of Body Areas Affected by Skin, or Skin and Nerve Lesions." *Leprosy review* 63(3):231–46.

Buhrer-Sekula, S. et al. 2000. "Use of ML Dipstick as a Tool to Classify Leprosy Patients." *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association* 68(4):456–63.

Buhrer-Sekula, S. et al. 2003. "Simple and Fast Lateral Flow Test for Classification of Leprosy Patients and Identification of Contacts with High Risk of Developing Leprosy." *J.Clin.Microbiol.* 41(5):1991–95.

Cartel, J. L. et al. 1990. "Assessment of Anti-Phenolic Glycolipid-I IgM Levels Using an ELISA for Detection of M. Leprae Infection in Populations of the South Pacific Islands." *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association* 58(3):512–17.

Cellona, R. V et al. 1993. "Cross-Sectional Assessment of ELISA Reactivity in Leprosy Patients, Contacts, and Normal Population Using the Semisynthetic Antigen Natural Disaccharide Octyl Bovine Serum Albumin (ND-O-BSA) in Cebu, The Philippines." *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association* 61(2):192–98.

Douglas, J. T. et al. 1992. "Evaluation of Four Semi-Synthetic Mycobacterium Leprae Antigens with Sera from Healthy Populations in Endemic and Non-Endemic Areas." *Leprosy review* 63(3):199–210.

Gelamo, E. L., C. H. T. P. Silva, H. Imasato, and M. Tabak. 2002. "Interaction of Bovine (BSA) and Human (HSA) Serum Albumins with Ionic Surfactants: Spectroscopy

and Modelling." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1594(1):84–99.

Goldman, A. S. et al. 1963. "Milk Allergy I. Oral Challenge with Milk and Isolated Milk Proteins in Allergic Children." *Pediatrics* 32:425–43.

Goldman, A. S. et al. 1963. "Milk Allergy II. Skin Testing of Allergic and Normal Children with Purified Milk Proteins." *Pediatrics* 32(4):572–79.

González-Abreu, E. et al. 1996. "Serological Reactivity to a Synthetic Analog of Phenolic Glycolipid I and Early Detection of Leprosy in an Area of Low Endemicity." *Leprosy review* 67(1):4–12.

Groenen, G. et al. 1990. "A Longitudinal Study of the Incidence of Leprosy in a Hyperendemic Area in Zaire, with Special Reference to PGL-Antibody Results. The Yalisombo Study Group." *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association* 58(4):641–50.

Guo, Ming, Ling He, and Xiao-Wang Lu. 2012. "[Binding Mechanism of Traditional Chinese Medicine Active Component 5-Hydroxymethyl-Furfural and HSA or BSA]." *Yao xue xue bao = Acta pharmaceutica Sinica* 47(3):385–92.

He, X. M., and D. C. Carter. 1992. "Atomic Structure and Chemistry of Human Serum Albumin." *Nature* 358(6383):209–15.

Hungria, Emerith Mayra et al. 2012. "Seroreactivity to New Mycobacterium Leprae Protein Antigens in Different Leprosy-Endemic Regions in Brazil." *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 107 Suppl :104–11.

Karjalainen, J., T. Saukkonen, E. Savilahti, and H. M. Dosch. 1992. "Disease-Associated Anti-Bovine Serum Albumin Antibodies in Type 1 (insulin-Dependent) Diabetes Mellitus Are Detected by Particle Concentration Fluoroimmunoassay, and Not by Enzyme Linked Immunoassay." *Diabetologia* 35(10):985–90.

Klatser, P. R., S. N. Cho, and P. J. Brennan. 1996. "The Contribution of Serological Tests to Leprosy Control." *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association* 64(4 Suppl):S63–6; discussion S66–7.

Landis, J. R., and G. G. Koch. 1977. "The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data." *Biometrics* 33(1):159–74.

Lee, YK, and SK Mazmanian. 2010. "Has the Microbiota Played a Critical Role in the Evolution of the Adaptive Immune System?" *Science* 330(6012):1768–73.

Lemieux, R. U., D. R. Bundle, and D. A. Baker. 1975. "The Properties of a 'Synthetic' Antigen Related to the Human Blood-Group Lewis." *Journal of the American Chemical Society* 97(14):4076–83.

Lenkei, R., and V. Ghetie. 1977. “Methods for Detection of Anti-Albumin Autoantibodies in Hepatic Diseases.” *Journal of immunological methods* 16(1):23–30.

Lobato, Janaina et al. 2011. “Comparison of Three Immunological Tests for Leprosy Diagnosis and Detection of Subclinical Infection.” *Leprosy review* 82(4):389–401.

Mackensen, A., R. Dräger, M. Schlesier, R. Mertelsmann, and A. Lindemann. 2000. “Presence of IgE Antibodies to Bovine Serum Albumin in a Patient Developing Anaphylaxis after Vaccination with Human Peptide-Pulsed Dendritic Cells.” *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 49(3):152–56.

Macy, E., K. Bulpitt, R. E. Champlin, and A. Saxon. 1989. “Anaphylaxis to Infusion of Autologous Bone Marrow: An Apparent Reaction to Self, Mediated by IgE Antibody to Bovine Serum Albumin.” *The Journal of allergy and clinical immunology* 83(5):871–75.

Mihăescu, Silvia, Rodica Lenkei, V. Gheţie, S. Mihaescu, and V. Ghetie. 1981. “Radioimmunoassay of Anti-Albumin Autoantibodies in Human Sera.” *J Immunol.Methods* 42(2):187–93.

Morales, C., J. V Brasó, A. Pellicer, A. Ruiz, and A. Peláez. 1994. “Serum Sickness due to Bovine Serum Albumin Sensitization during in Vitro Fertilization.” *Journal of investigational allergology & clinical immunology* 4(5):246–49.

Penna, Gerson Oliveira et al. 2012. “A Clinical Trial for Uniform Multidrug Therapy for Leprosy Patients in Brazil: Rationale and Design.” *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* 107 Suppl :22–27.

Ponnighaus, J. M., C. Lienhardt, S. Lucas, P. E. Fine, and J. A. Sterne. 1997. “Comparison of Bacillary Indexes in Slit-Skin Smears, Skin and Nerve Biopsies; a Study from Malawi.” *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association* 65(2):211–16.

Prahl, P., B. Weeke, and H. Løwenstein. 1978. “Quantitative Immunoelectrophoretic Analysis of Extract from Cow Hair and Dander. Characterization of the Antigens and Identification of the Allergens.” *Allergy* 33(5):241–53.

Qin, Junjie et al. 2010. “A Human Gut Microbial Gene Catalogue Established by Metagenomic Sequencing.” *Nature* 464(7285):59–65.

Qiong-Hua, Pan et al. 2013. “Early Revelation of Leprosy in China by Sequential Antibody Analyses with LID-1 and PGL-I.” *Journal of tropical medicine* 2013:352689.

Reich, David E. et al. 2002. “Human Genome Sequence Variation and the Influence of Gene History, Mutation and Recombination.” *Nature genetics* 32(1):135–42.

Restani, P. et al. 1995. “Evaluation by SDS-PAGE and Immunoblotting of Residual Antigenicity in Hydrolysed Protein Formulas.” *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 25(7):651–58.

Restani, P. et al. 2004. “Characterization of Bovine Serum Albumin Epitopes and Their Role in Allergic Reactions.” *Allergy* 59 Suppl 7:21–24.

Ridley, D. S., and W. H. Jopling. 1966. “Classification of Leprosy according to Immunity. A Five-Group System.” *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association* 34(3):255–73.

Rothberg, R. M., and R. S. Farr. 1965. “Anti-Bovine Serum Albumin and Anti-Alpha Lactalbumin in the Serum of Children and Adults.” *Pediatrics* 35:571–88.

Saúde, Ministério da. 2007. *Número de Pacientes Com Hanseníase Em Tratamento Até 31/12 de Cada Ano, Regiões E Unidades Federadas. Brasil, 1990 a 2007.*

Saukkonen, T. et al. 1994. “Children with Newly Diagnosed IDDM Have Increased Levels of Antibodies to Bovine Serum Albumin but Not to Ovalbumin. Childhood Diabetes in Finland Study Group.” *Diabetes care* 17(9):970–76.

Scott, H., T. O. Rognum, T. Midtvedt, and P. Brandtzaeg. 1985. “Age-Related Changes of Human Serum Antibodies to Dietary and Colonic Bacterial Antigens Measured by an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.” *Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica. Section C, Immunology* 93(2):65–70.

Silva, Rozana Castorina da et al. 2008. “The Result Patterns of ML Flow and ELISA (PGL-I) Serologic Tests in Leprosy-Endemic and Non-Endemic Areas.” *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 41 Suppl 2:19–22.

Sjöwall, Christopher et al. 2011. “Beware of Antibodies to Dietary Proteins in ‘Antigen-Specific’ Immunoassays! Falsely Positive Anticytokine Antibody Tests due to Reactivity with Bovine Serum Albumin in Rheumatoid Arthritis (the Swedish TIRA Project).” *The Journal of rheumatology* 38(2):215–20.

Szépfalusi, Z. et al. 1993. “Detection of IgE Antibodies Specific for Allergens in Cow Milk and Cow Dander.” *Int.Arch.Allergy Immunol.* 102(3):288–94.

Turnbaugh, Peter J. et al. 2013. “The Human Microbiome Project: Exploring the Microbial Part of Ourselves in a Changing World.” *Nature* 449(7164):804–10.

Vaarala, O., T. Saukkonen, E. Savilahti, T. Klemola, and H. K. Akerblom. 1995. “Development of Immune Response to Cow’s Milk Proteins in Infants Receiving Cow's Milk or Hydrolyzed Formula.” *The Journal of allergy and clinical immunology* 96(6 Pt 1):917–23.

Zhang, Jian, Delphi Chatterjee, Patrick J. Brennan, John S. Spencer, and Avraham Liav. 2010. “A Modified Synthesis and Serological Evaluation of Neoglycoproteins

Containing the Natural Disaccharide of PGL-I from Mycobacterium Leprae." *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 20(11):3250–53.

5.3. Artigo 3 – Título: Phenolic Glycolipid–I does not cross-react with Visceral Leishmaniasis sera in a Brazilian subset.

Autores: Rodrigo Scaliante de Moura[1], Samira Bührer-Sekulla[1], Selma Maria Bezerra Jerônimo[2], Mariane Martins de Araújo Stefani[1]

Revista: A ser submetido a *Journal of Immunological Methods*.

Dear Editor, we would like to submit some considerations to the paper published at Clinical Infectious Diseases 2010; 50:937–938.

Title: Phenolic Glycolipid–I does not cross-react with Visceral Leishmaniasis sera in a Brazilian subset.

