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

Lucas Henrique Ferreira Sampaio

Avaliação da resposta imune celular a antígenos recombinantes do *Mycobacterium leprae* e potencial aplicação para o diagnóstico da hanseníase paucibacilar

Orientadora: Dr[a]. Mariane Martins de Araújo Stefani

Tese de Doutorado
Goiânia-GO
2011

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

Sampaio, Lucas Henrique Ferreira.
S192a Avaliação da resposta imune a antígenos do *Mycobacterium leprae* [manuscrito]: Potencial aplicação para o diagnóstico laboratorial da hanseníase / Lucas Henrique Ferreira Sampaio. - 2011 .
122 f. : il.

Orientadora: Profª. Drª. Mariane Martins de Araújo Stefani.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2011.
Bibliografia.

1. *Mycobacterium leprae* 2. Hanseníase. *3.* Imunologia. I. Título.

CDU:616-002.73

Lucas Henrique Ferreira Sampaio

Avaliação da resposta imune celular a antígenos recombinantes do *Mycobacterium leprae* e potencial aplicação para o diagnóstico da hanseníase paucibacilar

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Doutor em Medicina Tropical e Saúde Pública.

Orientadora: Dr[a]. Mariane Martins de Araújo Stefani

Financiamento: The Heiser Foundation for Tuberculosis and Leprosy, New York Community Trust, EUA.

Goiânia-GO
2011

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

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

1. Identificação do material bibliográfico: **[ ] Dissertação** **[X] Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor(a):	Lucas Henrique Ferreira Sampaio						
CPF:	699108631-20	E-mail:	lucashfs@gmail.com				
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?		[X]Sim	[ ] Não				
Vínculo Empregatício do autor	Bolsista						
Agência de fomento:	CAPES						
País:	Brasil	UF: GO					
Título:	Avaliação da resposta imune celular a antígenos recombinantes do *Mycobacterium leprae* e potencial aplicação para o diagnóstico da hanseníase paucibacilar						
Palavras-chave:	Hanseníase, diagnostico, imunidade celular						
Título em outra língua:	The evaluation of cellular immune responses to *Mycobacterium leprae* recombinant antigens and potential application for diagnosis of paucibacillary leprosy.						
Palavras-chave em outra língua:	Leproosy, diagnosis, cellular immune responses						
Área de concentração:	Imunologia						
Data defesa: **(**dd/mm/aaaa)	30/06/2011						
Programa de Pós-Graduação:	Medicina Tropical						
Orientador(a):	Mariane Martins de Araújo Stefani						
CPF:		E-mail:	mstefani@hotmail.com				

3. Informações de acesso ao documento:
Liberação para disponibilização?[1] [**X**] total [ ] parcial

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

_____ Data: 07/08/2011

Assinatura do(a) autor(a)

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

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Aluno (a):LUCAS HENRIQUE FERREIRA SAMPAIO

Orientador (a): MARIANE MARTINS DE ARAÚJO STEFANI

Membros:

1. **MARIANE MARTINS DE ARAÚJO STEFANI**
2. **MARIA APARECIDA FARIA GROSSI**
3. **MILTON OSORIO MORAES**
4. **ANA PAULA JUNQUEIRA-KIPNIS**
5. **JOAO ALVES DE ARÚJO FILHO**

Data: 30/06/2011

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por tudo que sou e tenho.

Aos meus pais, Fernando e Ana Maria, grandes responsáveis por todas as minhas vitórias, por tudo que fizeram por mim durante toda a minha vida.

Aos meus irmãos, Adolfo e Julia, pela fé que em mim sempre depositaram e pelo apoio em todas as ocasiões.

Aos meus sobrinhos Tales, Heleonora e Ruth, motivo de grandes alegrias.

Aos meus amigos Bruno, Igor, Henrique, Donaldy e Rogério, os melhores que alguém pode ter.

À Professora e mestra Dra. Mariane Stefani, por quem tenho profunda admiração, pelas oportunidades, dedicação, paciência e incentivo. Não existem palavras que expressem o que representa para mim.

Aos Drs. Maurício Barcelos Costa e Ana Lucia Maroclo, por toda a contribuição na parte histopatológica e clinica do projeto. Sem vocês este trabalho não seria possível.

À enfermeira Divina, pelo auxilio no recrutamento dos pacientes com hanseníase.

Aos colegas do Laboratório de Imunologia Mônica, Yana, Keila, Alex, Janaina e especialmente para turma da hansenologia Regiane, Ludimila, Emerith, Vitor, Adriano e principalmente ao Rodrigo pelas trocas de conhecimentos, experiência, companheirismo, cumplicidade e dedicação.

À Profa. Dra. Samira-Burher pela contribuição na minha formação em hansenologia, pelo entusiasmo contagiante e transmissão de conhecimentos.

Ao Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira, professor a quem sempre posso recorrer nos momentos de dúvidas a respeito de imunologia.

Aos professores de imunologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Ana Paula, Fátima e Miriam, por todos os ensinamentos transmitidos. Sem suas disciplinas eu ainda seria um nada em imuno.

A todos os professores que tive ao longo de minha jornada estudantil.

Ao IDRI, especialmente ao Dr. Malcolm Duthie, pela produção dos antígenos usados neste estudo e crucial colaboração em nossos trabalhos.

Aos professores doutores Ana Paula, Milton e Samira pelos conselhos e sujestões preciosas em minha banca de qualificação.

À Direção do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública e à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Goiás. Aos colegas e fucionários do IPTSP. Muito Obrigado!

À Direção Geral do Centro de Referência em Diagnóstico e Terapêutica e a Secretaria Municipal de Saúde de Goiânia.

Aos professores Patrícia Bozza (Fiocruz) e Niels Olsen (USP) pelo uso do Aparelho Luminex 100.

Aos pacientes e voluntários que fizeram parte deste estudo, pela permissão que nos deram de estudá-los para a evolução da medicina e ciência.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente me fizeram seguir em frente.

SUMÁRIO

Agradecimentos..... I

Sumário..... III

Lista de Figuras e Tabelas IV

Lista de Abreviaturas..... V

Resumo..... VII

Abstract..... VIII

1. Revisão da Literatura..... 1

2. Justificativa..... 26

3. Objetivos..... 27

4. Apresentação dos Manuscritos..... 28

5. Materiais e Métodos..... 30

6. Resultados..... 33

Artigo 1..... 33

Artigo 2..... 49

Artigo 3..... 71

7. Discussão Geral..... 87

8. Conclusões Gerais..... 95

9. Referências Bibliográficas..... 96

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Artigo 1

Tabela 1. *Brazilian study population*..... 37

Tabela 2. *Main characteristics of M. leprae antigens tested in Brazil* 39

Figura 1. *IFNγ response of PBMC following antigen stimulation*..... 41

Figura 2. *WBA responses of NEC to M. leprae antigens*..... 42

Figura 3. *IFNγ production during WBA of Brazilian study groups*..... 44

Artigo 2

Tabela1. *Composition of study groups*..... 55

Figura 1. *Identification of leprosy-specific antigens by cellular and antibody responses* 58

Figura 2. *Proteins that are specifically recognized by cellular responses do not necessarily elicit serum antibodies*..... 61

Figura 3. The ML0276 protein elicits a leprosy-specific cellular response but is detected by serum antibodies from all study groups……..... 61

Figura 4. *M. leprae proteins that lack specificity* 62

Tabela 2. *Representative M. leprae recombinant antigens examined by comparative genomics and actual immune responses*..... 65

Figura adicional 1. *IFNγ production in WBA upon stimulation with PHA, MLCwA and PBS*…. 69

Figura adicional 2. *IFNγ produced in WBA and OD of ELISA tests to detect IgG to Immunogenic M. leprae recombinant proteins* ……... 69

Figura adicional 3. *Percentage of amino acid identity of immunogenic M. leprae proteins with proteins from other relevant mycobacteria species*..... 70

Artigo 3

Tabela 1. *Composition of study groups*..... 78

Figura 1. A*ntigen-specific cytokine responses of TT/BT leprosy patients*..... 79

Figura 2. *Antigen-specific cytokine responses of LL/BL leprosy patients*..... 81

Figura 3. *Antigen-specific cytokine responses of HHC*…..... 82

Figura 4. *Antigen-specific cytokine responses of a HHC presenting with a distinct profile*..... 83

LISTA DE ABREVIATURAS

BB - Hanseníase Borderline-Borderline

BCG - Bacilo Calmette-Guerin

BAAR - Bacilo Álcool Acido Resistente

BL - Hanseníase Borderline Lepromatosa

BT - Hanseníase Borderline Tuberculóide

CE/EC – Controle Endêmico Saúdavel

CEP/CONEP - Comitês de Ética em Pesquisa/Conselho Nacional de Ética em Pesquisa

CR – Receptor de Complemento

CRDT – Centro de Referencia em Diagnostico e Terapêutica

CXCL10 - Quimiocina (motivo C-X-C) ligante dez

CCL11 - Quimiocina (motivo C-C) ligante onze

DC – Célula Dendrítica

DEFB1 – Defencina Beta 1

EST/WBA – Ensaio de Sangue Total/ Whole Blood Assay

GM-CSF – Fator de Crescimento de Colônias Granulociticas e Monocíticas

HHC- Household Contact/ Contato Domiciliar

HSP – Proteína do Choque Térmico

IB - Índice Baciloscópico

IDRI – Infectious Disease Research Institute

IDEAL – Initiative for Diagnostic and Epidemiological Assays for Leprosy

Ig – Imunoglobulina

IL - Interleucina

IFNγ - Interferon Gama

IPTSP - Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública

LAM - Lipoarabinomana

LEM - Leprosy Elimination Monitoring

LIAH – Laboratório de Imunologia da AIDS e da Hanseníase

LILAR2 – Leukocyte Immunoglobulin Like Receptor 2

LL - Hanseníase Lepromatosa

MB – Multibacilar

NK – Célula Natural Killer

NOD2– Receptor Domínio de Oligomerização Ligado ao Nucleotídeo Dois

PQT/MDT-Poliquimioterapia/Multidrogaterapia

MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade

MLCwA - *M. leprae* Cell Wall Antigen (antígeno da parede celular do *M. leprae*)

MLSA-LAM - *M. leprae* Soluble Antigen without Lipoarabinoman (antígeno solúvel do *M. leprae* sem Lipoarabinomana)

OMS/WHO - Organização Mundial da Saúde/World Health Organization

PB – Paucibacilar

PBMC – Células Mononucleares Periféricas

PBS - Solução Tampão Salina Fosfatatada

PCR - Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)