Running title: PGL-I cross-reactivity with Visceral leishmaniasis sera

Authors: Rodrigo Scaliante de Moura[1], Samira Bührer-Sekulla[1], Selma Maria Bezerra Jerônimo[2], Mariane Martins de Araújo Stefani[1].

[1]Institute of Tropical Medicine and Public Health – University of Goiás

[2]Biosciences Center – University of Rio Grande do Norte

corresponding author: Rodrigo Scaliante de Moura
e-mail: rodrigoscaliant@gmail.com
Phone: +55 62 3209-6111
Postal Address:
Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
Departamento de Imunologia, sala 335.
Rua 235 s/n Setor Leste Universitário
Goiânia – GO, Brasil
CEP 74605-050.

Keywords: PGL-I, leprosy, Visceral leishmaniasis, serology

Phenolic glycolipid–I (PGL-I) of *Mycobacterium leprae* is a specific antigen for leprosy, and its terminal residue (ie, 3,6-di-O-methyl glucose) has not been found in any other natural molecule [1]. Recently, Sinha et al. raised the hypothesis that the serology with PGL-I could present cross-reactions by testing six serum samples from visceral leishmaniasis (VL) patients [2] using an ELISA assay. Although the differential diagnosis between leishmaniasis and leprosy is not troublesome, with VL subjects usually evolving with pancytopenia, weight loss, and immunosuppression, patients with leprosy present anaesthetic/ hypoanesthetic skin lesion(s) or thickened peripheral nerve(s) with impairment of sensations in the area supplied, cross-reaction could be a problem to the implementation of a leprosy test based on PGL-I serology in some geographic areas of Brazil and India for instance, where both diseases are commonly sympatric.

To assess the hypothesis that PGL-I serology could identify a subset of subjects infected with *Leishmania infantum*, by using PGL-I ELISA assay [3], we evaluated 503 serum samples included in a well-defined cohort of subjects infected with *Leishmania infantum* at Rio Grande do Norte, Brazil, of which 470 had documented VL and 33 responded to VL therapy although symptoms were not clear. We found a positivity of 2.9% (15/503), which is less than the seropositivity among healthy population in endemic areas [4]. Moreover, all positive cases came from Mossoró, a highly endemic area for leprosy in Rio Grande do Norte, presenting an incidence of 4/10.000 hab, higher than the incidence within the entire state (2.2/10.000 hab in 2012) [5–7], thus the possibility of co-infection or exposure to *M. leprae* among these cases must be considered.

With these experiments we reinforce the specificity of PGL-I antigen, as first claimed by Brett [8], and so many others as revised by Moura et al. [4], at least within the Brazilian samples from the studied region or patients infected with the *Leishmania infantum* species. We suggest that Sinha reevaluate the cutoff point of the ELISA assay

and the number of patients tested. The probability of leprosy co-infection or *M.leprae* exposure among patients studied by Sinha may also be evaluated. Moreover, we do not consider a cross-reactive scenario when anti-PGL-I antibodies levels are as weak as for the healthy control group in the immunoblot assay as presented by Sinha et al. [2]. It is needed to evaluate if the region between 72 and 55kDa of the leishmanial antigens, which is the region that showed some reactivity to anti-PGL-I antibodies, are expressed in vivo and if they are able to elicit specific humoral responses in the host. For the moment, it might be that the leishmanial antigens used by Sinha are not specific, since they are able to recognize leprosy patients, not the other way around, since we could not find VL patients responding to PGL-I in a significant manner.

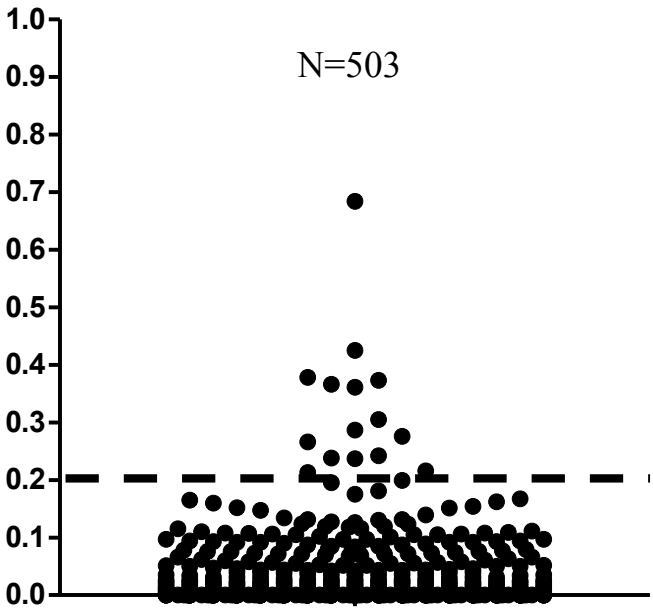


Figure 1. PGL-I Serology of visceral leishmaniasis patients.

Acknowledgements: We thank all patients for donating their blood and information for these studies and all lab staff involved in sample and data collection.

Conflicts of interest: The authors declare no conflicts of interests.

References

1. Rees RJ, Young DB. The microbiology of leprosy. In: R.C H, DVA O, eds. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1985: 31–52.

2. Sinha R, Sengupta A, Ali N, Gupta PN. Is Phenolic Glycolipid–I Really a Specific Antigen for Leprosy? Clin. Infect. Dis. **2010**; 50:937–938.

3. Buhrer-Sekula S, Sarno EN, Oskam L, et al. Use of ML dipstick as a tool to classify leprosy patients. Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis. **2000**; 68:456–63.

4. Moura RS, Calado KL, Oliveira ML, Buhrer-Sekula S. Leprosy serology using PGL-I: a systematic review. Rev.Soc.Bras.Med.Trop. 2008; 41 Suppl 2:11–18.

5. Saúde M da, Saúde S de V da. SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação. 2013.

6. Moura MLN, Dupnik KM, Sampaio GAA, et al. Active surveillance of Hansen's Disease (leprosy): importance for case finding among extra-domiciliary contacts. PLoS Negl. Trop. Dis. **2013**; 7:e2093.

7. Queiroz JW, Dias GH, Nobre ML, et al. Geographic information systems and applied spatial statistics are efficient tools to study Hansen's disease (leprosy) and to determine areas of greater risk of disease. Am. J. Trop. Med. Hyg. **2010**; 82:306–14.

8. Brett SJ, Draper P, Payne SN, Rees RJ. Serological activity of a characteristic phenolic glycolipid from Mycobacterium leprae in sera from patients with leprosy and tuberculosis. Clin. Exp. Immunol. **1983**; 52:271–9.

6 DISCUSSÃO

Desde que a classificação de pacientes de hanseníase em MB e PB determina a duração e os fármacos utilizados no tratamento, erros na classificação podem levar ao risco aumentado de recidiva devido ao tratamento insuficiente de pacientes MB ou ao tratamento excessivo de pacientes PB com drogas que apresentam consideráveis efeitos colaterais como a dapsona. A classificação pelo sistema de R&J de pacientes recrutados pelo U-MDT/RCT-BR foi comparada a classificação operacional recomendada pela OMS, baciloscopia do raspado intradérmico e aos testes sorológicos visando avaliar a acurácia de cada método de classificação de pacientes de hanseníase.

Foi observado neste estudo que os resultados da baciloscopia, dos testes sorológicos e a classificação operacional da OMS são consistentes com a classificação final por R&J. A carga bacilar, o número de lesões de pele e a resposta humoral estão diretamente correlacionadas pois gradualmente aumentam ao longo do espectro da doença. Resultados similares foram encontrados por outros estudos (BÜHRER-SEKULA et al., 1998; BUHRER-SEKULA et al., 2000, 2003; BÜHRER-SÉKULA et al., 2001; BÜHRER-SÉKULA et al., 2007; CAVALCANTI et al., 2012; CHANTEAU et al., 1989; CHO et al., 2001; GROENEN et al., 1990; LOBATO et al., 2011; PARKASH et al., 2008; SCHURING et al., 2006; STEFANI et al., 2012; SULÇEBE & NAKUÇI, 1990). Como os resultados da baciloscopia são considerados na classificação final por R&J, ela obviamente apresentou um maior desempenho, como demonstrado pela curva ROC. Em termos de AUC, o índice baciloscópico (AUC = 0.946 – 0.975) supera o teste ML Flow (AUC = 0.823 – 0.876), e a classificação operacional da OMS (AUC = 0.812 – 0.873), que apresentou a menor concordância com a classificação final.

Uma abordagem que poderia melhorar o desempenho dos testes sorológicos, especialmente a especificidade seria a substituição da albumina bovina por uma proteína humana como carreadora do antígeno. A existência de anticorpos contra proteínas da dieta é um achado comum e a frequência destes anticorpos decai com a idade. Isto se aplica a albumina bovina, presente no leite e em carnes como demonstrado por Rothberg

e Farr (ROTHBERG; FARR, 1965). Com base nesta hipótese, o análogo sintético do PGL-I foi conjugado a albumina humana.

Uma possível evidência da importância em se descontar as ligações contra o BSA no ensaio por ELISA foi observada neste estudo. Foi encontrada uma soropositividade no teste ML Flow BSA de 29% (100/342) entre os pacientes PB. Dentre estes, apenas 37% também eram positivos no ELISA BSA. Isto demonstra que a linha contendo apenas BSA no ELISA foi capaz de corrigir 63% dos resultados falso-positivos encontrados no teste rápido entre os pacientes PB. O mesmo padrão de correção foi encontrado em apenas 32% dos casos utilizando os testes com HSA (resultados não publicados). Estes dados sugerem que as ligações não específicas podem interferer em estudos epidemiológicos em regiões de baixa endemicidade.

Os resultados deste estudo não apontaram para diferenças significativas no uso do HSA como carreadora do antígeno. Observamos que os testes sorológicos utilizando o NT-P-HSA confirmaram a classificação de menos pacientes MB somado a uma perda na especificidade entre os grupos controle embora sem significância estatística. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Lobato et. al (LOBATO et al., 2011) e Qiong-Hua (QIONG-HUA et al., 2013). Zhang et al. (2010) observou uma maior sensibilidade utilizando o ND-O-HSA, porém no estudo de Zhang, o HSA apresentou uma maior incorporação do dissacarídeo a molécula de HSA que a molécula de BSA Porém em nosso estudo houve uma menor incorporação do açúcar a proteína de HSA (relação açúcar/proteína = 33.7) se comparado ao antígeno ligado ao BSA (relação açúcar/proteína = 39.7). Esta diferença na incorporação do açúcar aos carreadores pode não ter sido a causa da menor sensibilidade do NT-P-HSA, pois os antígenos são utilizados com base em sua concentração de açúcar, corrigindo as diferenças de incorporação entre lotes.