PGL-I - Antígeno Fenoglicolipídeo I ou Glicolipídeo Fenólico I do *M. Leprae*

PRR – Receptor de Reconhecimento de Padrão

PAMP – Padrão Molecular Associado ao Patógeno

RIC – Resposta imune Celular

ROI – Reativo Intermediário de Oxigênio

RNI – Reativo Intermediário de Nitrogênio

RTI - Reação Tipo I ou Reversa

RTII- Reação Tipo II

SNP - Polimorfismo de Única Base de Nucleotídeo

TB – Tuberculose

TGF-β – Fator de Crescimento e Transformação Beta

Th – Célula T Auxiliar

TT - Hanseníase Tuberculóide

TMB – Tetrametil benzidina

TN – Cepa Tamil Nadu

TNF-α - Fator de necrose tumoral α

TLR – Toll Like Receptor

Treg – Celula T Reguladora

VDR – Receptor de Vitamina D

Resumo

Titulo: Avaliação da resposta imune celular a antígenos recombinantes do *Mycobacterium leprae* e potencial aplicação para o diagnóstico da hanseníase paucibacilar

Introdução: A hanseníase é uma doença infecciosa crônica incapacitante que se caracteriza por um espectro de manifestações dermato-neurológicas associadas a diferentes padrões de resposta imune. Em um pólo, pacientes paucibacilares (PB) que incluem as formas tuberculóide (TT) e borderline tuberculóide (BT) montam forte resposta imune celular. No outro extremo do espectro pacientes multibacilares (MB) que incluem as formas bordeline-borderline (BB), borderline-lepromatosa (BL) e lepromatosa (LL) respondem a infecção com vigorosa produção de anticorpos. O diagnóstico da hanseníase se baseia nas manifestações clínicas o que dificulta o diagnóstico precoce antes do surgimento de sequelas. O desenvolvimento de métodos laboratoriais para o diagnóstico precoce da hanseníase é considerado fundamental para reduzir possíveis fontes de transmissão e o número de pacientes com deficiências físicas.

Métodos: Este trabalho pesquisou a reatividade celular a um painel de 41 proteínas recombinantes do *M. leprae* mediante avaliação da produção de IFNγ mensurado por ELISA em plasma de cultura de 24 horas de sangue total heparinizado (ensaio de sangue total/EST) com o antígeno (10μg/ml). Os grupos de estudo foram pacientes com hanseníase PB (TT/BT), MB (BL/LL) recém diagnosticados, não tratados, classificados segundo critérios de Ridley e Jopling. Foram também investigados contatos domiciliares de pacientes MB (HHC), pacientes com tuberculose pulmonar (TB) e indivíduos sádios recrutados na mesma área endêmica (CE). Previsões *in silico* foram utilizadas para investigar o nível de identidade das proteínas do *M. leprae* com homólogos em outras micobactérias e a presença de potenciais epítopos de células T. O perfil de 14 citocinas/quimiocinas induzidas frente à estimulação com antígenos selecionados do *M. leprae* foi investigado pela plataforma Multiplex.

Resultados e conclusões: Os resultados do EST identificaram 11 proteínas recombinantes do *M. leprae* (ML0405, ML2055, ML2331; ML0840, ML1623, ML1556, ML1632, ML1685, ML0276, ML2044, 46f) classificadas como imunogênicas e indutoras de resposta imune celular específica, com potencial aplicação no diagnóstico laboratorial da hanseníase PB. Estes antígenos foram reconhecidos por pacientes com hanseníase PB e HHC, enquanto pacientes com hanseníase MB, pacientes com TB e controles saudáveis não responderam as proteínas do ML. As previsões *in silico* de imunogenicidade e especificidade não foram confirmadas pelos resultados do EST *ex vivo*. O estudo multiplex com citocinas produzidas frente a um painel selecionado de protéinas do ML mostrou que os pacientes com hanseníase PB além do IFNγ, produzem outras citocinas características das células Th1 (IL-2 e IL-12). Entretanto, estes resultados indicaram que o IFNγ permaneceu como o melhor marcador imunológico da resposta imune celular de pacientes PB as proteínas recombinantes do *M. leprae*. Os pacientes com hanseníase MB secretam citocinas produzidas por células do tipo Th2, principalmente IL-4 e IL-5 em resposta as proteínas recombinantes do *M. leprae*. Nenhuma das 14 citocinas/quimiocinas analisadas diferenciou a resposta imune celular de pacientes PB da maioria dos HHC. Apesar de a maioria dos HHC responderem de forma idêntica aos pacientes PB, observamos que alguns individuos sob maior risco de infecção podem montar uma resposta imune Th2, de forma semelhante aos pacientes MB.

Palavras-chave: Hanseníase; Diagnóstico laboratorial; Imunidade celular.

Abstract

Title: The evaluation of cellular immune responses to *Mycobacterium leprae* recombinant antigens and potential application for the diagnosis of paucibacillary leprosy.

Introduction: Leprosy is a chronic and debilitating infectious disease that is characterized by a spectrum of dermato-neurological manifestations associated with different patterns of immune responses. At one end of the spectrum paucibacillary patients (PB) which include tuberculoid (TT) and borderline tuberculoid (BT) patients mount a strong cellular immune response. On the extreme multibacillary (MB) patients including borderline-borderline (BB), borderline-lepromatous (BL) and lepromatous (LL) forms, respond to infection with vigorous antibody production. The diagnosis of leprosy is based on clinical manifestations hampering the early diagnosis before the onset of sequelae. The development laboratory tests applicable for early leprosy diagnosis is considered essential to reduce possible sources of transmission and the number of patients with physical disabilities.

Methods: This work investigated the immune reactivity of a panel of 41 *M. leprae* (ML) recombinant proteins. The immune reactivity to ML proteins was evaluated by the production of IFNγ, measured by ELISA, in the supernatants of 24 hours cultures of heparinized whole blood (whole blood assays/WBA) stimulated with ML antigen (10ug/ml). Study groups were leprosy patients both PB (TT / BT) and MB (BL / LL), newly diagnosed, untreated, classified according to Ridley and Jopling criteria. Household contacts of MB patients (HHC), HIV-1 negative patients with pulmonary tuberculosis (TB) and healthy individuals from the same endemic area (EC) were also investigated. *In silico* predictions were used to investigate the level of identity of the ML proteins with counterparts in other mycobacteria and to assesse the presence of potential T cell epitopes. For a selected group of immunogenic and specific ML antigens, the profile of 14 cytokines/chemokines induced in WBA was also investigated by Multiplex plataform.

Results and Conclusions: The WBA results identified 11 out of 41 *M. leprae* recombinant proteins (ML0405, ML2055, ML2331, ML0840, ML1623, ML1556, ML1632, ML1685, ML0276, ML2044, 46f) that were classified as immunogenic and capable of inducing specific cellular immune response. These ML antigens were considered to have potential application for the development of laboratory tests for the diagnosis of PB leprosy. The same pattern of immunoreactivity identified among PB leprosy patients was observed among HHC, while MB leprosy, TB patients and healthy individuals did not respond to these antigens. *In silico* predictions of immunogenicity and specificity were not confirmed by *ex vivo* WBA results. The multiplex cytokine study with a selected group of ML antigens showed that besides IFNγ, patients with PB leprosy produce other cytokines characteristic of Th1 cells (IL-2 and IL-12). Nevertheless these results that IFNγ remained the best immunological marker of cellular immune response of PB patients to recombinant *M. leprae* proteins. MB leprosy patients secrete mainly Th2 type cytokines such as IL-4 and IL-5 in response to recombinant ML proteins. None of the 14 cytokines/chemokines analyzed in the multiplex was able to distinguish the cellular immune responses of PB patients from the majority of HHC. Although the majority of HHC response identically to PB, we observed that some individuals at greater risk of leprosy infection can mount a Th2 response, similar to MB patients.

Keywords: Leprosy; Laboratory diagnosis; Immune reactivity.

1. Revisão de Literatura

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica, preferencialmente granulomatosa, que acomete a pele e nervos periféricos e tem como agente etiológico o *Mycobacterium leprae*, um bacilo com tropismo por macrófagos de pele e pelas células de Schwann. Esse tropismo explica a patogênese do dano neural e as incapacidades físicas permanentes associadas à hanseníase (Ridley & Jopling 1966). O *M. leprae* é uma bactéria intracelular obrigatória, descrita por Amauer Hansen em 1873, não cultivável em meios de culturas axênicos. A taxa de duplicação do *M. leprae* é extremamente lenta quando comparada a outras bactérias, apresentando ciclo replicativo de 12,5 dias em média. O *M. leprae* é um bastonete reto ou levemente curvo, corado em vermelho pela fucsina e não descorado pela lavagem com álcool e ácidos orgânicos. Nos esfregaços de pele e nos cortes histopatológicos os bacilos podem ser vistos isolados ou em grupamentos variados (Ridley 1955).

Durante a década de 1990, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estabeleceu como meta a eliminação da hanseníase como problema de saúde pública no mundo até o ano 2005. A eliminação foi definida como a redução da taxa global de prevalência dapara 1 caso em cada 10.000 habitantes (WHO 1994). Com a introdução da multidrogaterapia (MDT) ou poliquimioterapia (PQT), a partir de década de 1980, a prevalência global de hanseníase reduziu em mais de 80% nos últimos 18 anos (Fine 2006). O boletim anual da OMS informou que prevalência global de hanseníase registrada no ano de 2009 foi de 211.903 casos. Esses dados mostram que a que a meta de prevalência global de menos de 1 caso de hanseníase para cada 10 mil habitantes foi atingida. Porém alguns países (Brasil, República Democrática do Congo, Madagascar, Moçambique, Nepal e Tanzânia) ainda não conseguiram atingir a meta de prevalência da hanseníase estipulada pela OMS (WHO 2010).

Parte do alcance da meta global de prevalência se deve a drástica redução da prevalência na Índia após ano de 2005. O governo da Índia, com o apoio da OMS, adotou em 2004 a LEM (Leprosy Elimination Monitoring) que consiste na adoção de um protocolo de medidas para a validação do diagnóstico e a classificação correta dos casos recém detectados de hanseníase. A adoção da LEM provocou uma queda brusca na prevalência da hanseníase (2,44 para 0,95 por 10.000 habitantes) (WHO 2005). Segundo o governo indiano, a queda na taxa de prevalência ocorreu graças a uma

recontagem dos casos verdadeiros ou em aberto de hanseníase, porém os critérios adotados para o cálculo da prevalência na Índia são questionáveis e um pouco duvidosos (Fine 2006). Entre as ações previstas pela LEM estão a não contabilização dos casos de pacientes com lesão única, em recidiva e a retirada do nome dos pacientes que abandonam o tratamento da lista de notificação oficial. Além disso, nenhum caso de hanseníase deve ser notificado antes da confirmação por um hansenólogo especialista (Rao & Lakshmi 2005; Samy 2007). Com a adoção da LEM, foi observada uma queda de 312.000 casos notificados de hanseníase em três anos na Índia. Nos mesmos três anos, os números de detecção global diminuíram de 620.638 para 296.499. Cerca de 96% do declínio global foi contabilizado pela Índia. É muito provável que a Índia e talvez o mundo não tenham realmente alcançado a meta de prevalência estipulada pela OMS (Fine 2006).

Apesar da drástica redução no número de casos registrados nas últimas duas décadas, a incidência da doença tem caído lentamente (WHO 2010). O declínio apresentado na prevalência de hanseníase, com a implementação da MDT, não foi acompanhado de um declínio concomitante do número de casos novos, indicando que a prevalência é um parâmetro inadequado para se avaliar o controle da infecção (Fine 2006).

No ano de 2009 foram registrados no Brasil 37.610 casos de hanseníase, com prevalência de 2,02/10.000 habitantes. Segundo a OMS esses números fazem com que o país tenha a maior prevalência global de hanseníase (WHO 2010). O Brasil possui regiões com enormes diferenças quanto à edemicidade da hanseníase e Goiás é a décima unidade federativa com maior incidência. No ano de 2010 foram diagnosticados em Goiás 3.102 casos de hanseníase, representando uma incidência de 4,76/10.000 (Secretaria Estadual de Saúde 2011).

Apesar de o *M. leprae* ter sido descrito no final do século XIX, os mecanismos de transmissão ainda não estão totalmente estabelecidos. Porém, acredita-se que o trato respiratório seja a principal porta de entrada e fonte de transmissão do *M. leprae*, já que um grande número de bacilos é excretado da cavidade nasal de pacientes com formas bacilíferas não tratadas (Moet *et al.* 2004a). Outras possíveis fontes de transmissão do bacilo são hansenomas ulcerados, urina, fezes, suor, leite materno, secreções vaginais e esperma (Yawalker 2002).

Contatos domiciliares de pacientes com formas bacilíferas de hanseníase, apresentam risco aumentado para o adoecimento. Estima-se que contatos intradomiciliares de pacientes com baciloscopia positiva apresentem 4 a 5 vezes mais risco de adoecer que outros indivíduos de uma população endêmica. (Moet *et al.* 2004; Fine *et al.* 1997).

Em áreas endêmicas para *M. leprae* a maioria dos indivíduos expostos é resistente ao bacilo, não desenvolvendo a doença (Godal & Negassi 1973. Moet *et al.* 2004). A hiperpopulação doméstica, fatores ambientais e genéticos podem aumentar a suscetibilidade à infecção (De Vries 1992; Fine *et al.* 1997). Variantes dos genes PACRG e PARK2 (parkinson protein 2, uma proteína do complexo E3 ubiquitina ligase) são consideradas fatores de risco para o desenvolvimento da hanseníase (Mira *et al.* 2004). Porém vários outros genes como fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), interleucina (IL)-10 e receptor da vitamina D parecem estar implicados na resistência ou suscetibilidade à hanseníase (Moraes *et al.* 2001; Krutzik *et al.* 2008). Aparentemente uma combinação de sutis variações em diversos genes pode alterar o risco de desenvolvimento da doença ou interfere na gravidade da hanseníase (Cardoso *et al.* 2011).

Manifestações clínicas da hanseníase

A avaliação diagnóstica da hanseníase é feita basicamente pelo exame dermato-neurológico, através do achado de lesões de pele com alteração da sensibilidade. A sensibilidade nas lesões pode estar diminuída (hipoestesia), ausente (anestesia) ou, em menor freqüência, aumentada (hiperestesia) (Yawalkar 2002).

Acredita-se que o período de incubação da doença seja de 2 a 10 anos. 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 logoftalmo (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). Algumas vezes a hanseníase pode se manifestar apenas por lesões em nervos periféricos, sem lesão cutânea, forma essa conhecida como neural pura (Ridley 1955). A hanseníase neural pura é geralmente diagnosticada clinicamente pela apalpação do tronco nervoso espessado, avaliação da sensibilidade cutânea e da força muscular dos membros superiores e inferiores (Yawalkar 2002).

A manifestação inicial da hanseníase é geralmente a forma indeterminada, com resposta do hospedeiro e manifestações clínicas indiferenciadas, não permitindo a classificação clínica ou prognóstico de evolução da doença (Ridley & Jopling 1966). A hanseníase indeterminada geralmente se manifesta como uma lesão hipocrômica, que pode evoluir para cura espontânea ou para outras formas clínicas da doença (Yawalkar 2002).

A classificação clínica e histopatológica proposta em 1966 por Ridley & Jopling é considerada o método mais completo e criterioso de categorização das diferentes manifestações de hanseníase existentes (Ridley & Jopling 1966). Segundo Ridley-Jopling, a hanseníase pode ser classificada em de acordo com suas características clínicas, imunológicas e histopatológicas em um espectro, variando de um pólo com resposta mais robusta ao bacilo, a hanseníase tuberculóide (TT), ao pólo mais suscetível, a hanseníase lepromatosa (LL), com formas intermediárias: BT (borderline tuberculóide), BB (borderline-borderline) e BL (borderline lepromatosa).

Multidrogaterapia e classificação clínica operacional

A OMS recomenda o uso de uma classificação clínica simplificada, baseada apenas no número de lesões de pele, para fins operacionais e de aplicação da MDT em serviços de saúde pública (WHO 1994). Essa classificação subdivide os pacientes em duas categorias:

Paucibacilar (PB) – Clinicamente são observadas até cinco lesões de pele. A MDT para pacientes PB consiste em uma combinação da rifampicina (uma dose mensal de 600 mg com administração supervisionada) e dapsona, (uma dose mensal de 100mg

supervisionada e uma dose de 100mg auto-administrada diariamente). Devem ser administradas seis doses em até nove meses.

Multibacilar (MB) – Neste grupo são classificados pacientes com 6 ou mais lesões de pele. A MDT para pacientes MB é uma combinação da rifampicina (uma dose mensal de 600 mg, com administração supervisionada), dapsona (uma dose mensal de 100 mg com administração supervisionada e uma dose diária de 100mg auto-administrada) e de clofazimina (uma dose mensal de 300mg supervisionada e uma dose diária de 50mg auto-administrada). Devem ser administradas doze doses em até dezoito meses.

A alta por cura é dada após a administração do número de doses preconizadas pelo esquema terapêutico e o paciente que completa o tratamento MDT não deverá mais ser considerado como um caso de hanseníase, mesmo em caso de reações pós-alta ou que permaneça com alguma seqüela da doença (WHO 1994a).

Estudos do genoma do *M. leprae* e de outras micobactérias

As micobactérias pertencem à ordem *Actinomycetales* e a família *Mycobacteriaceae*, que possui um único gênero, denominado *Mycobacterium (fungus bacterium),* nome dado em referência à película formada pelo *Mycobacterium tuberculosis* na superfície de meio líquido, similar à produzida por alguns fungos. As micobactérias são geralmente categorizadas de acordo com a velocidade de crescimento em meios de cultura como bactérias de crescimento rápido (como *Mycobacterium abscessus* e *Mycobacterium smegmatis*), intermediário (*Mycobacterium intermedium*) e lento (como *M. tuberculosis* e *Mycobacterium bovis*). Algumas micobactérias como o *M. leprae* e o *Mycobacterium marinum*, que não crescem em meio de cultura axênicos, são consideradas como não agrupáveis (Eisenstadt & Hall 1995). Acredita-se que haja mais de 300 diferentes espécies e subespécies de micobactérias, mas somente 115 espécies e 11 subespécies estão registradas na lista de nomes bacterianos aprovados (Euzeby 2005). A maioria dessas micobactérias é ambiental e apenas 46 espécies podem ser consideradas como potencialmente patogênicas para humanos (Eisenstadt & Hall 1995).

De acordo com dados do PATRIC (Patho Systems Resource Integration Center/ Stanford University) vinte e duas espécies e subespécies de micobactérias já têm seu genoma completo sequenciado, entre elas às micobactérias patogênicas *M. bovis, M. tuberculosis, Mycobacterium ulcerans, Mycobacterium avium* e *M. leprae* (PATRIC 2011).

Em 1998, Cole *et al.* finalizaram o sequenciamento genômico da cepa H37Rv do *M. tuberculosis*. O genoma do *M. tuberculosis* contém cerca de 4.000 genes, sendo composto por 4.411.529 pares de bases e 65,6% G + C (Cole *et al.* 1998). O genoma do *M. leprae* (Cepa TN – Tamil Nadu), cujo sequenciamento foi finalizado em 2001, possui 1605 genes codificadores de proteínas em um total de 3.268.203 pb e um teor médio de 57,8% G+C. Esses valores são muito inferiores àquelas reportadas no genoma do *M. tuberculosis*. Dos 1.605 genes potencialmente ativos, 1.439 (89,6 %) são comuns aos *M. tuberculosis,* ou seja, apenas 165 destes genes codificadores de proteínas não possuem ortólogo em *M. tuberculosis e* mais da metade dos genes do *M. tuberculosis* está ausente no genoma do *M. leprae (Cole et al. 2001).* Entre os 165 genes do *M. leprae* sem ortólogos no *M. tuberculosis,* podem ser atribuídas funções a apenas 29 genes. Cerca de 136 seqüências de codificadoras no *M. leprae,* não apresentam qualquer similaridade com genes conhecidos em outras especies e também podem representar pseudogenes por eles serem mais curtos do que a maioria dos genes codificadores em qualquer especie conhecida (Cole *et al.* 2001.).

O genoma do *M. leprae* possui poucos introns ou seqüências repetitivas, o que indica que este bacilo preservou apenas os genes imprescindíveis para a sua sobrevivência. Cerca 49,5% do genoma do *M. leprae* contém genes codificadores de proteínas e 27% de pseudogenes. Os restantes 23,5% do genoma não caracterizam genes ou pseudogenes e podem corresponder a seqüências regulatórias ou mesmo restos de genes mutados (Cole *et al.* 2001).

Um outro importante sequenciamento genômico, finalizado 2003, foi o do *M. bovis,* que possui 4.345.492 bp e 3.952 genes codificadores de proteínas com 65,3% de G + C. O genoma do *M. bovis* tem mais de 99% de semelhança com o genoma do *M. tuberculosis* e 88,5% de similaridade com o genoma do *M. leprae (Garnier et al. 2003).*

Estudo do grupo do Dr. Stewart Cole descreveu a diversidade genética e a filogeografia do *M. leprae* em cepas de diversas regiões do globo (Monot *et al.* 2005).