Desde que as porções sacarídicas do NT-P-BSA e NT-P-HSA são idênticas, não podem explicar as diferenças na sororeatividade entre os antígenos avaliados. Possivelmente existam interações menores decorrentes da conjugação do sacarídeo aos diferentes carreadores capazes de alterar a antigenicidade das duas moléculas como foi sugerido em estudos passados que avaliaram a conjugação de drogas a albuminas séricas (BOJKO et al., 2010; GELAMO et al., 2002; GUO; HE; LU, 2012; HE; CARTER, 1992).

As recentes evidências de interação entre a microbiota do trato gastrointestinal e o sistema imune do hospedeiro devem ser levadas em conta no desenvolvimento de novos

testes sorológicos. Além disso, o melhor entendimento destas interações poderá ajudar a explicar resultados conflitantes de ferramentas diagnósticas, ou a falha em encaixar algumas doenças, hanseníase por exemplo, no paradigma Th1/Th2. A explicação para vários achados conflitantes como a soropositividade em parte dos pacientes PB ou as diferenças de soropositividade em diferentes populações poderá residir no microbioma e não no próprio genoma dos pacientes. Porém até o momento, todas estas hipóteses permanecem meramente especulativas.

Há benefícios e limitações no uso de critérios clínicos na classificação de hanseníase. Enquanto pode ser uma ferramenta simples de aplicação no campo por profissionais de saúde em geral, sempre existe o risco de certa proporção de pacientes ser tratado insuficientemente ou em excesso. Nossos resultados demonstram que pela classificação operacional isoladamente, 8,2% (4/486) dos pacientes MB receberia tratamento insuficiente e 54.4% (187/344) dos PB seriam tratados em excesso. Santos et al (SANTOS et al., 2013), Hagge et al (dados não publicados) e Norman et al (NORMAN et al., 2004) avaliaram a classificação operacional realizada apenas pela contagem de lesões e encontraram que 7,2%, 7,8% e 11,4%, respectivamente, dos pacientes MB seriam tratados insuficientemente e que 13,4%, 19% e 37,7%, respectivamente, dos pacientes PB receberiam tratamento em excesso. A alta porcentagem de pacientes PB que teriam sido tratados em excesso em nosso estudo provavelmente é decorrente de revés no recrutamento dos pacientes no ensaio clínico que limitou a entrada de pacientes PB favorecendo os MB que apresentam maior risco de recidiva, que é o desfecho daquele estudo.

Nesta população de estudo, 89,9% (437/486) dos casos BB, BL ou LL estavam concentrados acima do nível de 10 lesões. Estes resultados não estão de acordo com os dados encontrados por Gupta et. al na Índia (GUPTA et al., 2012). Eles argumentam que um ponto de corte de três lesões seria ideal para distinguir entre pacientes PB e MB. Os VPP e VPN dependem da sensibilidade e especificidade (acurácia de teste) mas também dependem do tamanho real de cada grupo a ser classificado, assim, o ponto de corte ideal deve ser diferente para cada cenário. Em um estudo na Nigéria, foi demonstrado que os profissionais de saúde apresentavam uma tendência de classificar os pacientes como MB buscando evitar o tratamento insuficiente, o que representa uma dificuldade para implementar o uso correto da classificação operacional. Neste país, onde 96% dos pacientes eram tratados como MB, apenas 19% o seriam se a classificação operacional da OMS fosse corretamente seguida (BÜHRER-SÉKULA et al., 2007).

Foi demonstrado anteriormente que os pacientes de hanseníase podem abrigar bactérias no interior de tecidos ou nervos e portanto apresentar um IB negativo em suas biópsias de pele (PONNIGHAUS et al., 1997). Desde que os anticorpos contra o PGL-I são um reflexo de toda carga bacilar, pode-se argumentar que os pacientes PB com um resultado de sorologia positivo podem apresentar uma carga bacilar oculta e por isso deveriam receber tratamento prolongado. A classificação errônea de casos PB em MB, apesar de afetar a custo-efetividade dos programas de controle e colocar o paciente em risco de efeitos colaterais, pode ser favorecida se comparado a resultados falso-negativos e tratamento insuficiente, que levariam a maior número de recidivas e menor eficiência dos programas de controle (VAN BRAKEL; DE SOLDENHOFF; MCDOUGALL, 1992).

Todas as abordagens avaliadas neste estudo apresentaram alguma limitação, ações que melhorem a sensibilidade de testes rápidos tais como a avaliação de novos antígenos ou novas tecnologias aplicadas na composição dos testes devem ser cuidadosamente avaliadas antes da implementação como ferramentas adicionais na classificação de pacientes. Desde que o risco de recidiva está relacionado principalmente aos casos MB, deve-se dar prioridade a melhora da capacidade de detecção de casos MB, em lugar da especificidade, ou seja, capacidade de excluir casos PB (VAN BRAKEL; DE SOLDENHOFF; MCDOUGALL, 1992). Neste contexto, a classificação da OMS satisfaz este critério como demonstrou uma alta sensibilidade (99%) para detectar casos MB com uma baixa especificidade (46%) comparadas a 87% e 70% de sensibilidade e especificidade, respectivamente, do teste ML Flow.

Entre as amostras de contatos domiciliares de pacientes de hanseníase, houve uma maior frequência de soropositivos tanto no ELISA quanto no teste rápido utilizando o HSA como carreador de antígeno, porém esta diferença não foi significativa ($p=0.3$ entre ELISA HSA e ELISA BSA e $p=0.19$ entre ML Flow HSA e ML Flow BSA). Os resultados confirmam a ausência de reatividade cruzada com o soro de pacientes de TB e baixa soropositividade na população geral de área endêmica e HHC.

A especificidade dos testes sorológicos também foi avaliada com um grupo de amostras de pacientes de Leishmaniose visceral (LV) desde que Sinha et al. (2010) levantaram a hipótese de reatividade cruzada entre soro de pacientes com LV e o PGL-I. Neste estudo encontramos uma soropositividade de 2,9% (15/503) no ELISA PGL-I e de 0,6% (3/503) no teste rápido ML Flow, ambos utilizando o NT-P-HSA como antígeno] entre pacientes de LV, o que é menor que a soropositividade esperada para população

saudável. A amostragem pequena e o uso de um ponto de corte muito baixo para uma população endêmica para hanseníase, como é o caso da Índia, são críticas feitas ao trabalho de Sinha et al. A reatividade cruzada com LV seria um problema para a implementação da sorologia PGL-I na rotina desde que as duas doenças são comumente simpátricas, porém nosso estudo afastou esta hipótese na população testada.

Desde que há uma discrepância entre os métodos de classificação para fins de tratamento, um regime uniforme poderia trazer inúmeros benefícios para os pacientes além de tornar a rotina em campo mais simples. Alguns autores argumentam que mesmo com um regime uniforme, a classificação continuará sendo importante desde que os pacientes apresentam riscos diferentes para reações (BRITTON & LOCKWOOD, 2004) porém nenhum ensaio com real valor preditivo aplicável no campo foi descrito até o presente momento.

7 CONCLUSÕES

Em conclusão, nosso estudo demonstra que entre os métodos laboratoriais utilizados em centros de referência para classificar pacientes de hanseníase, a baciloscopia apresenta a maior sensibilidade e especificidade. Nós reforçamos a importância em se utilizar pelo menos a baciloscopia em centros de referência ou hospitais para evitar erros no diagnóstico e classificação de pacientes de hanseníase. A sorologia PGL-I não apresentou reatividade cruzada com o soro de pacientes de Leishmaniose Visceral e se confirmou a baixa soropositividade entre os grupos controle. Este estudo sugere que a proteína carreadora do antígeno não influencia de maneira significante na soropositividade dos grupos estudados. A sorologia PGL-I via teste rápido ML Flow utilizando BSA ou HSA como carreador de antígeno pode ser uma ferramenta auxiliar útil para classificar pacientes de hanseníase a fim de escolha de tratamento.

8 REFERÊNCIAS

[Propositions of a group of leprologists of Madrid regarding the classification of leprosy]. **Actas dermo-sifiliográficas**, v. 44, n. 9, p. 706–8, jul. 1953.

ABE, M. et al. **Fluorescent leprosy antibody absorption (FLA-ABS) test for detecting subclinical infection with Mycobacterium lepraeInt.J.Lepr.Other Mycobact.Dis.**, 1980.

AGUADO, S. G. et al. **Simplification and standardization of serodiagnostic tests for leprosy based on phenolic glycolipid-I (PG-I) antigenLepr.Rev.**, 1986.

ALIPRANTIS, A. O. et al. **Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2Science**, 1999.

ALTMAN, D. G. **Practical Statistics for Medical Research** (C. & Hall, Ed.)LondonChapman & Hall, , 1991.

ARÁOZ, R. et al. Antigen discovery: a postgenomic approach to leprosy diagnosis. **Infect.Immun.**, v. 74, n. 1, p. 175–182, 2006.

ARAUJO, M. G. **[Leprosy in Brazil]Rev.Soc.Bras.Med.Trop.**, 2003.

ATASSI, M. S.; HABEEB, A. F. S. A.; LEE, C.-L. Immunochemistry of serum albumin—II. **Immunochemistry**, v. 13, n. 6, p. 547–555, jun. 1976.

ATTIA, E. A. et al. **Circulating CD4+ CD25 high FoxP3+ T cells vary in different clinical forms of leprosyInt.J.Dermatol.**, 2010.

BACH, M. A. et al. **Antibodies to phenolic glycolipid-1 and to whole Mycobacterium leprae in leprosy patients: evolution during therapyInt.J.Lepr.Other Mycobact.Dis.**, 1986.

BAFICA, A. et al. **TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to Mycobacterium tuberculosisJ.Exp.Med.**, 2005.

BAKER, D. M.; NGUYEN-VAN-TAM, J. S.; SMITH, S. J. Protective efficacy of BCG vaccine against leprosy in southern Malaŵi. **Epidemiology and infection**, v. 111, n. 1, p. 21–5, ago. 1993.

BANOO, S. et al. Evaluation of diagnostic tests for infectious diseases: general principles. **Nature reviews. Microbiology**, v. 4, n. 12 Suppl, p. S20–32, dez. 2006.

BAOHONG, J. Does there exist a subgroup of MB patients at greater risk of relapse after MDT? **Leprosy review**, v. 72, n. 1, p. 3–7, mar. 2001.

BARANZINI, S. et al. Genome, epigenome and RNA sequences of monozygotic twins discordant for multiple sclerosis. **Nature**, v. 464, n. 7293, p. 1351–1356, 2010.

BECX-BLEUMINK, M. Relapses among leprosy patients treated with multidrug therapy: experience in the leprosy control program of the All Africa Leprosy and Rehabilitation Training Center (ALERT) in Ethiopia; practical difficulties with diagnosing relapses; operational proced. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association**, v. 60, n. 3, p. 421–35, set. 1992.