Usando genômica comparativa, foi demonstrado que todos as cepas existentes de hanseníase surgiram de um único clone cuja disseminação mundial pôde ser recuperada a partir da análise de padrões raros de SNPs (Polimorfismos de uma única base de nucleotídeo). SNPs são pontos de substituição de nucleotídeos bialéicos, isto é mudança de apenas um nucleotídeo da sequência do DNA que podem ocorrer em regiões codificadoras ou não codificadoras de proteínas. Quando os SNPs estão localizados em regiões codificadoras eles podem modificar um aminoácido e potencialmente causar variações na estrutura e/ou função da proteína (Brookes 1999). De acordo com Monot *et al.* existe uma correlação entre a origem geográfica do paciente de hanseníase e o perfil padrão de SNPs raros encontrados. Os resultados mostram 4 padrões de SNPs de acordo com a região geográfica. O padrão de SNP tipo 1 ocorre predominantemente na Ásia, região do pacífico e leste da África. O padrão de SNP tipo 2 foi detectado na Etiópia, Malawi, Nepal e norte da Índia. O padrão de SNP tipo 3 aparece na Europa, norte da África e América. O Padrão de SNP tipo 4 ocorre no Caribe e na África Oriental. O *M. leprae* teria começado a infectar os seres humanos há cerca de 5000 anos na região onde atualmente encontra-se a Etiópia e se espalhou com as sucessivas migrações humanas. O trabalho lançou também a hipótese de que os soldados de Alexandre, o Grande (século IV a.C.) foram os prováveis responsáveis pela disseminação do *M. leprae* pela a Ásia e posteriormente Europa. A colonização e tráfico de escravos foram os prováveis responsáveis pela introdução do *M. leprae* nas Américas. (Monot *et al.* 2005).

Em um outro trabalho filogeográfico comparativo, do mesmo grupo de pesquisa, foram comparados os genomas completos da cepa Br4923 do *M. leprae*, encontrada no Brasil, com genoma da cepas Thai53 da Tailândia, TN da Índia e NHDP63 dos Estados Unidos. A comparação do sequenciamento completo mostrou 99,995% identidade nas seqüência das quatro cepas. As cepas diferem apenas por cinco pseudogenes e em 215 sítios polimórficos. Dezesseis subtipos relacionados de SNPs foram definidos por genotipagem, tanto nas linhagens existentes quanto nas extintas do *M. leprae* em mundo. Os 16 subtipos SNPs mostraram uma forte associação geográfica que reflete os padrões da migração dos primeiros humanos e das rotas comercias que contribuiram fortemente para a disseminação da hanseníase. Esse estudo mostrou que a cepa Br4923 do *M. leprae*, encontrada no Brasil, é menor que a cepa Thai-53. O genoma Br4923 é composto por 3.268.071 pb, portanto 141 pb menor do que a cepa Thay53. Na

comparação entre os genomas Thay53 e Br4923 foi observada uma diferença de apenas 155 SNPs, 31 regiões VNTR (repetições em seqüência de número variável de uma mesma região gênica) e oito locais de inserção ou exclusão aleatória de nucleotídeos. Dos 155 SNPS observados apenas 52 são em áreas codificadoras de proteínas. Ou seja, apesar da imensa distância geográfica e alguns milênios as diferentes cepas *do M. leprae* são 99,995% idênticas. O fato de bactéria ser extremamente lenta em sua duplicação poderia explicar a baixíssima quantidade de cepas diferentes todo o mundo (Monot *et al.* 2009).

Um trabalho recente comparou o genoma completo (Whole-genome resequencing) do *M. leprae* de tatus selvagens e pacientes com hanseníase EUA. O estudo primeiramente fez uma análise comparativa do genoma das cepas de *M. leprae* encontrada nesses pacientes norte americanos com o genoma das cepas brasileiras (Br4923) e indianas (TN) e encontrou 51 diferentes SNPS e a substituição de 11 pares de base na cepa americana, denominada 3I-2-V1. Posteriormente os sítios polimórficos da cepa 3I-2-V1 foram comparadas as cepas de *M. leprae* obtidos a partir de 33 tatus selvagens coletados no Sul dos EUA. Um único genótipo de *M. leprae* foi encontrado em 28 dos 33 tatus selvagens e 25 dos 39 pacientes dos EUA, que residiam em áreas onde a exposição ao tatu é possível. Os resultados revelaram que as cepas infectantes eram essencialmente idênticas e esse genótipo não tem sido relatado em outras partes do mundo. Esse estudo mostra que o tatu pode ser um possível reservatório natural da hanseníase (Truman *et al.* 2011).

Imunologia da hanseníase

O reconhecimento inicial dos antígenos do *M. leprae* pode ocorrer por uma grande variedade de receptores PRR (receptores para reconhecimento de padrões), grupo de receptores do sistema imune inato que reconhecem PAMPs (padrões moleculares associado ao patógeno) do *M. leprae*. Primeiramente foram descritos PRR relacionados à endocitose do *M. leprae* (Launois *et al.* 1989). Os receptores das proteínas do complemento CR1 (CD35) e principalmente CR3 (CD11b/CD18) se ligam ao PGL-I (glicolipídeo fenólico I ou fenoglicolipídeo) promovendo a fagocitose do *M. leprae* (Tabouret *et al.* 2010). A desacilação do PGL-I inibe completamente a fagocitose do *M. leprae* por macrófagos (Schlesinger & Horwitz 1991).

O receptor CD209 (Lectina C) das células de Schwann se liga ao LAM (lipoarabinomana) do *M. leprae*, permitindo a entrada do bacilo na célula. Após a entrada, o *M. leprae* se prolifera e destrói as células de Schwann, causando lesões permanentes em nervos periféricos (Teles *et al.* 2010). O Receptor de lectina ligado a manose 2 (MBL2) ativa o sistema complemento e auxilia na opsonização/fagocitose do *M. leprae* (Vasconcelos *et al.* 2011). Um outro estudo mostrou que macrófagos com expressão diminuída de receptores de manose não conseguem se ligar ao LAM do *M. leprae* e tem dificuldade para fagocitar o bacilo (Prigozy *et al.* 1997).

Receptores scavenger de macrófagos (CD36) podem se ligar a moléculas de fosfolipídio oxidado da parede celular do *M. leprae*, facilitando a fagocitose do bacilo (Launois *et al.* 1989). Porém uma fagocitose excessiva de bacilos via receptores scanvenger pode fazer com que fagócitos produzam grandes quantidades de IL-10, e não se ativem (Montoya *et al.* 2009). Além disso, um fosfolipídio oxidado específico do *M. leprae* (1-palmitoyl-2-5,6-epoxyisoprostane-E2-sn-glycero-3-phosphorylcholine), encontrado em macrófagos de pacientes com hanseníase LL/BL, inibe a liberação de IL-12 e estimula a produção de IL-10 (Cruz *et al.* 2008).

O receptor LILRA2 (leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily A member 2) é um receptor do macrófago e células dendríticas que se liga ao PGL-I. O LILRA2 está expresso em maior quantidade em pacientes com hanseníase LL/BL do que em pacientes com as formas TT/BT (Bleharski *et al.* 2003). Ativação de LILRA2 inibi apresentação de antigenos do *M. leprae* tanto via CD1 e quanto via MHC de classe II, impedidindo assim a apresentacao de antigenos a células T (Lee *et al.* 2007). LILRA2 também inibe a diferenciação de monócitos em células dendríticas (Sieling *et al.* 1999). A ativação de LILRA2 inibi, ainda, a liberação de TNF-α e estimula a secreção de IL-10, IL-6 e IL-8 nas primeiras 24 horas após o estimulo com anticorpos ativadores anti LILRA2 (Lee *et al.* 2007).

TLRs (Toll like receptors) são uma família de receptores PRRs que se caracterizam por serem proteínas transmembranicas contendo um domínio rico em leucina em sua porção extracelular, compondo o sítio de ligação ao PAMP. Foram descritos 10 diferentes TLRs para humanos, cada um com especificidade para diferentes PAMPs (Tukhvatulin *et al.* 2010). O reconhecimento de PAMPs via TLR leva à ativação da transcrição de genes que codificam citocinas, quimiocinas, moléculas co-estimulatórias e apresentadoras de antígeno (Kawai & Akira 2011) (Aliprantis *et al.*

1999). O reconhecimento de PAMPS via TLR funciona como um sensor primário do sistema imune inato, cuja sinalização leva à ativação posterior da imunidade adaptativa, bem como células não imunes como fibroblastos e queratinócitos, importantes para a regeneração das lesões teciduais causadas por agentes infecciosos (Basith *et al.* 2011). Na hanseníase, o heterodímero TLR2/1 é ativado por lipoproteínas triaciladas, como a LAM (Takeuchi *et al.* 2002), enquanto o heterodímero TLR2/6 é ativado por lipoproteínas diaciladas do *M. leprae* como lipoproteína de 33 kDa (Yamashita *et al.* 2004).

O heterodímero TLR2/TLR1 é crucial na resposta imune inata contra o *M. leprae*. A ativação do TLR2 /1 ou TLR2/6 por lipopeptídeos do *M. leprae* desencadeia em macrófagos a produção das citocinas TNF-α□□, IL-12, GM-CSF e regula positivamente de forma autócrina a expressão de receptores TLRs (Krutzik *et al.* 2005). A ativação do TLR2 /1 promove também a proliferação de células dendríticas (Krutzik *et al.* 2003). O heterodímero TLR1/TLR2 está mais expresso em lesões tuberculóides do que em lesões lepromatosas (Yamashita *et al.* 2004). As citocinas IFNγ, IL-12 e IL-18 estimulam a expressão de TLR2/TLR1 em macrófagos de pacientes com hanseníase (Montoya & Modlin 2010). Apesar de ser crucial para defesa contra o *M. leprae*, a estimulação excessiva de TLR2/1 está relacionada com aumento da lesão tecidual, inclusive danos nos nervos periféricos, na hanseníase (Oliveira *et al.* 2003). A IL-10 inibe a ativação de macrófagos e a IL-4 diminui a expressão de TLR2/TLR1 em fagócitos de pacientes com hanseníase (Montoya & Modlin 2010).

SNPs nas regiões codificadoras das moléculas de TLR1 e TLR2 estão geralmente associados a uma maior suscetibilidade a hanseníase (Montoya *et al.* 2009). Um estudo de 2007 mostrou que o SNP I602S no gene TLR1 está associado a uma diminuição da incidência de hanseníase (Johnson *et al.* 2007). Porém um trabalho mais recente mostra que o SNP I602S no gene TLR1 está fortemente associado a aumento da suscetibilidade a hanseníase (Wong *et al.* 2010). O SNP 248SS TLR1 está associado com a manifestação de formas TT e BT (Schuring *et al.* 2009). Um estudo realizado na Etiópia mostrou que o SNP no gene do TLR2 estava associado com suscetibilidade à hanseníase lepromatosa (Bochud *et al.* 2008).