BELL, D.; PEELING, R. W. Evaluation of rapid diagnostic tests: malaria. **Nature reviews. Microbiology**, v. 4, n. 9 Suppl, p. S34–8, set. 2006.

BERTOLLI, J. et al. A case-control study of the effectiveness of BCG vaccine for preventing leprosy in Yangon, Myanmar. **International journal of epidemiology**, v. 26, n. 4, p. 888–96, ago. 1997.

BJÖRKSTÉN, B. Diverse microbial exposure - consequences for vaccine development. **Vaccine**, v. 30, n. 29, p. 4336–40, 19 jun. 2012.

BOCHUD, P.-Y. et al. Polymorphisms in Toll-like receptor 4 (TLR4) are associated with protection against leprosy. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 9, p. 1055–65, set. 2009.

BOELENS, J. J. et al. Protective effect of BCG against leprosy in South Sulawesi, Indonesia. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association**, v. 63, n. 3, p. 456–7, set. 1995.

BOJKO, B. et al. Influence of myristic acid on furosemide binding to bovine serum albumin. Comparison with furosemide-human serum albumin complex. **Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy**, v. 76, n. 1, p. 6–11, jun. 2010.

BOYTON, R. J. et al. Immune mechanisms and the impact of the disrupted lung microbiome in chronic bacterial lung infection and bronchiectasis. **Clinical and experimental immunology**, v. 171, n. 2, p. 117–23, fev. 2013.

BRAHMBHATT, S. et al. Human T cell responses to peptides of the Mycobacterium leprae 45-kD serine-rich antigen. **Clinical and experimental immunology**, v. 128, n. 1, p. 140–8, abr. 2002.

BRASIL; SAÚDE, M. DA. **Guia para o Controle da Hanseníase**. [s.l: s.n.].

BRENNAN, P. J. IDEAL: in the footsteps of IMMLEP and THELEP. **Leprosy review**, v. 80, n. 3, p. 236–45, set. 2009.

BRENNAN, P. J.; CHO, S. N.; KLATSER, P. R. Bangkok Workshop on Leprosy Research. Immunodiagnostics, including skin tests. **International journal of leprosy**

and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association, v. 64, n. 4 Suppl, p. S58–62, dez. 1996.

BRETT, S. J. et al. Serological activity of a characteristic phenolic glycolipid from Mycobacterium leprae in sera from patients with leprosy and tuberculosis. **Clinical and experimental immunology**, v. 52, n. 2, p. 271–9, maio 1983.

BRETT, S. J. et al. Use of synthetic glycoconjugates containing the Mycobacterium leprae specific and immunodominant epitope of phenolic glycolipid I in the serology of leprosy. **Clinical and experimental immunology**, v. 64, n. 3, p. 476–83, jun. 1986.

BRIGHTBILL, H. D. et al. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. **Science (New York, N.Y.)**, v. 285, n. 5428, p. 732–6, 30 jul. 1999.

BRITO, M. F. et al. **Association between leprosy reactions after treatment and bacterial load evaluated using anti PGL-I serology and bacilloscopyRev.Soc.Bras.Med.Trop.**, 2008.

BRITTON, W. J.; LOCKWOOD, D. N. J. Leprosy. **Lancet**, v. 363, n. 9416, p. 1209–1219, 10 abr. 2004.

BUCARETCHI, F. et al. Dapsone hypersensitivity syndrome in an adolescent during treatment during of leprosy. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, n. 6, p. 331–334, 4 dez. 2004.

BUHRER-SEKULA, S. et al. A simple dipstick assay for the detection of antibodies to phenolic glycolipid-I of Mycobacterium leprae. **Am.J.Trop.Med.Hyg.**, v. 58, n. 2, p. 133–136, 1998.

BUHRER-SEKULA, S. et al. Use of ML dipstick as a tool to classify leprosy patients. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association**, v. 68, n. 4, p. 456–63, dez. 2000.

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, n. 5, p. 1991–1995, 2003.

BÜHRER-SEKULA, S. et al. The use of whole blood in a dipstick assay for detection of antibodies to Mycobacterium leprae: a field evaluation. **FEMS immunology and medical microbiology**, v. 21, n. 3, p. 197–201, jul. 1998.

BÜHRER-SÉKULA, S. et al. Dipstick assay to identify leprosy patients who have an increased risk of relapse. **Tropical medicine & international health : TM & IH**, v. 6, n. 4, p. 317–23, abr. 2001.

BÜHRER-SÉKULA, S. et al. The ML flow test as a point of care test for leprosy control programmes: potential effects on classification of leprosy patients. **Leprosy review**, v. 78, n. 1, p. 70–9, mar. 2007.

CALADO, K. et al. **Seropositivity with anti-PGL- I of household and close neighbours contacts of leprosy patients in an urban areaAnais Brasileiro de Dermatology**, 2005.

CALLEGARO-FILHO, D. et al. A potential role for complement in immune evasion by Mycobacterium leprae. **Journal of drugs in dermatology : JDD**, v. 9, n. 11, p. 1373–82, nov. 2010.

CAVALCANTI, A. A. L. et al. Concordance between expected and observed bacilloscopy results of clinical forms of leprosy: a 6-year retrospective study in Recife, State of Pernambuco, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 5, p. 616–9, out. 2012.

CELLONA, R. V et al. Long-term efficacy of 2 year WHO multiple drug therapy (MDT) in multibacillary (MB) leprosy patients. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association**, v. 71, n. 4, p. 308–19, dez. 2003.

CHAN, J. et al. Microbial glycolipids: possible virulence factors that scavenge oxygen radicals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 7, p. 2453–7, abr. 1989.

CHANTEAU, S. et al. PGL-I antigen and antibody detection in leprosy patients: evolution under chemotherapy. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association**, v. 57, n. 4, p. 735–43, dez. 1989.

CHATTERJEE, D. et al. Chemical synthesis and seroreactivity of O-(3,6-di-O-methyl-beta-D-glucopyranosyl)-(1----4)-O-(2,3-di-O-methyl- alpha-L-rhamnopyranosyl)-(1----9)-oxynonanoyl-bovine serum albumin--the leprosy-specific, natural disaccharide-octyl-neoglycoprotein. **Carbohydrate research**, v. 156, p. 39–56, 15 nov. 1986.

CHATURVEDI, V. et al. On the value of sequential serology with a Mycobacterium leprae-specific antibody competition ELISA in monitoring leprosy chemotherapy. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association**, v. 59, n. 1, p. 32–40, mar. 1991.

CHEMOUILLI, P. et al. Detection of Mycobacterium leprae in nerve lesions by the polymerase chain reaction. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association**, v. 64, n. 1, p. 1–5, mar. 1996.

CHIPLUNKAR, S.; DE LIBERO, G.; KAUFMANN, S. H. Mycobacterium leprae-specific Lyt-2+ T lymphocytes with cytolytic activity. **Infection and immunity**, v. 54, n. 3, p. 793–7, dez. 1986.

CHO, S. N. et al. Use of an artificial antigen containing the 3,6-di-O-methyl-beta-D-glucopyranosyl epitope for the serodiagnosis of leprosy. **The Journal of infectious diseases**, v. 150, n. 3, p. 311–22, set. 1984.

CHO, S. N. et al. Detection of phenolic glycolipid-I antigen and antibody in sera from new and relapsed lepromatous patients treated with various drug regimens. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association**, v. 59, n. 1, p. 25–31, mar. 1991.

CHO, S. N. et al. Detection of phenolic glycolipid I of Mycobacterium leprae in sera from leprosy patients before and after start of multidrug therapy. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 8, n. 1, p. 138–42, jan. 2001.

CHU, H.; MAZMANIAN, S. K. Innate immune recognition of the microbiota promotes host-microbial symbiosis. **Nature immunology**, v. 14, n. 7, p. 668–75, jul. 2013.

CHUA-INTRA, B. et al. Predominant recognition of species-specific determinants of the GroES homologues from Mycobacterium leprae and M. tuberculosis. **Immunology**, v. 93, n. 1, p. 64–72, jan. 1998.

CISLAK, D. et al. [Frequency of appearance of antibodies to bovine serum albumin in children with diabetes type I]. **Pol.Arch.Med.Wewn.**, v. 100, n. 2, p. 106–110, ago. 1998.

COLE, S. T. et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. **Nature**, v. 409, n. 6823, p. 1007–11, 22 mar. 2001.

COLSTON, M. J.; HILSON, G. R. Growth of Mycobacterium leprae and M. marinum in congenitally athymic (nude) mice. **Nature**, v. 262, n. 5567, p. 399–401, 29 jul. 1976.

CONVIT, J. et al. Specificity of the 48-hour reaction to Mitsuda antigen. Use of a soluble antigen from human and armadillo lepromin. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 52, n. 2, p. 187–91, jan. 1975.

CROFT, R. P. et al. A clinical prediction rule for nerve-function impairment in leprosy patients. **Lancet**, v. 355, n. 9215, p. 1603–6, 6 maio 2000.

CRUZ, D. et al. Host-derived oxidized phospholipids and HDL regulate innate immunity in human leprosy. **The Journal of clinical investigation**, v. 118, n. 8, p. 2917–28, ago. 2008.

CUNHA, S. S. et al. Design of the leprosy component of the Brazilian BCG revaccination trial for assessing BCG effectiveness against leprosy in school children. **Int.J Lepr.Other Mycobact.Dis**, v. 72, n. 1, p. 8–15, 2004.

CUNHA, S. S. et al. Neonatal BCG protection against leprosy: a study in Manaus, Brazilian Amazon. **Leprosy review**, v. 75, n. 4, p. 357–66, dez. 2004.

CYWES, C. et al. Nonopsonic binding of Mycobacterium tuberculosis to human complement receptor type 3 expressed in Chinese hamster ovary cells. **Infection and immunity**, v. 64, n. 12, p. 5373–83, dez. 1996.

DA CUNHA, M. D. et al. [The impact of leprosy elimination strategy on an endemic municipality in Rio de Janeiro State, Brazil]. **Cadernos de saúde pública**, v. 23, n. 5, p. 1187–97, maio 2007.

DECLERCQ, E. Leprosy global statistics: beware of traps. **Leprosy review**, v. 80, n. 4, p. 350–2, dez. 2009.

DESFORGES, S. et al. Specific anti-M leprae PGL-I antibodies and Mitsuda reaction in the management of household contacts in New Caledonia. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association**, v. 57, n. 4, p. 794–800, dez. 1989.

DOCKRELL, H. M. et al. T-cell recognition of the 18-kilodalton antigen of Mycobacterium leprae. **Infection and immunity**, v. 57, n. 7, p. 1979–83, jul. 1989.

DOCKRELL, H. M. et al. Induction of Th1 cytokine responses by mycobacterial antigens in leprosy. **Infection and immunity**, v. 64, n. 10, p. 4385–9, out. 1996.

DOCKRELL, H. M. et al. Diagnostic assays for leprosy based on T-cell epitopes. **Leprosy review**, v. 71 Suppl, p. S55–8; discussion S58–9, dez. 2000.

DOCKRELL, H. M. et al. Whole blood assays for interferon-gamma: practicalities and potential for use as diagnostic tests in the field. **Leprosy review**, v. 71 Suppl, p. S60–2, dez. 2000.

DOUGLAS, J. T. et al. The effects of chemotherapy on antibody levels in lepromatous patients. **Leprosy review**, v. 59, n. 2, p. 127–35, jun. 1988.

DOUGLAS, J. T.; WORTH, R. M. Field evaluation of an ELISA to detect antibody in leprosy patients and their contacts. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association**, v. 52, n. 1, p. 26–33, mar. 1984.

DUTHIE, M. S. et al. Use of protein antigens for early serological diagnosis of leprosy. **Clinical and vaccine immunology : CVI**, v. 14, n. 11, p. 1400–8, nov. 2007.

EL-DAROUTI, M. A. et al. Histopathological study of apparently normal skin of patients with leprosy. **International journal of dermatology**, v. 45, n. 3, p. 292–6, mar. 2006.

FEENSTRA, S. G. et al. Patient-related factors predicting the effectiveness of rifampicin chemoprophylaxis in contacts: 6 year follow up of the COLEP cohort in Bangladesh. **Leprosy review**, v. 83, n. 3, p. 292–304, set. 2012.

FERGUSON, T. A. et al. Immunoregulatory properties of antigenic fragments from bovine serum albumin. **Cellular immunology**, v. 78, n. 1, p. 1–12, maio 1983.

FERNANDES, C. et al. Increased frequency of CD4 and CD8 regulatory T cells in individuals under 15 years with multibacillary leprosy. **PloS one**, v. 8, n. 11, p. e79072, jan. 2013.

FINE, P. E. Immunogenetics of susceptibility to leprosy, tuberculosis, and leishmaniasis. An epidemiological perspective. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association**, v. 49, n. 4, p. 437–54, dez. 1981.

FINE, P. E. et al. Protective efficacy of BCG against leprosy in Northern Malawi. **Lancet**, v. 2, n. 8505, p. 499–502, 30 ago. 1986.

FINE, P. E. et al. Seroepidemiological studies of leprosy in northern Malawi based on an enzyme-linked immunosorbent assay using synthetic glycoconjugate antigen. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association**, v. 56, n. 2, p. 243–54, jun. 1988.

FUCHTENBUSCH, M. et al. Antibodies to bovine serum albumin (BSA) in type 1 diabetes and other autoimmune disorders. **Exp.Clin.Endocrinol.Diabetes**, v. 105, n. 2, p. 86–91, jan. 1997.

FUJIWARA, T. et al. Chemical synthesis of the trisaccharide unit of the species-specific phenolic glycolipid from Mycobacterium leprae. **Carbohydrate research**, v. 163, n. 1, p. 41–52, 1 jun. 1987.

GELAMO, E. L. et al. Interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants: spectroscopy and modelling. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1594, n. 1, p. 84–99, jan. 2002.

GELBER, R. H. et al. Serum antibodies to defined carbohydrate antigens during the course of treated leprosy. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association**, v. 57, n. 4, p. 744–51, dez. 1989.

GELUK, A. et al. From genome-based in silico predictions to ex vivo verification of leprosy diagnosis. **Clinical and vaccine immunology : CVI**, v. 16, n. 3, p. 352–9, mar. 2009.

GELUK, A.; DUTHIE, M. S.; SPENCER, J. S. Postgenomic Mycobacterium leprae antigens for cellular and serological diagnosis of M. leprae exposure, infection and leprosy disease. **Leprosy review**, v. 82, n. 4, p. 402–21, dez. 2011.

GIGG, J. et al. The allyl group for protection in carbohydrate chemistry. 17. Synthesis of propyl O-(3,6-di-O-methyl-beta-D-glucopyranosyl)-(1----4)-O-(2,3- di-O-methyl-alpha-L-rhamnopyranosyl)-(1----2)-3-O-methyl-alpha- L-rhamnopyranoside: the oligosaccharide portion of. **Chemistry and physics of lipids**, v. 38, n. 3, p. 299–307, set. 1985.

GILLIS, T. P.; WILLIAMS, D. L. Polymerase chain reaction and leprosy. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association**, v. 59, n. 2, p. 311–6, jun. 1991.

GOLDMAN, A. S. et al. Milk Allergy I. Oral challenge with milk and isolated milk proteins in allergic children. **Pediatrics**, v. 32, p. 425–43, set. 1963.

GOLDMAN, A. S. et al. Milk Allergy II. Skin Testing of Allergic and Normal Children with Purified Milk Proteins. **Pediatrics**, v. 32, n. 4, p. 572–579, 1 out. 1963.

GONZALEZ-ABREU, E.; GONZALEZ, A. Seroreactivity against the Mycobacterium leprae phenolic glycolipid I in mycobacteria infected or stimulated groups of individuals. **Leprosy review**, v. 58, n. 2, p. 149–54, jun. 1987.

GOULART, I. M. B. et al. Efeitos adversos da poliquimioterapia em pacientes com hanseníase: um levantamento de cinco anos em um Centro de Saúde da Universidade Federal de Uberlândia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 5, p. 453–460, out. 2002.

GROENEN, G. et al. A longitudinal study of the incidence of leprosy in a hyperendemic area in Zaire, with special reference to PGL-antibody results. The Yalisombo Study Group. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association**, v. 58, n. 4, p. 641–50, dez. 1990.

GUO, M.; HE, L.; LU, X.-W. [Binding mechanism of traditional Chinese medicine active component 5-hydroxymethyl-furfural and HSA or BSA]. **Yao xue xue bao = Acta pharmaceutica Sinica**, v. 47, n. 3, p. 385–92, mar. 2012.

GUPTA, R.; KAR, H. K.; BHARADWAJ, M. Revalidation of various clinical criteria for the classification of leprosy--a clinic-pathological study. **Lepr.Rev**, v. 83, n. 4, p. 354–362, dez. 2012.

GUYATT, G. H. et al. A framework for clinical evaluation of diagnostic technologies. **CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne**, v. 134, n. 6, p. 587–94, 15 mar. 1986.

HABEEB, A. F.; BORELLA, L. Effect of conformation of bovine serum albumin on reaction with its antibody. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 97, n. 6, p. 951–8, 1 dez. 1966.

HANCOCK, G. E. et al. In vivo administration of low-dose human interleukin-2 induces lymphokine-activated killer cells for enhanced cytolysis in vitro. **Cellular immunology**, v. 132, n. 2, p. 277–84, mar. 1991.

HAROUN, M. **Bovine serum albumin antibodies as a disease marker for hepatitis E virus infectionJ.Biomed.Biotechnol.**, 2005.

HASAN, R. et al. Quantitative antibody ELISA for leprosy. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association**, v. 57, n. 4, p. 766–76, dez. 1989.

HE, X. M.; CARTER, D. C. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. **Nature**, v. 358, n. 6383, p. 209–15, 16 jul. 1992.

HILGER, C. et al. Differential binding of IgG and IgA antibodies to antigenic determinants of bovine serum albumin. **Clin.Exp.Immunol.**, v. 123, n. 3, p. 387–394, mar. 2001.

HIRAYAMA, K. et al. Rapid confirmation and revision of the primary structure of bovine serum albumin by ESIMS and Frit-FAB LC/MS. **Biochem.Biophys.Res.Commun.**, v. 173, n. 2, p. 639–646, dez. 1990.

HOLLAND, C. A.; KIECHLE, F. L. Point-of-care molecular diagnostic systems--past, present and future. **Current opinion in microbiology**, v. 8, n. 5, p. 504–9, out. 2005.

HUNGRIA, E. M. et al. Seroreactivity to new Mycobacterium leprae protein antigens in different leprosy-endemic regions in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107 Suppl , p. 104–11, dez. 2012.

HUNTER, S. W.; BRENNAN, P. J. A novel phenolic glycolipid from Mycobacterium leprae possibly involved in immunogenicity and pathogenicity. **Journal of bacteriology**, v. 147, n. 3, p. 728–35, set. 1981.

HUSBY, S. **Normal immune responses to ingested foodsJ Pediatr.Gastroenterol.Nutr.**, 2000.

HUSSAIN, R. et al. Recognition of Mycobacterium leprae recombinant 18-kDa proteins in leprosy. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association**, v. 60, n. 3, p. 368–75, set. 1992.

ILA. Report of the International Leprosy Association Technical Forum. Paris, France, 22-28 February 2002. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association**, v. 70, n. 1 Suppl, p. S1–62, mar. 2002.

IVARSSON, S. A.; MÅNSSON, M. U.; JAKOBSSON, I. L. IgG antibodies to bovine serum albumin are not increased in children with IDDM. **Diabetes**, v. 44, n. 11, p. 1349–50, nov. 1995.

J., Y. S. **Leprosy for medical practitioners and paramedical workers**. Basle.: Novartis Foundation for Sustainable Development., 2002.

JAGANNATH, C.; SENGUPTA, D. N. Serology of leprosy. I. Indirect hemagglutination test with stabilized sensitized red cells. **Leprosy in India**, v. 53, n. 4, p. 507–12, out. 1981.

JAIN, M. et al. Lipidomics reveals control of Mycobacterium tuberculosis virulence lipids via metabolic coupling. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 12, p. 5133–8, 20 mar. 2007.

JAMET, P. et al. Relapses after a single dose of rifampin in skin-smear negative multibacillary patients after dapsone monotherapy. **International journal of leprosy**

and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association, v. 62, n. 2, p. 209–14, jun. 1994.

JAMET, P.; JI, B. Relapse after long-term follow up of multibacillary patients treated by WHO multidrug regimen. Marchoux Chemotherapy Study Group. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association**, v. 63, n. 2, p. 195–201, jun. 1995.

JARDIM, M. R. et al. Criteria for diagnosis of pure neural leprosy. **Journal of neurology**, v. 250, n. 7, p. 806–9, jul. 2003.

JARDIM, M. R. et al. Clinical, electroneuromyographic and morphological studies of pure neural leprosy in a Brazilian referral centre. **Leprosy review**, v. 75, n. 3, p. 242–53, set. 2004.

JARDIM, M. R. et al. Role of PGL-I antibody detection in the diagnosis of pure neural leprosy. **Leprosy review**, v. 76, n. 3, p. 232–40, set. 2005.