Outros receptores da família TLR parecem correlacionar-se com a resistência ou suscetibilidade a hanseníase. O receptor TLR9 reconhece CpG DNA não metilado micobacteriano (Bafica *et al.* 2005). SNPs do gene codificador da molécula TLR9

foram demonstrados estar associados a predisposição ao desenvolvimento de forma lepromatosa de hanseníase (Krutzik *et al.* 2005). Por outro lado, SNPs na molécula TLR4, que se liga a HSP-20 (proteína do choque térmico) do *M. leprae*, estão relacionados ao desenvolvimento da forma tuberculóide de hanseníase (Bochud *et al.* 2009). É provável que TLR8 também esteja relacionado à defesa contra o *M. lepra,* já que foi descrita uma associação entre polimorfismos no gene de TLR8 e resistência a tuberculose (Montoya & Modlin 2010).

O receptor NOD2 (nucleotide binding oligomerization domain 2) é um receptor citoplasmático pertencente da família NOD-like. A ativação de NOD2 ocorre pela ligação a dipeptídeos muramil (MDP) presentes no peptidoglicano de varias bactérias, inclusive o *M. leprae.* O NOD2 ao reconhecer o MDP sinaliza por meio da molécula adaptadora RIP2 (receptor interacting protein-2) e pelas caspases CARD6 e CARD9 (caspase recruitment domain-containing protein 6 e 9) (Hsu *et al.* 2007). Um estudo de associação de genoma completo (genomewide association study) realizado em 706 pacientes com hanseníase e 1225 controles saudáveis recrutados no leste da China. observou uma associação significativa (P< 0,001) entre a manifstaçaoo de hanseníase multibacilar e SNPs nos genes CCDC122, C13orf31, NOD2, TNFSF15, HLA-DR e RIPK2 e uma tendência para uma associação com um SNP no gene LRRK2. Esse estudo defende que os SNPs em NOD2 e RIP2 estão entre os mais relevantes no aumento da suscetibilidade a hanseníase multibacilar (Zhang *et al.* 2009).

Outra proteína que parece ter relação com as diferentes formas de manifestação da hanseníase é o receptor de vitamina D (VDR) (Liu *et al*. 2007). A IL-15 induz a ativação da enzima CYP27b1, que converte a pró-vitamina D (2,5-di-hidroxicalciferol) em Vitamina D ativa (1,25-di-hidroxicalciferol). A forma ativa da vitamina D induz a diferenciação de monócitos em macrófagos ativos. A estimulação de TLR2/1, na presença de IL-15 regula positivamente a expressão de VDR (Krutzik *et al*. 2008). A VDR é importante na produção de defensinas e catalecidinas por macrófagos e está aumentada em pacientes TT/BT em comparação a pacientes LL/BL (Sapkota *et al*. 2010, Prado-Montes *et al.* 2009). SNPs nos genes codificadores das molécula do VDR ou na via metabólica da defensinas β1 (DEFB1) estão associados à forma lepromatosa da hanseníase (Montoya *et al*. 2009, Goulart *et al*. 2006)

Vários mecanismos permitem a sobrevivência do *M. leprae* dentro do macrófago, entre eles estão a inibição da atividade de intermediários reativos do

oxigênio (ROI) no interior dos macrófagos pelo PGL-I (Chan *et al.* 1989) e a expressão de enzimas superóxido-dismutases que impedem a ação de ROIs e RNIs (Abdel-Hafez *et al.* 2010).

Além dos macrófagos, as células dendríticas (DCs) são APCs (células apresentadoras de antígenos) que desempenham um papel fundamental na modulação da resposta imune inicial no local da invasão pelo *M. leprae* (de Souza *et al.* 2011). As DCs são provavelmente as primeiras células do sistema imune a entrar em contato com o *M. leprae* (Modlin *et al.* 1984). As DCs podem apresentar antígenos protéicos via MHC de classe I e MHC de classe II ou antígenos glicolipídicos via CD1 para linfócitos γδ (Sieling *et al.* 1999).

A captação dos bacilos e a produção subseqüente de citocinas pelas DCs regulam a inflamação local e induzem a polarização da resposta imune para Th1 ou Th2 (de Souza *et al.* 2011). As DCs de pacientes com hanseníase tuberculóide, assim como seus macrófagos ativados, podem produzir citocinas pró-inflamatórias, como a IL-12, que estimularão uma resposta imune do tipo Th1. Porém as DCs infectadas com *M. leprae* de pacientes com a forma lepromatosa produzem IL-4 e IL-10, polarizando a resposta para o pólo Th2 (Maeda *et al.* 2003). Expressão da proteína co-estimulatória B7.1 também está diminuída em pacientes LL (Santos *et al.* 2001). Observa-se uma grande expressão da enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), que suprime a apresentação de antígenos do *M. leprae* para células T, nesses pacientes MB (de Souza *et al.* 2011). DCs diferenciam-se a partir de precursores mielóides, um processo que pode ser interrompido por receptores inibitórios como o excesso de fosfolipídios oxidados encontrados nas lesões LL (Lee *et al.* 2007). Monócitos periféricos de pacientes LL não se diferenciam em DCs $CD1^+$ (Krutzik *et al*. 2005). Lesões LL/BL apresentam um déficit acentuado nas DCs, tanto na derme quanto na epiderme (Sieling *et al.* 1999, Modlin 2010).

As células NK (natural killer) raramente são observadas nas lesões de pacientes com hanseníase e não há diferença estaticamente significativa na quantidade de células NK em pacientes paucibacilares quando comparado com pacientes multibacilares (Modlin *et al.* 1986). Porém ao se coletar células NK periféricas e testá-las *in vitro* em ensaios com macrófagos infectados com *M. leprae*, as células NK de pacientes TT/BT, mas não as células NK de pacientes LL/BL/BB respondem produzindo IFNγ, granzima e perforina (Chiplunkar *et al.* 1990).

Em lesões de pacientes com hanseníase observa-se uma clara diferença na proporção de linfócitos T_{CD8^+} e T_{CD4^+}. Nas lesões de pacientes TT os linfócitos T encontram-se justapostos a macrófagos ativados, dentro e nas proximidades de granulomas e são geralmente observados em uma proporção de 1,9 células T_{CD4^+} para 1 célula T_{CD8^+}. As células T_{CD4^+} encontram-se distribuídas por todo granuloma enquanto que as T_{CD8^+} são geralmente encontradas na periferia da lesão. Nas lesões TT, tanto as células T_{CD8^+} quanto T_{CD4^+} produzem grandes quantidades de IFNγ (Modlin *et al.* 1986). Em pacientes com a forma tuberculóide as células T_{CD8^+} produzem grandes quantidades de perforina, granzima e granulisina (Modlin & Rea 1988). Em contraste, nas lesões de pacientes LL as células T são encontradas na proporção de 0,6 T_{CD4^+} para 1 T_{CD8^+} e ambos os fenótipos de linfócitos T estão distribuídos de forma desorganizada por toda lesão e não nas proximidades dos macrófagos infectados (Modlin *et al.* 1986). Uma outra diferença nas lesões LL é a grande quantidade de IL-4 produzida pelos linfócito T_{CD4^+} e principalmente por T_{CD8^+} (Modlin 1994). Aproximadamente uma em cada 50 células T retiradas de lesões de pacientes PB se prolifera em resposta ao *M. leprae, in vitro.* Porém apenas 1 em cada 400 células T de pacientes MB se proliferam em resposta ao *M. lep*rae, *in vitro* (Sabet *et al.* 2007). Alguns estudos mostram que tanto células T_{CD8+} e quantos T_{CD4+} podem atuar como células citotóxicas nas lesões de hanseníase, pois ambas conseguem induzir apoptose de macrófagos infectados pelo *M. leprae* via perforina, granzima e granulisina (Chiplunkar *et al.* 1990).

Dentre as células reguladoras do sistema imune a mais estudada atualmente é a célula T $Foxp3^+$ (Massone *et al.* 2010). Esta subpopulação de células T_{CD4+} expressa constitutivamente a cadeia do receptor α da IL-2 (CD25) na membrana plasmática e fator de transcrição nuclear FOXP3. Essas células são essenciais para prevenir a auto-imunidade e também regulam respostas imunes exacerbadas, pela produção de citocinas como IL-10 e TGF-β ou por contato célula a célula, suprimindo assim a ativação de células T_{CD4+} e T_{CD8+} (Fontenot *et al.* 2003). Mas o papel das células T reguladoras $Foxp3^+$ (Treg) ainda é pouco conhecido na hanseníase. Estudo recente mostrou uma maior quantidade de células Treg na lesão de pacientes TT quando comparados a pacientes LL. De acordo com este estudo, a atividade reguladora das células Treg seria benéfica para pacientes com hanseníase TT, pois impediria uma ação lesiva excessiva do sistema imune aos tecidos infectados (Attia *et al.* 2010). Um estudo de análise por imunohistoquímica na lesão de 38 pacientes com diversas formas de hanseníase

mostrou que em média 2,9% das células T_{CD4+} presentes nas lesões dos pacientes eram $Foxp3^+$. O estudo não observou diferença estatística na contagem de células T regs nas formas TT, BT, BL e LL de hanseníase. O estudo observou ainda que as células $Foxp3^+$ se encontravam fora do granuloma (Massone *et al.* 2010). Apesar de atualmente se admitir a existência de varias outras células com fenótipo regulador como Tr1 produtora de IL-10 (CD4+Foxp3-) as publicações de células T reguladoras na hanseníase tem se restringido atualmente as Tregs $Foxp3^+$ (Attia *et al.* 2010).

Pacientes com hanseníase lepromatosa apresentam uma grande quantidade de células Th2 em suas lesões (Montoya *et al.* 2009). As células Th2 produzem as citocinas IL-4, IL-5 e IL-10 que são supressoras da atividade macrofágica e bloqueiam a estimulação de células Th1 (Sieling & Modlin 1994). A IL-4 é uma citocina encontrada principalmente nas lesões de pacientes LL/BL e é produzida tanto por macrófagos quanto por linfócitos T_{CD8+} e T_{CD4+} (Modlin & Rea 1988). A IL-4 estimula a produção local de IL-5, IL-10 e regula negativamente a expressão de TLR2/1 (Krutzik *et al.* 2003). A IL-4 estimula ainda a expressão de CD209 em células de Schwann, que facilita a entrada do *M. leprae* na célula de Schwann (Teles *et al.* 2010). A produção de IL-4 é fortemente estimulada pelo PGL-I em paciente MB (Sharma *et al.* 1998).

A IL-5 é produzida pelas células Th2 nas lesões de pacientes LL/BL (Yamamura *et al.* 1991). A IL-5 provoca um grande aumento de anticorpos IgM no sangue periférico e nas lesões de pacientes MB e ainda auxilia na ativação de células B em plasmócitos (Ochoa *et al.* 2010). A IL-5 inibe fortemente a produção de TNF-α e IL-12 e estimula a produção de IL-4 pelos macrófagos, em resposta ao *M. leprae* (Verhagen *et al.* 1999).