JOPLING, W. H. Indeterminate leprosy. **Proceedings of the Royal Society of Medicine**, v. 52, n. 5, p. 370–1, maio 1959.

KALEAB, B. et al. Mycobacterial-induced cytotoxic T cells as well as nonspecific killer cells derived from healthy individuals and leprosy patients. **European journal of immunology**, v. 20, n. 12, p. 2651–9, dez. 1990.

KANG, B. K.; SCHLESINGER, L. S. Characterization of mannose receptor-dependent phagocytosis mediated by Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan. **Infection and immunity**, v. 66, n. 6, p. 2769–77, jun. 1998.

KARJALAINEN, J. et al. A bovine albumin peptide as a possible trigger of insulin-dependent diabetes mellitus. **The New England journal of medicine**, v. 327, n. 5, p. 302–7, 30 jul. 1992.

KARJALAINEN, J. et al. Disease-associated anti-bovine serum albumin antibodies in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus are detected by particle concentration fluoroimmunoassay, and not by enzyme linked immunoassay. **Diabetologia**, v. 35, n. 10, p. 985–90, out. 1992.

KATOCH, V. M. Newer diagnostic techniques for tuberculosis. **The Indian journal of medical research**, v. 120, n. 4, p. 418–28, out. 2004.

KETTLER, H.; WHITE, K.; HAWKES, S. **Mapping the landscape of diagnostics for sexually transmitted infections**. Geneva: WHO, 2004.

KHANOLKAR-YOUNG, S.; SNOWDON, D.; LOCKWOOD, D. N. Immunocytochemical localization of inducible nitric oxide synthase and transforming growth factor-beta (TGF-beta) in leprosy lesions. **Clinical and experimental immunology**, v. 113, n. 3, p. 438–42, set. 1998.

KHOSRAVI, A.; MAZMANIAN, S. Disruption of the gut microbiome as a risk factor for microbial infections. **Current opinion in microbiology**, 2013.

KLATSER, P. R. et al. Evaluation of Mycobacterium leprae antigens in the monitoring of a dapsone-based chemotherapy of previously untreated lepromatous patients in Cebu, Philippines. **Leprosy review**, v. 60, n. 3, p. 178–86, set. 1989.

KLATSER, P. R. et al. Detection of Mycobacterium leprae nasal carriers in populations for which leprosy is endemic. **Journal of clinical microbiology**, v. 31, n. 11, p. 2947–51, nov. 1993.

KORDE, A. et al. Development of a radioimmunoassay procedure for aflatoxin B1 measurement. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 4, p. 843–6, 12 mar. 2003.

KRAMME, S. et al. Detection and quantification of Mycobacterium leprae in tissue samples by real-time PCR. **Medical microbiology and immunology**, v. 193, n. 4, p. 189–93, nov. 2004.

KROKOWSKI, M. et al. Anti-bovine serum albumin antibodies: genetic heterogeneity and clinical relevance in adult-onset IDDM. **Diabetes care**, v. 18, n. 2, p. 170–3, mar. 1995.

KRUTZIK, S. R. et al. IL-15 links TLR2/1-induced macrophage differentiation to the vitamin D-dependent antimicrobial pathway. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 181, n. 10, p. 7115–20, 15 nov. 2008.

LABORATORIAL, S. B. DE P. C. / M.; SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA CLÍNICA / MEDICINA LABORATORIAL. **Coleta de Sangue Venoso**. [s.l: s.n.].

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v. 33, n. 1, p. 159–74, mar. 1977.

LAUNOIS, P. et al. T cell response to purified filtrate antigen 85 from Mycobacterium bovis Bacilli Calmette-Guérin (BCG) in leprosy patients. **Clinical and experimental immunology**, v. 86, n. 2, p. 286–90, nov. 1991.

LAUNOIS, P. et al. Anti-peripheral nerve antibodies in leprosy patients recognize an epitope shared by the M. leprae 65 kDa heat shock protein. **Journal of autoimmunity**, v. 5, n. 6, p. 745–57, dez. 1992.

LAUNOIS, P. et al. The major secreted antigen complex (Ag 85) from Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guérin is associated with protective T cells in leprosy: a follow-up study of 45 household contacts. **The Journal of infectious diseases**, v. 167, n. 5, p. 1160–7, maio 1993.

LAUNOIS, P. et al. IL-6 production in response to purified mycobacterial heat-shock proteins and to antigen 85 in leprosy. **Cellular immunology**, v. 148, n. 2, p. 283–90, maio 1993.

LAUNOIS, P. et al. T-cell-epitope mapping of the major secreted mycobacterial antigen Ag85A in tuberculosis and leprosy. **Infection and immunity**, v. 62, n. 9, p. 3679–87, set. 1994.

LAUNOIS, P. et al. Fibronectin-binding antigen 85 and the 10-kilodalton GroES-related heat shock protein are the predominant TH-1 response inducers in leprosy contacts. **Infection and immunity**, v. 63, n. 1, p. 88–93, jan. 1995.

LEE, N. A. et al. A rapid aflatoxin B1 ELISA: development and validation with reduced matrix effects for peanuts, corn, pistachio, and Soybeans. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 52, n. 10, p. 2746–55, 19 maio 2004.

LEE, Y.; MAZMANIAN, S. Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system? **Science**, v. 330, n. 6012, p. 1768–1773, 2010.

LENKEI, R.; GHETIE, V. Methods for detection of anti-albumin autoantibodies in hepatic diseases. **Journal of immunological methods**, v. 16, n. 1, p. 23–30, jan. 1977.

LIPIGORNGOSON, S. et al. In-house direct cELISA for determining aflatoxin B1 in Thai corn and peanuts. **Food additives and contaminants**, v. 20, n. 9, p. 838–45, set. 2003.

LIU, P. T.; KRUTZIK, S. R.; MODLIN, R. L. Therapeutic implications of the TLR and VDR partnership. **Trends in molecular medicine**, v. 13, n. 3, p. 117–24, mar. 2007.

LOBATO, J. et al. Comparison of three immunological tests for leprosy diagnosis and detection of subclinical infection. **Leprosy review**, v. 82, n. 4, p. 389–401, dez. 2011.

LOCKWOOD, D. N. J.; COLSTON, M. J.; KHANOLKAR-YOUNG, S. R. The detection of Mycobacterium leprae protein and carbohydrate antigens in skin and nerve from leprosy patients with type 1 (reversal) reactions. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 66, n. 4, p. 409–15, abr. 2002.

LOCKWOOD, D. N.; REID, A. J. The diagnosis of leprosy is delayed in the United Kingdom. **QJM : monthly journal of the Association of Physicians**, v. 94, n. 4, p. 207–12, abr. 2001.

LOMBARDI, C. et al. Protective efficacy of BCG against leprosy in São Paulo. **Bulletin of the Pan American Health Organization**, v. 30, n. 1, p. 24–30, mar. 1996.

LWIN, K. et al. BCG vaccination of children against leprosy: fourteen-year findings of the trial in Burma. **Bull.World Health Organ**, v. 63, n. 6, p. 1069–1078, 1985.

MABEY, D. et al. Diagnostics for the developing world. **Nature reviews. Microbiology**, v. 2, n. 3, p. 231–40, mar. 2004.

MACFARLANE, A. et al. Presence of human T-cell responses to the Mycobacterium leprae 45-kilodalton antigen reflects infection with or exposure to M. leprae. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 8, n. 3, p. 604–11, maio 2001.

MACKENSEN, A. et al. Presence of IgE antibodies to bovine serum albumin in a patient developing anaphylaxis after vaccination with human peptide-pulsed dendritic cells. **Cancer immunology, immunotherapy : CII**, v. 49, n. 3, p. 152–6, jun. 2000.

MACY, E. et al. Anaphylaxis to infusion of autologous bone marrow: an apparent reaction to self, mediated by IgE antibody to bovine serum albumin. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 83, n. 5, p. 871–5, maio 1989.

MAEDA, N. et al. The cell surface receptor DC-SIGN discriminates between Mycobacterium species through selective recognition of the mannose caps on lipoarabinomannan. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 8, p. 5513–6, 21 mar. 2003.

MAEDA, Y. et al. Identification of an Immunomodulating Agent from Mycobacterium leprae. **Infection and immunity**, v. 73, n. 5, p. 2744–50, maio 2005.

MARTINEAU, A. R. et al. IFN-gamma- and TNF-independent vitamin D-inducible human suppression of mycobacteria: the role of cathelicidin LL-37. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 178, n. 11, p. 7190–8, 1 jun. 2007.

MARTINIUK, F.; GIOVINAZZO, J. Lessons of leprosy: the emergence of TH17 cytokines during type II reactions (ENL) is teaching us about T-cell plasticity. **Journal of drugs in …**, v. 11, n. 5, p. 626–630, 2012.

MATSUDA, F. et al. Evaluation of a probiotics, Bifidobacterium breve BBG-01, for enhancement of immunogenicity of an oral inactivated cholera vaccine and safety: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial in Bangladeshi children under 5 years of age. **Vaccine**, v. 29, n. 10, p. 1855–8, 24 mar. 2011.

MEANS, T. K. et al. Human toll-like receptors mediate cellular activation by Mycobacterium tuberculosis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 163, n. 7, p. 3920–7, 1 out. 1999.

MEIMA, A. et al. Factors associated with impairments in new leprosy patients: the AMFES cohort. **Leprosy review**, v. 70, n. 2, p. 189–203, jun. 1999.

MEIMA, A. et al. SIMLEP: a simulation model for leprosy transmission and control. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association**, v. 67, n. 3, p. 215–36, set. 1999.

MEIMA, A. et al. The future incidence of leprosy: a scenario analysis. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 82, n. 5, p. 373–80, maio 2004.

MEIMA, A.; VAN VEEN, N. H. J.; RICHARDUS, J. H. Future prevalence of WHO grade 2 impairment in relation to incidence trends in leprosy: an exploration. **Tropical medicine & international health : TM & IH**, v. 13, n. 2, p. 241–6, mar. 2008.

MELSOM, R. et al. Antibody activity against Mycobacterium leprae antigen 7 during the first year of DDS treatment in lepromatous (BL-LL) leprosy. **Leprosy review**, v. 49, n. 1, p. 17–29, mar. 1978.

MENZEL, S. et al. Antibodies to a synthetic analog of phenolic glycolipid-I of Mycobacterium leprae in healthy household contacts of patients with leprosy. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association**, v. 55, n. 4, p. 617–25, dez. 1987.

MIHĂESCU, S. et al. Radioimmunoassay of anti-albumin autoantibodies in human sera. **J Immunol.Methods**, v. 42, n. 2, p. 187–193, abr. 1981.

MIRA, M. T. Genetic host resistance and susceptibility to leprosy. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, v. 8, n. 4, p. 1124–31, abr. 2006.

MODLIN, R. L. The innate immune response in leprosy. **Current opinion in immunology**, v. 22, n. 1, p. 48–54, mar. 2010.

MONTESTRUC, E.; BERDONNEAU, R. [2 New cases of leprosy in infants in Martinique]. **Bulletin de la Société de pathologie exotique et de ses filiales**, v. 47, n. 6, p. 781–3, jan. 1954.

MONTOYA, D. et al. Divergence of macrophage phagocytic and antimicrobial programs in leprosy. **Cell Host.Microbe**, v. 6, n. 4, p. 343–353, 2009.

MONTOYA, D.; MODLIN, R. L. **Learning from leprosy: insight into the human innate immune response**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2010. v. 105p. 1–24

MORALES, C. et al. Serum sickness due to bovine serum albumin sensitization during in vitro fertilization. **Journal of investigational allergology & clinical immunology**, v. 4, n. 5, p. 246–9, 1994.

MOURA, R. S. et al. **Leprosy serology using PGL-I: a systematic reviewRev.Soc.Bras.Med.Trop.**, 2008.

MULIYIL, J.; NELSON, K. E.; DIAMOND, E. L. Effect of BCG on the risk of leprosy in an endemic area: a case control study. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association**, v. 59, n. 2, p. 229–36, jun. 1991.

NAAFS, B. Current views on reactions in leprosy. **Indian journal of leprosy**, v. 72, n. 1, p. 97–122, 2000.

NAKAMURA, H.; KARUBE, I. Current research activity in biosensors. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 377, n. 3, p. 446–68, out. 2003.

NILÜFER, D.; BOYACIOGLU, D. Comparative study of three different methods for the determination of aflatoxins in tahini. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, n. 12, p. 3375–9, 5 jun. 2002.

NOORDEEN, S. K. **The epidemiology of leprosy** (H. R.C., O. DVA, Eds.). Edinburgh: Churchill Livingstone, 1985.

NORMAN, G.; JOSEPH, G.; RICHARD, J. Validity of the WHO operational classification and value of other clinical signs in the classification of leprosy. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association**, v. 72, n. 3, p. 278–83, set. 2004.

OCHOA, M. T. et al. T-cell release of granulysin contributes to host defense in leprosy. **Nature medicine**, v. 7, n. 2, p. 174–9, mar. 2001.

OREGE, P. A. et al. Case-control study of BCG vaccination as a risk factor for leprosy and tuberculosis in western Kenya. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association**, v. 61, n. 4, p. 542–9, dez. 1993.

OYARZUN, A. et al. [Bovine serum albumin (BSA) antibodies in children with recently diagnosed type 1 diabetes with breast feeding and milk exposition]. **Rev Med.Chil.**, v. 131, n. 8, p. 865–872, ago. 2003.

PANNIKAR, V. et al. Relapse or late reversal reaction? **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association**, v. 57, n. 2, p. 526–8, jul. 1989.

PARASHAR, D. et al. Applications of real-time PCR technology to mycobacterial research. **The Indian journal of medical research**, v. 124, n. 4, p. 385–98, out. 2006.

PARDINI, V. C. et al. Antibodies to bovine serum albumin in Brazilian children and young adults with IDDM. **Diabetes care**, v. 19, n. 2, p. 126–9, mar. 1996.

PARKASH, O. et al. Performance of a lateral flow test for the detection of leprosy patients in India. **Journal of medical microbiology**, v. 57, n. Pt 1, p. 130–2, jan. 2008.

PAULA VAZ CARDOSO, L. et al. Development of a quantitative rapid diagnostic test for multibacillary leprosy using smart phone technology. **BMC infectious diseases**, v. 13, n. 1, p. 497, jan. 2013.

PAYNE, S. N.; DRAPER, P.; REES, R. J. Serological activity of purified glycolipid from Mycobacterium leprae. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association**, v. 50, n. 2, p. 220–1, jul. 1982.

PEELING, R. W. et al. Why do we need quality-assured diagnostic tests for sexually transmitted infections? **Nature reviews. Microbiology**, v. 4, n. 12 Suppl, p. S7–19, dez. 2006.

PENNA, M. L. et al. **The influence of increased access to basic healthcare on the trends in Hansen's disease detection rate in Brazil from 1980 to 2006Rev.Soc.Bras.Med.Trop.**, 2008.

PETERS, T. J.; FELDHOFF, R. C.; REED, R. G. Immunochemical studies of fragments of bovine serum albumin. **J. Biol. Chem.**, v. 252, n. 23, p. 8464–8468, 10 dez. 1977.

PEYRON, P. et al. Nonopsonic phagocytosis of Mycobacterium kansasii by human neutrophils depends on cholesterol and is mediated by CR3 associated with glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 165, n. 9, p. 5186–91, 1 dez. 2000.

PONNIGHAUS, J. M. et al. Comparison of bacillary indexes in slit-skin smears, skin and nerve biopsies; a study from Malawi. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association**, v. 65, n. 2, p. 211–6, jul. 1997.

PÖNNIGHAUS, J. M. et al. Efficacy of BCG vaccine against leprosy and tuberculosis in northern Malawi. **Lancet**, v. 339, n. 8794, p. 636–9, 14 mar. 1992.

PÖNNIGHAUS, J. M. et al. Incidence rates of leprosy in Karonga District, northern Malawi: patterns by age, sex, BCG status and classification. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association**, v. 62, n. 1, p. 10–23, mar. 1994.

PRADO-MONTES DE OCA, E. et al. SNP 668C (-44) alters a NF-kappaB1 putative binding site in non-coding strand of human beta-defensin 1 (DEFB1) and is associated with lepromatous leprosy. **Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 9, n. 4, p. 617–25, jul. 2009.

PRAHL, P.; WEEKE, B.; LØWENSTEIN, H. Quantitative immunoelectrophoretic analysis of extract from cow hair and dander. Characterization of the antigens and identification of the allergens. **Allergy**, v. 33, n. 5, p. 241–53, out. 1978.

QIN, J. et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. **Nature**, v. 464, n. 7285, p. 59–65, 2010.

QIONG-HUA, P. et al. Early Revelation of Leprosy in China by Sequential Antibody Analyses with LID-1 and PGL-I. **Journal of tropical medicine**, v. 2013, p. 352689, jan. 2013.

R.G., R. Diagnostics take centre stage. **Nat.Rev.Microbiol.**, v. 4, n. 12 Suppl., p. S1–S1, 2006.

RATLEDGE, C.; STANDFORD, J.; GRANGE, J. M. The biology of the mycobacteria. In: [s.l: s.n.]. p. 406–474.

REED, M. B. et al. A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response. **Nature**, v. 431, n. 7004, p. 84–7, 2 out. 2004.

REGO, V. P. A. et al. [Type 1 reaction in leprosy: characteristics and association with hepatitis B and C viruses]. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 5, p. 546–9, 2007.

REICH, D. E. et al. Human genome sequence variation and the influence of gene history, mutation and recombination. **Nature genetics**, v. 32, n. 1, p. 135–42, set. 2002.

RESTANI, P. et al. Evaluation by SDS-PAGE and immunoblotting of residual antigenicity in hydrolysed protein formulas. **Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology**, v. 25, n. 7, p. 651–8, jul. 1995.

RIDLEY, D. S. The bacteriological interpretation of skin smears and biopsies in leprosy. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 49, n. 5, p. 449–52, set. 1955.

RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association**, v. 34, n. 3, p. 255–73, 1966.

RIEGELMAN, R. **Studying a Study and Testing a Test**. [s.l: s.n.]. v. 4p. -

RIVAS, M. N.; BURTON, O.; WISE, P. A microbiota signature associated with experimental food allergy promotes allergic sensitization and anaphylaxis. **Journal of Allergy and …**, v. 131, n. 1, p. 1–22, 2012.

ROCHE, P. W. et al. Serological monitoring of the response to chemotherapy in leprosy patients. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association**, v. 61, n. 1, p. 35–43, mar. 1993.

ROCHE, P. W.; THEUVENET, W. J.; BRITTON, W. J. Risk factors for type-1 reactions in borderline leprosy patients. **Lancet**, v. 338, n. 8768, p. 654–7, 14 out. 1991.

RODRIGUES, M. L. et al. Protective effect of intradermal BCG against leprosy; a case-control study in central Brazil. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association**, v. 60, n. 3, p. 335–9, out. 1992.

RODRÍGUEZ-LECOMPTE, J. C. et al. The effect of microbial-nutrient interaction on the immune system of young chicks after early probiotic and organic acid administration. **Journal of animal science**, v. 90, n. 7, p. 2246–54, 1 jul. 2012.

ROTHBERG, R. M.; FARR, R. S. Anti-bovine serum albumin and anti-alpha lactalbumin in the serum of children and adults. **Pediatrics**, v. 35, p. 571–88, abr. 1965.

SAAD, M. H. et al. IgM immunoglobulins reacting with the phenolic glycolipid-1 antigen from Mycobacterium leprae in sera of leprosy patients and their contacts. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 85, n. 2, p. 191–4, 1990.

SAINI, C.; RAMESH, V.; NATH, I. CD4+ Th17 Cells Discriminate Clinical Types and Constitute a Third Subset of Non Th1, Non Th2 T Cells in Human Leprosy. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 7, 2013.

SALGAME, P. et al. Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. **Science (New York, N.Y.)**, v. 254, n. 5029, p. 279–82, 11 out. 1991.

SAMPAIO, L. H. et al. Immunologically reactive M. leprae antigens with relevance to diagnosis and vaccine development. **BMC.Infect.Dis.**, v. 11, p. 26–, 2011.

SANTOS, A. R. et al. Use of PCR-mediated amplification of Mycobacterium leprae DNA in different types of clinical samples for the diagnosis of leprosy. **Journal of medical microbiology**, v. 39, n. 4, p. 298–304, out. 1993.

SANTOS, V. S. et al. Evaluation of agreement between clinical and histopathological data for classifying leprosy. **International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases**, v. 17, n. 3, p. e189–92, mar. 2013.

SAÚDE, M. DA. **Diretrizes Gerais para o Trabalho em Contenção com Material Biológico.** Brasília - DF: [s.n.].

SAÚDE, M. DA. **Guia de Procedimentos técnicos: Baciloscopia em Hanseníase**. [s.l: s.n.].

SAÚDE, M. DA; SAÚDE, S. DE V. DA. **SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação.** Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>.

SAUKKONEN, T. et al. Children with newly diagnosed IDDM have increased levels of antibodies to bovine serum albumin but not to ovalbumin. Childhood Diabetes in Finland Study Group. **Diabetes care**, v. 17, n. 9, p. 970–6, set. 1994.