A produção de IL-10 por DCs ocorre após reconhecimento de antígenos do *M. leprae* via receptor de lectina C e Scanvager, em pacientes lepromatosos (Montoya *et al*. 2009). A secreção de IL-10 é fortemente estimulada por lipídeos oxidados do *M. leprae* (Cruz *et al.* 2008). A IL-10 inibe fortemente a produção de substâncias microbicidas como reativos de oxigênio, óxido nítrico e catalecidinas em macrófagos infectados pelo *M. leprae*. A IL-10 inibe ainda a expressão de MHC de classe II, assim como a produção de IL-12 por células dendríticas e macrófagos (Sieling *et al.* 1993). A IL-10 não tem efeito sobre expressão TLR2/1, mas inibe a liberação de citocinas TNF-α e IL-12 induzidas por TLR2/1 (Krutzik *et al.* 2003). A IL-10 permite ainda a entrada de um numero maior de *M. leprae* nos macrófagos (Montoya *et al*. 2009).

A resistência à infecção pelo *M. leprae* está fortemente condicionada à polarização da resposta imune para o tipo Th1 (Yamamura *et al.* 1991). A IL-12 estimula fortemente a expressão de moléculas co-estimulatórias e dos MHCs de classe 1 e 2 em DCs. A IL-12 é a principal citocina responsável pela polarização Th1 em pacientes tuberculóides (Maeda *et al.* 2005). A IL-12 é secretada por células dendríticas e macrófagos em resposta principalmente a antígenos do *M. leprae* em pacientes TT, após reconhecimento por TLR2 (Sieling *et al.* 2008). A IL-12 também é fortemente produzida por macrófagos após a interação CD40 e CD40L (Yamauchi *et al.* 2000). O acrécimo de IL-12 faz com células T de pacientes lepromatosos passem a produzir IFNγ *in vitro* (Lopez Roa *et al*. 2008). A IL-12 estimula forte produção de interferon gama (IFNγ) pelos linfócitos T_{CD4+} e T_{CD8+} na lesão de pacientes PB e inibi a secreção de IL-4 por macrófagos, células dendríticas e linfócitos (Sieling & Modlin 1994). A IL-12 inibe a expressão de LILRA2, que se liga ao PGL-I inibindo a ativação de DCs (Lee *et al.* 2007).

O TNF-α é crucial na manutenção da ativação macrófagos e células Th1, sendo a principal citocina responsável pela manutenção da granuloma em pacientes com hanseníase tuberculóide (Modlin & Rea 1988). O TNF-α é secretado por macrófagos em resposta a antígenos do *M. leprae,* como PGL-I (Dhungel *et al.* 2008). O TNF-α também pode ser secretado por linfócitos T_{CD4+} em resposta a antígenos de parede do *M. leprae* (Kamble *et al*. 2010). TNF-α pode estimular a síntese de metaloproteinases em células de Schwann e potencializar o surgimento de neuropatias na hanseníase (Oliveira *et al.* 2010).

A IL-2 é produzida principalmente pelas células T $_{CD4+}$, em pacientes TT, mas não por pacientes LL (Rea & Modlin 1989). A IL-2 ativa receptores dos linfócitos Th1 responsáveis pela manutenção da produção de citocinas e estimula a expansão clonal (Yamamura *et al.* 1991). A produção de IL-2 é fortemente inibida por antígenos do *M. leprae,* como PGL-I (Sharma *et al.* 1998) e o LAM (Dagur *et al.* 2010) em pacientes lepromatosos.

O IFNγ é produzido tanto por células T_{CD4+} quanto por células T_{CD8+} em resposta a antígenos protéicos (Modlin *et al.* 1988). O IFNγ também pode ser produzido por células Tγδ em resposta a glicolipídeos, em pacientes TT/BT (Sieling *et al.* 2005). A produção de IFNγ é fortemente estimulada pela citocina IL-12 (Sieling &

Modlin 1994) e pela interação CD40/CD40L (Yamauchi *et al.* 2000). O IFNγ age sobre macrófagos, estimulando a fagocitose e os mecanismos de ativação celular como expressão de MHC de classe I e II, processamento, destruição, digestão e apresentação de antígenos do *M. leprae*, produção de óxido nítrico e intermediários reativos de oxigênio (Sieling & Modlin 1994). O IFNγ é o mais potente inibidor da diferenciação de células T naive em células Th2 (Yamamura *et al*. 1991). O IFNγ estimula fortemente a expressão de TLR1/TLR2 (Montoya & Modlin 2010). Na ausência de IFNγ, macrófagos deixam de produzir IL-12 e passam a produzir IL-10 (Libraty *et al.* 1997). O IFNγ é importante na manutenção do granuloma, inibe a secreção de IL-4 e IL-5 por macrófagos e a produção de anticorpos por linfócitos B (Sieling & Modlin 1994). O IFNγ é a citocina produzida em maiores quantidades por PBMCs (células mononucleares sanguíneas periféricas) de pacientes PB em resposta a antígenos brutos do *M. leprae* (Venturini *et al.* 2011).

Reações hansênicas

A evolução clínica crônica da hanseníase pode ser interrompida por episódios inflamatórios agudos denominados episódios reacionais, que podem ocorrer nos pacientes virgens de tratamento, durante ou após a terapia específica (Naafs 1992). A reação tipo I (RTI) ou Reação Reversa ocorre em pacientes borderline, principalmente nas formas BT e BB, ocasionalmente em pacientes TT. O fator desencadeador da exacerbação da resposta do tipo Th1 não é conhecido (Scollard *et al.* 1994). A RTI manifesta-se clinicamente pelo aparecimento de novas lesões ou exacerbação das lesões/neurites pré-existentes. Estes sintomas podem vir acompanhados por infiltração, aumento de temperatura local e dores articulares. Em casos mais graves a RTI pode causar necrose de pele, ulceração e paralisia dos membros inferiores/superiores (Naafs 1992). A RTI é desencadeada por exacerbação da resposta imune celular do tipo Th1 contra o *M. leprae*, com aumento local das citocinas IFNγ, TNF-α (Yamamura *et al*. 1992, Moraes *et al.* 1999), IL-8, IL-12, IL-6 (Moraes *et al.* 1999), IL-2 (Yamamura *et al*. 1992) e sistemico das citocinas IL-1, TNF-α (Sarno *et al.* 1991), IFNγ (Sreenivasan *et al.* 1998), IL-2, IL-8 (Moraes *et al.* 1999) e IL-6 (Stefani et al. 2008). O tratamento de escolha para reação reversa é a corticoterapia, conforme normas da OMS (WHO 1994).

A reação tipo II (RTII) geralmente se manifesta como eritema nodoso hansênico e geralmente ocorre em pacientes BL ou LL. A RTII manifesta-se clinicamente por nódulos eritematosos disseminados dolorosos e acompanhados de febre, mal-estar, sudorese, caquexia, ataxia, náuseas, vômitos e mialgia (Naafs 1994). A RTII parece se originar de uma ativação transitória da resposta imune Th1 com inflamação sistêmica (Scollard *et al.* 1994). Embora ocorra em pacientes que manifestam resposta imune do tipo Th2, vários estudos têm demonstrado altas concentrações dos níveis circulantes de das TNF-α (Sarno *et al.* 1991), IFNγ, IL-2 (Moraes *et al*.1999), IL-6, IP-10 (Stefani et al. 2008), IL-10 (Sreenivasan *et al.* 1998) e locais de TNF-α, IFNγ, IL-2 (Moraes *et al*.1999) e além das citocinas IL-10 e IL-4 (Nath *et al.* 2000). O tratamento da RTII consiste principalmente na administração de talidomida, nos casos de pacientes do sexo masculino ou mulheres que não estejam em idade fértil, ou corticosteróides em mulheres em idade fértil (WHO 1994).

A vacina BCG na prevenção da hanseníase

Em vários países endêmicos do mundo, inclusive no Brasil, tem sido realizada uma vacinação de rotina com *Mycobacterium bovis* (BCG – bacilo Calmette-Guérin) para prevenir, por proteção cruzada, a infecção por *M. leprae*. A BCG deve ser aplicada na dose de 0,1 ml em as crianças com idade acima de 3 meses, por via intradérmica no braço direito, na altura da inserção inferior do músculo deltóide (WHO 1996).

Vários estudos foram realizados para avaliar capacidade protetora da BCG contra a hanseníase. Um estudo de coorte na Venezuela avaliou um grupo de indivíduos expostos ao risco de contágio ao *M. leprae* e mostrou uma morbidade de 5,11/1000 habitantes entre os vacinados e 45,7/1000 habitantes entre aqueles não vacinados (Convit 1956). No sul da Índia, um estudo controlado para avaliar a efetividade do BCG na hanseníase, incluiu 27.000 indivíduos que foram seguidos por um período de 12,5 anos. Este estudo detectou o efeito protetor de apenas 10% contra as formas borderline e lepromatosa da hanseníase e de 38% contra a forma indeterminada e tuberculóide (Tripathy 1983). Na Nova Guiné indivíduos sadios de todas as faixas etárias receberem inoculações de BCG ou de placebo. Após 16 anos de acompanhamento, os resultados demonstraram 48% de proteção oferecida pelo BCG contra a hanseníase (Bagshawe *et al.* 1989). Estudo prospectivo realizado no Malawi,

área endêmica para hanseníase e para tuberculose avaliou a efetividade da vacina BCG simultaneamente contra a hanseníase e contra a tuberculose na mesma população. Foi observada maior proteção para a hanseníase (50%) e proteção reduzida para a tuberculose (menos de 5%) (Fine 1988). Em um estudo realizado no Vietnã a proteção conferida pela vacina BCG na hanseníase foi estimada em 29% e não foi observada proteção estatisticamente significativa na comparação entre indivíduos vacinados ou não pela BCG (Abel *et al.* 1990).

No Brasil, Rodrigues *et al*. 1992, pesquisaram 62 casos novos de hanseníase diagnosticados entre escolares e 186 controles pareados em Goiás. A ausência da cicatriz de BCG estava associada à hanseníase, indicando um risco de 5,3 vezes maior de adoecimento para indivíduos não vacinados. Foi observado que a proporção de pacientes paucibacilares que apresentavam cicatriz de BCG foi significativamente superior aos pacientes multibacilares, sugerindo variação da proteção de acordo com as diferentes formas clínicas da hanseníase (Rodrigues *et al.* 1992). Em estudo realizado em São Paulo, foram incluídos 97 pacientes menores de 16 anos diagnosticados como hanseníase e 385 controles pareados por sexo, idade, local de residência e tipo de contato com o caso índice. Os autores estimaram um efeito protetor do BCG para a hanseníase em 80% (Lombardi *et al.* 1995). Um estudo publicado em 2008 avaliou a eficácia da vacina BCG em 5680 contatos de pacientes MB no Rio de Janeiro. Após 18 anos de seguimento os resultados mostraram um efeito protetor de 56% contra a hanseníase (Duppre *et al.* 2008).

Os vários estudos sobre BCG mostram um grau muito varido de proteção. Uma metanálise sobre os efeitos da vacina BCG mostrou que apesar das diferentes dosagens, número de doses, idade da vacinação, tipo de estudo e ano de publicação do estudo, a vacina oferece até 62% de proteção (Setia *et al.* 2006). Outro estudo de metanálise mais recente mostrou um nível de proteção da vacina BCG contra hanseníase de até 55% (Zodpey 2007). De acordo com Fine, a vacinação BCG tem sido parcialmente eficaz em evitar a hanseníase, sendo que o grau de proteção varia significativamente (0-80%) e declina ao longo do tempo. A principal explicação para estas variações são fatores os genéticos das populações estudadas, além dos efeitos imunológicos de exposição a diferentes tipos de micobactérias ambientais (Fine 1996).

Muitas outras micobactérias foram examinadas para o desenvolvimento de uma potencial vacina contra a hanseníase. Porém, essas vacinas demonstraram baixo grau de

proteção (Naito *et al.* 1999; Roche *et al.* 2001). O uso generalizado de uma vacina com bactérias vivas é limitado por preocupações de segurança e pela incapacidade de fabricar grandes lotes reprodutíveis do *M. leprae*. O uso do antígeno bruto do *M. leprae* é limitado pela incapacidade de produzir quantidades suficientes de bacilos para fabricação de uma vacina em larga escala ou uma campanha de intervenção significativa, já que o *M. leprae* é uma bactéria não cultivável em meios de culturas axênicos artificiais (Fine 1996).

Diagnóstico laboratorial da hanseníase

O diagnóstico de hanseníase é baseado na identificação de sinais dermato-neurológicos da doença. Entretanto alguns testes laboratoriais como a baciloscopia e exame histopatológico de biópsia de lesão de pele podem auxiliar no diagnóstico da hanseníase (Yawalkar 2002). O exame histopatológico de biópsia de lesão de pele baseia-se na análise microscópica de cortes de tecidos corados por hematoxilina-eosina visando identificar presença de granulomas de células epitelióides, agressão neural, vasculite na derme e/ou hipoderme, paniculite, infiltrado celular e espessamento de tecidos (Ridley 1955).

A baciloscopia é o exame microscópico que permite identificar a presença de bacilos nos esfregaços de raspados intradérmicos das lesões hansênicas, lóbulos auriculares, cotovelos e/ou joelhos ou material de biópsia, corados pela técnica de Ziehl-Neelsen (Ridley 1955). A carga bacilar é expressa como um índice baciloscópico (IB) que reflete o número de bacilos por campo microscópico em escala logarítmica. Na forma tuberculóide a baciloscopia é geralmente negativa e fortemente positiva na forma lepromatosa (Yawalkar 2002). A especificidade do teste baciloscopico intradérmico, quando realizado por profissional capacitado e bem treinado, é de aproximadamente 100%, sendo a sensibilidade de cerca de 93% para pacientes MB e 35% para pacientes PB (Bloom 1998). Desta forma, um resultado negativo no exame de baciloscopia não afasta o diagnóstico da hanseníase, pois o exame é de baixa sensibilidade para pacientes PB (Ridley & Jopling 1966). Geralmente o material biológico coletado em quatro sítios (lóbulos auriculares esquerdos e direito, cotovelos direito ou esquerdo e lesão) é analisado e a carga bacilar é expressa pelo IB médio dos quatro sítios analisados (Yawalkar 2002). Tanto a baciloscopia quanto o exame histopatológico não são exames

preconizados pela OMS para o diagnóstico da hanseníase, por isso não são realizados de forma rotineira pelos serviços de saúde pública no Brasil (WHO 2006).

A identificação do DNA do *M. leprae* pela reação em cadeia de polimerase (PCR) específica (ML-PCR) pode ser realizada com vários tipos de material biológico como pêlo, sangue, secreção nasal e linfa (Santos *et al.* 1993). Entretanto fragmentos de biópsia de pele e de nervos parecem ser os materiais biológicos mais adequados para a amplificação e identificação do DNA do *M. leprae* (Gillis & Williams 1991; Martinez *et al.* 2006; Sousa *et al.* 2007). A ML-PCR apresenta boa sensibilidade em casos de hanseníase multibacilar, mas é geralmente pouco sensível em casos de hanseníase paucibacilar. Os testes com ML-PCR geralmente apresentam uma especificidade de até 100% e sensibilidade em torno de 95% a 100% em pacientes multibacilares, mas a positividade é geralmente inferior a 50% em pacientes paucibacilares (Santos *et al.* 1993, Sousa *et al.* 2007). A tecnologia de ML-PCR requer equipamentos e infra-estrura de alto custo e não é recomendada como teste diagnóstico da hanseníase e sim utilizada como ferramenta de pesquisa (WHO 2006).

A sorologia anti-PGL-I é um teste altamente específico para hanseníase, que se baseia, principalmente, na detecção de anticorpos da classe IgM anti-PGL-I que não apresenta reação cruzada com *M. tuberculosis* (Cho *et al.* 1983). Porém a sorologia anti PGL-I possui baixa sensibilidade para pacientes paucibacilares, pois pacientes com hanseníase tuberculóide apresentam sorologia negativa ou baixo título de anticorpos. A sensibilidade do teste anti-PGL-I é de até 98% em pacientes MB e de cerca de 35% em pacientes PB (Moura *et al.* 2008). Os títulos de IgM correlacionam-se com a forma clínica, carga bacilar e a atividade da doença (Cellona *et al.* 1993; Stefani *et al.* 1998). Alguns estudos defendem o uso da sorologia anti PGL-I em associação com parâmetros clínicos como ferramenta auxiliar para classificação da hanseníase paucibacilar e multibacilar e no monitoramento dos pacientes multibacilares (Buhrer-Sekula *et al.* 2007, Grossi *et al.* 2008).

A detecção rápida de anticorpos anti PGL-I pode ser feita por um teste rápido no formato de fluxo lateral (ML-Flow), que apresenta como principal vantagem à facilidade de execução em campo, não necessitando de reagentes refrigerados, equipamentos especializados ou mão de obra treinada. O ML-Flow, que apresenta sensibilidade e especificidade semelhantes àquelas do teste ELISA convencional, pode

ser realizado com amostras de sangue total ou soro e a leitura é feita em até 10 minutos (Buhrer-Sekula *et al.* 2003, Buhrer-Sekula *et al.* 2007).

Testes cutâneos para avaliação da imunidade celular ao *M. leprae*

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 bacilos 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). O teste de Mitsuda não deve ser utilizado para o diagnóstico da doença, devido a forte reatividade cruzada contra micobactérias ambientais não patogênicas e a vacinação BCG. O teste de Mitsuda serve apenas para avaliar a presença de resposta imune celular do indivíduo ao bacilo *M. leprae* (Brennan *et al.* 1996).

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 2009; Brennan *et al.* 1996). 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 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 *et al*. 2009).

Avaliação da imunidade celular e humoral a peptídeos e proteínas do *M. leprae*

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 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 (tuberculóide/borderline-tuberculóide) mas não em células de paciente LL/BL (lepromatoso/borderline-lepromatoso). 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).

Antes da decodificação do genoma do *M. leprae* a escassez de reagentes específicos em grande escala, em razão do bacilo não ser cultivável em meios de cultura artificiais axênicos, representou um obstáculo ao desenvolvimento de novos testes diagnósticos para a hanseníase (Stefani 2008). Porém, o sequenciamento genômico completo do *M. leprae* representou um avanço na elucidação da biologia deste bacilo e abriu novas possibilidades de identificação de antígenos que possam ser avaliados como reagentes para diagnóstico laboratorial da hanseníase multibacilar e paucibacilar (Cole *et al*. 2001).

Tendo em vista a necessidade de desenvolvimento de um teste laboratorial para o diagnóstico precoce da hanseníase, foi criado em 2004 o consórcio IDEAL (Initiative for Diagnostic and Epidemiological Assays for Leprosy). O IDEAL representa uma força tarefa internacional com o objetivo de desenvolver testes laboratoriais para o diagnóstico precoce da hanseníase e identificar marcadores moleculares para o melhor entendimento da epidemiologia e transmissão da hanseníase. O IDEAL é formado por

pesquisadores de vários países endêmicos e não endêmicos (Austrália, Bangladesh, Brasil, China, Colômbia, Coréia do Sul, Egito, Etiópia, EUA, França, Holanda, Índia, Indonésia, Inglaterra, Japão, Nepal, Paquistão, Filipinas e Tailândia) (Aseffa *et al*. 2005). A combinação das duas abordagens propostas pelo IDEAL (diagnóstico precoce e estudos epidemiológicos moleculares de transmissão) poderá permitir pela primeira vez o desenvolvimento de intervenções racionais para a prevenção e eliminação da hanseníase (Dockrell *et al.* 2011).

O Laboratório de Imunologia da AIDS e da Hanseníase da UFG (LIAH) foi convidado a compor o Consórcio IDEAL e como tal, tem trabalhado na pesquisa e desenvolvimento de um teste laboratorial para o diagnóstico precoce da hanseníase. Uma das linhas de pesquisa em andamento trata do desenvolvimento de um ensaio laboratorial que avalie a imunidade das células T em resposta a antígenos do *M. Leprae* em formato semelhante ao teste QuantiFERON® TB Gold in Tube, que é um teste comercial para diagnóstico *in vitro* da tuberculose latente. O teste QuantiFERON® TB Gold in Tube utiliza uma mistura de peptídeos oriundos das proteínas ESAT-6, CFP-10 e TB7.7 para estimular as células no sangue total de pacientes com tuberculose latente (Perry *et al.* 2008; Legesse *et al.* 2011). O sistema "QuantiFERON®-TB Gold in Tube" utiliza 3 tubos para coleta de sangue total: um tubo com os antígenos do *M. tuberculosis*, um tubo utilizado como controle negativo e um tubo opcional contendo mitógeno. A incubação do sangue total heparinizado é realizada nos próprios tubos de coleta, durante 16 a 24 horas a 37°C. Após a incubação, os tubos são centrifugados, o plasma é retirado e a quantidade de IFNγ é medida por ELISA. O teste é considerado positivo nos caso em que a resposta de IFNγ frente aos antígenos de TB seja significativamente superior a observada no tubo de controle negativo (Cellestis 2008).