SAUKKONEN, T. et al. IgA bovine serum albumin antibodies are increased in newly diagnosed patients with insulin-dependent diabetes mellitus, but the increase is not an independent risk factor for diabetes. **Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)**, v. 84, n. 11, p. 1258–61, nov. 1995.

SCHURING, R. P. et al. Association between anti-pGL-I IgM and clinical and demographic parameters in leprosy. **Leprosy review**, v. 77, n. 4, p. 343–55, dez. 2006.

SCOLLARD, D. M. et al. The continuing challenges of leprosy. **Clinical microbiology reviews**, v. 19, n. 2, p. 338–81, maio 2006.

SHAW, I. N. et al. Long-term follow up of multibacillary leprosy patients with high BI treated with WHO/MDT regimen for a fixed duration of two years. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association**, v. 68, n. 4, p. 405–9, dez. 2000.

SHETTY, V. P.; WAKADE, A.; ANTIA, N. H. A high incidence of viable Mycobacterium leprae in post-MDT recurrent lesions in tuberculoid leprosy patients. **Leprosy review**, v. 72, n. 3, p. 337–44, out. 2001.

SIELING, P. A. et al. CD1-restricted T cell recognition of microbial lipoglycan antigens. **Science (New York, N.Y.)**, v. 269, n. 5221, p. 227–30, 14 jul. 1995.

SINGH, H. B. et al. Improved protocol for PCR detection of Mycobacterium leprae in buffered formalin-fixed skin biopsies. **International journal of leprosy and other**

mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association, v. 72, n. 2, p. 175–8, jul. 2004.

SINHA, R. et al. Is Phenolic Glycolipid–I Really a Specific Antigen for Leprosy? **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, n. 6, p. 937–938, 15 mar. 2010.

SJÖWALL, C. et al. Beware of antibodies to dietary proteins in "antigen-specific" immunoassays! falsely positive anticytokine antibody tests due to reactivity with bovine serum albumin in rheumatoid arthritis (the Swedish TIRA project). **The Journal of rheumatology**, v. 38, n. 2, p. 215–20, mar. 2011.

SOH, S. E. et al. Probiotic supplementation in the first 6 months of life in at risk Asian infants--effects on eczema and atopic sensitization at the age of 1 year. **Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology**, v. 39, n. 4, p. 571–8, maio 2009.

SPENCER, J. S. et al. Identification of serological biomarkers of infection, disease progression and treatment efficacy for leprosy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107 Suppl , p. 79–89, dez. 2012.

STANLEY, S. J. et al. BCG vaccination of children against leprosy in Uganda: final results. **The Journal of hygiene**, v. 87, n. 2, p. 233–48, out. 1981.

STEFANI, M. DE A. Challenges in the post genomic era for the development of tests for leprosy diagnosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina …**, v. 41, n. Suplemento II, p. 89–94, 2008.

STEFANI, M. M. et al. Assessment of anti-PGL-I as a prognostic marker of leprosy reaction. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association**, v. 66, n. 3, p. 356–64, out. 1998.

STEFANI, M. M. DE A. et al. Comparison of two rapid tests for anti-phenolic glycolipid-I serology in Brazil and Nepal. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107 Suppl , p. 124–31, dez. 2012.

STENGER, S. et al. An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. **Science (New York, N.Y.)**, v. 282, n. 5386, p. 121–5, 2 out. 1998.

SULÇEBE, G.; NAKUÇI, M. Anti-phenolic glycolipid 1 IgM antibodies in leprosy patients and in their household contacts. **Leprosy review**, v. 61, n. 4, p. 341–6, dez. 1990.

SUZUKI, K. et al. Localization of CORO1A in the macrophages containing Mycobacterium leprae. **Acta histochemica et cytochemica**, v. 39, n. 4, p. 107–12, 30 ago. 2006.

SWAIN, J. P.; MISHRA, S.; JENA, S. Prevalence of leprosy among household contacts of leprosy cases in western Orissa. **Indian journal of leprosy**, v. 76, n. 1, p. 19–29, 2004.

SZÉPFALUSI, Z. et al. Detection of IgE antibodies specific for allergens in cow milk and cow dander. **Int.Arch.Allergy Immunol.**, v. 102, n. 3, p. 288–294, jan. 1993.

TAKEUCHI, O. et al. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 169, n. 1, p. 10–4, 1 jul. 2002.

TALHARI, S.; R.G., N. **Dermatologia Tropical: Hanseníase**. Manaus: [s.n.]. v. 3p. -

TANAKA, R. et al. A novel enhancement assay for immunochromatographic test strips using gold nanoparticles. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 385, n. 8, p. 1414–20, ago. 2006.

TANIGAWA, K. et al. Tryptophan aspartate-containing coat protein (CORO1A) suppresses Toll-like receptor signalling in Mycobacterium leprae infection. **Clinical and experimental immunology**, v. 156, n. 3, p. 495–501, jul. 2009.

TELES, R. M. B. et al. Type I interferon suppresses type II interferon-triggered human anti-mycobacterial responses. **Science (New York, N.Y.)**, v. 339, n. 6126, p. 1448–53, 22 mar. 2013.

THOLE, J. E. et al. Analysis of T-cell and B-cell responses to recombinant M. leprae antigens in leprosy patients and in healthy contacts: significant T-cell responses to antigens in M. leprae nonresponders. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association**, v. 63, n. 3, p. 369–80, out. 1995.

THUC, N. V et al. Protective effect of BCG against leprosy and its subtypes: a case-control study in southern Vietnam. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association**, v. 62, n. 4, p. 532–8, dez. 1994.

TURNBAUGH, P. J. et al. The human microbiome project: exploring the microbial part of ourselves in a changing world. **Nature**, v. 449, n. 7164, p. 804–810, 2013.

VAN BEERS, S. M.; HATTA, M.; KLATSER, P. R. Patient contact is the major determinant in incident leprosy: implications for future control. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association**, v. 67, n. 2, p. 119–28, jul. 1999.

VAN BRAKEL, W. H.; DE SOLDENHOFF, R.; MCDOUGALL, A. C. The allocation of leprosy patients into paucibacillary and multibacillary groups for multidrug therapy, taking into account the number of body areas affected by skin, or skin and nerve lesions. **Leprosy review**, v. 63, n. 3, p. 231–46, out. 1992.

VELEMA, J. P.; OGBEIWI, O. I. ILEP organisations should strive for high BCG coverage in communities at risk of leprosy. **Leprosy review**, v. 78, n. 2, p. 88–101, jul. 2007.

VERHAGEN, C. et al. Immunohistological analysis of in situ expression of mycobacterial antigens in skin lesions of leprosy patients across the histopathological spectrum. Association of Mycobacterial lipoarabinomannan (LAM) and Mycobacterium leprae phenolic glycolipid-I (PGL. **The American journal of pathology**, v. 154, n. 6, p. 1793–804, jul. 1999.

WAHN, U. et al. Allergenic and antigenic properties of bovine serum albumin. **Mol.Immunol.**, v. 18, n. 1, p. 19–28, jan. 1981.

WANG, T.-T. et al. Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D3 is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 173, n. 5, p. 2909–12, 1 set. 2004.

WATERS, M. F. et al. The rate of relapse in lepromatous leprosy following completion of twenty years of supervised sulphone therapy. **Leprosy review**, v. 57, n. 2, p. 101–9, jul. 1986.

WHO. Progress towards the elimination of leprosy as a public health problem. **Weekly Epidemiological Record**, v. 72, n. 26, p. -, 1995.

WHO. Leprosy elimination campaigns - reaching every patient in every village. **Weekly Epidemiological Record**, v. 72, n. 28, p. 205–212, 1997.

WHO. **7th WHO Expert Committee on leprosy, June 1997**, 1997. Disponível em: <www.who.int/lep/research/expert2.htm>

WHO. **Expert Committee on Leprosy, Seventh Report**GenevaWorld Health Orgazization, , 1998.

WHO. **Drugs used in leprosy**, 1998.

WHO. Current global situation of leprosy. Latest available information, July 1999. **Weekly Epidemiological Record**, n. 28, p. -, 2000.

WHO. **Global leprosy situation, 2012**, 2012.

WHO; (TDR), S. P. FOR R. & T. IN T. D. **Innovations for Health, Researches that make a difference**, 2010.

WILLIAMS, D. L. et al. Biological implications of Mycobacterium leprae gene expression during infection. **Journal of molecular microbiology and biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 58–72, jan. 2004.

WONG, R. C. **Lateral Flow Immunoassay**. Totowa, NJ: Humana Press, 2009.

YAMAMURA, M. et al. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. **Science (New York, N.Y.)**, v. 254, n. 5029, p. 277–9, 11 out. 1991.

YANG, Z. et al. NOD2 transgenic mice exhibit enhanced MDP-mediated down-regulation of TLR2 responses and resistance to colitis induction. **Gastroenterology**, v. 133, n. 5, p. 1510–21, dez. 2007.

YOKOTA, A. et al. Comparison of islet cell antibodies, islet cell surface antibodies and anti-bovine serum albumin antibodies in type 1 diabetes. **Diabetes research and clinical practice**, v. 9, n. 3, p. 211–7, jul. 1990.

YOUNG, D. B.; BUCHANAN, T. M. A serological test for leprosy with a glycolipid specific for Mycobacterium leprae. **Science (New York, N.Y.)**, v. 221, n. 4615, p. 1057–9, 9 out. 1983.

ZHANG, F.-R. et al. Genomewide association study of leprosy. **The New England journal of medicine**, v. 361, n. 27, p. 2609–18, 31 dez. 2009.

ZHANG, J. et al. A modified synthesis and serological evaluation of neoglycoproteins containing the natural disaccharide of PGL-I from Mycobacterium leprae. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 20, n. 11, p. 3250–3, 1 jul. 2010.

ZODPEY, S. P. et al. Effectiveness of Bacillus Calamette Guerin (BCG) vaccination against genital tuberculosis: a case-control study. **The Journal of communicable diseases**, v. 29, n. 4, p. 345–9, dez. 1997.

ZODPEY, S. P. et al. Effectiveness of Bacillus Calmette Guerin (BCG) vaccination in the prevention of childhood pulmonary tuberculosis: a case control study in Nagpur, India. **The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health**, v. 29, n. 2, p. 285–8, jul. 1998.

ZODPEY, S. P. et al. Protective effect of Bacillus Calmette Guerin (BCG) against leprosy: a population-based case-control study in Nagpur, India. **Leprosy review**, v. 70, n. 3, p. 287–94, out. 1999.

ZODPEY, S. P. et al. Scar size and effectiveness of Bacillus Calmette Guerin (BCG) vaccination in the prevention of tuberculosis and leprosy: a case-control study. **Indian journal of public health**, v. 51, n. 3, p. 184–9, 2005.

1.

ANEXOS

Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética, TCLE