A imunorreatividade celular a 4 proteínas recombinantes do *M. leprae* e 58 peptídeos sintéticos foi avaliada em pacientes com hanseníase e grupos controles do Brasil. Esta avaliação foi baseada na detecção de IFNγ em sobrenadantes de cultura de PBMCs incubadas por 72hs. Dos 58 peptídeos testados, 35 induziram respostas com produção de IFNγ somente nos grupos paucibacilares e contactantes, porém nenhuma das proteínas recombinantes testadas induziram resposta imune especifica (Spencer *et al.* 2005).

Um grupo de 17 proteínas recombinantes do *M. leprae* teve imunogenicidade testada em cultura de PBMCs de pacientes com hanseníase e grupos controles do Brasil

e Nepal. Destas, cinco (ML0576, ML1989, ML1990, ML2283 e ML2567) induziram níveis significantes de IFNγ (mediana da resposta imune celular com produção de IFNγ acima de 50 pg/ml) em pacientes PB e contactantes de pacientes MB. Este estudo mostrou ainda que diferentes populações respondam de forma diferenciada a uma determinada proteína do *M. leprae*, provavelmente devido a diferentes formas alélicas de HLA (Geluk & Ottenhoff 2006).

Araoz *et al.* 2006, testaram a capacidade de doze proteínas recombinantes do *M. leprae* de induzir resposta imune celular em cultura de sangue total de pacientes com hanseníase e grupos controles recrutados no Mali e em Bangladesh. Quatro das doze proteínas testadas ML1553, ML1829, ML0410 e ML0308, foram imunogênicas e específicas induzindo forte resposta celular com produção de IFNγ (mediana da resposta imune celular com produção de IFNγ acima de 50 pg/ml) apenas pacientes com hanseníase PB e contactantes domiciliares. (Araoz *et al*. 2006)

Estudo colaborativo com nosso grupo de pesquisa na UFG avaliou a reatividade humoral contra proteínas recombinantes do *M. leprae* de pacientes com hanseníase e grupos controles do Brasil, Filipinas e Japão (Duthie *et al*. 2007). Esse estudo confirmou as proteínas ML2331 e ML0405 como sendo proteínas imunogênicas e indutoras de resposta sorológica específica. Além disso, a proteína de fusão das proteínas ML2331 e ML0405 denominada LID-1 (Leprosy IDRI Diagnostic), induziu uma resposta imune humoral específica mais potente do que aquelas geradas às proteínas estadas isoladamente. Esses resultados abriram caminho para a avaliação de antígenos gerados pela fusão de proteínas imunogênicas e específicas na tentativa de produzir um antígeno capaz de induzir respostas mais robustas.

Estudo multicêntrico do consórcio IDEAL envolvendo vários países avaliou a imunorreatividade celular à 5 proteínas recombinantes (ML0576, ML1989, ML1990, ML2283 e ML2567) e 22 peptídeos do *M. leprae.* Pacientes com hanseníase multibacilar e paucibacilar e grupos controles foram recrutados no Brasil (Rio de Janeiro e Goiânia), Nepal, Bangladesh, Paquistão e Etiópia. A resposta imune celular foi avaliada pela a produção de IFNγ em sobrenadantes de cultura de PBMC e sangue total. Nenhuma das proteínas recombinantes induziu resposta imune celular específica e os peptídeos induziram fraca ou nenhuma produção de IFNγ nos grupos testados (Geluk *et al.* 2009).

Estudos da era pré e pós-genômica sobre novos antígenos potenciais para o diagnóstico laboratorial da hanseníase (Dockrell *et al.* 2000, Spencer *et al*. 2005, Geluk *et al.* 2005, Araoz *et al*. 2006, Reece *et al*. 2006, Duthie *et al*. 2007, Geluk *et al.* 2009, Geluk *et al.* 2010) que pesquisaram a reatividade de células T a antígenos do *M. leprae*, assim como a padronização de testes para o diagnóstico da tuberculose latente, abriram caminho para a pesquisa e o desenvolvimento testes sensíveis e específicos para serem utilizados no diagnóstico laboratorial da hanseníase paucibacilar.

2. JUSTIFICATIVA

A hanseníase é diagnosticada principalmente com base no aparecimento de sinais clínicos (lesões cutâneas e neurológicas). Esses sinais clínicos podem ser escassos no início da doença, levando ao diagnóstico tardio e muitas vezes equivocado. O uso do teste sorológico anti PGL-I e do exame baciloscópico pode auxiliar no diagnóstico de pacientes com hanseníase MB, porém esses exames são pouco sensíveis para as formas PB. A falta de sensibilidade dos métodos laboratoriais atuais para o diagnóstico precoce da hanseníase PB representa um obstáculo para o controle da doença. Por isso é crucial a realização de estudos que visem identificar antígenos com potencial aplicabilidade no diagnóstico de pacientes.

Até recentemente o desenvolvimento de testes laboratoriais para o diagnóstico da hanseníase foi dificultado pela escassa oferta de antígenos, visto que o *M. leprae* não pode ser cultivado em meios axênicos. Entretanto, a decodificação do genoma completo do *M. leprae*, juntamente com o advento de novas ferramentas de biologia molecular e de bioinformática tem permitido a produção de proteínas recombinantes do *M. leprae* e sua avaliação como antígenos potenciais para o diagnóstico da hanseníase.

No ano de 2004 a Prof[a]. Mariane Stefani e o Laboratório de Imunologia da AIDS e da Hanseníase (LIAH), no IPTSP, foram convidados a compor o IDEAL, um consórcio internacional de pesquisa cujo um dos principais objetivos é o desenvolvimento de testes laboratoriais para o diagnóstico da hanseníase. Como parte dessa força tarefa, o LIAH tem dedicado grande parte dos seus esforços a pesquisa de antígenos com potencial aplicabilidade no diagnóstico da hanseníase paucibacilar.

Os resultados do presente estudo, sobre a imunorreatividade celular a proteínas recombinates do *M. leprae*, poderão auxiliar no desenvolvimento de novos testes laboratoriais para o diagnóstico da hanseníase paucibacilar, contribuindo assim para evitar a progressão da doença e o consequente surgimento de incapacidades e deformidades físicas causadas pela hanseníase.

3. **OBJETIVOS**

III.a) Objetivo Geral

Identificar proteínas recombinantes do *M. leprae* com potencial aplicação no diagnóstico laboratorial da hanseníase paucibacilar.

III.b) Objetivos Específicos

1. Testar a imunoretividade celular de proteínas recombinantes do *M. leprae,* avaliada pela produção de IFNγ, pelo ensaio de sangue total (EST) em pacientes com hanseníase PB e MB, contactantes domiciliares (HHC) de pacientes MB, indivíduos saudáveis e pacientes com TB, recrutados em área endêmica para hanseníase.
2. Avaliar a utilidade das análises *in silico* para previsão da especificidade e imunogenicidade a proteínas recombinantes do *M. leprae*.
3. Pesquisar qual citocina/quimiocina é o melhor marcador imunológico da resposta imune celular a proteínas recombinantes em pacientes com hanseníase PB.
4. Determinar se outra citocina/quimiocina, que não o IFNγ, pode servir como marcador imunológ□ico da resposta de células T a proteínas recombinantes do *M. leprae* em pacientes MB.
5. Pesquisar se há algum marcador (citocina/quimiocina) que diferencie a resposta imunológica de contatos domiciliares e pacientes PB, determinando dentro do grupo de indivíduos expostos sob risco de infecção aqueles que têm resposta imune celular protetora daqueles que poderão manifestar clinicamente a hanseníase.

4. APRESENTAÇÃO DOS MANUSCRITOS

Este trabalho de conclusão de doutorado, apresentado em formato de artigos, representa uma continuidade da linha de pesquisa do Laboratório de Imunologia da Aids e da Hanseníase. O tema abordado é a avaliação da reatividade imunológica de novos antígenos do *M. leprae* e a identificação de novos marcadores imunológicos aplicáveis ao diagnóstico da hanseníase. O foco de estudo durante meu doutoramento foi a avaliação da imunoreatividade celular de novas proteínas do *M. leprae*, visando identificar proteínas que tenham potencial aplicação no diagnóstico laboratorial da hanseníase paucibacilar.

O primeiro artigo apresentado (publicado no Clinical and Vacine Immunology em 2009) avaliou a resposta imune celular baseada em produção de IFNγ, em ensaio de sangue total. Foram testadas neste estudo 14 diferentes proteínas recombinantes do *M. leprae* em pacientes com hanseníase e controles. Parte dos resultados deste artigo foi obtida durante o meu mestrado. Entretanto após a defesa do mestrado e ingresso no doutorado, os grupos de estudo incluindo pacientes com hanseníase e controles foram significativamente expandidos. Os grupos de participantes MB, TB e CE foram ampliados de 10 participantes para 19, o grupo HHC foi ampliado de 13 para 22 e o grupo de pacientes PB foi ampliado de 13 para 23 participantes. Além disso, novas análises estatísticas foram realizadas levando a reclassificação de algumas proteínas recombinantes do *M. leprae* quanto a sua reatividade imunológica. Ressalto que a redação do artigo e submissão do mesmo ocorreram durante meu doutoramento e como integra da mesma linha de pesquisa, este artigo foi incluído como parte do trabalho final de doutoramento.

O segundo artigo (publicado no BMC Infectious Diseases, 2011) pesquisou a reatividade imunológica de um painel de 33 proteínas recombinantes do *M. leprae* em pacientes com hanseníase e controles. Além disso, este estudo avaliou a utilidade de algumas análises computacionais para prever a reatividade/ especificidade da resposta imune.

O terceiro artigo está apresentado na forma de manuscrito submetido para publicação. Este estudo pesquisou biomarcadores da resposta de células de T de pacientes com hanseníase PB, MB e contactantes após estimulação de sangue total com proteínas recombinantes do *M. leprae.* Foi realizado ensaio multiplex com mensuração simultânea de 14 citocinas/quimiocinas induzidas pela estimulação com proteínas

recombinantes do *M. leprae*. Este estudo buscou identificar um marcador imunológico capaz de distinguir a resposta imune celular de contactantes da resposta imune de pacientes PB.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

Grupos de estudo e grupos controles. Para a análise da resposta imune celular às proteínas recombinantes do *M.leprae* foram recrutados tres grupos de estudo (Paciente PB; Pacientes MB; Contatos domiciliares [HHC] saudáveis de pacientes MB) e dois grupos controles (pacientes com tuberculose [TB] e controles endêmicos [CE] saúdaveis). Os pacientes com hanseníase foram recrutados no Centro de Referência em Diagnóstico e Terapêutica em Goiânia, Goiás, Brasil. Os pacientes com hanseníase foram categorizados por meio de observações clínicas, baciloscópicas e histopatológicos, realizado por pessoal qualificado. Pacientes PB apresentavam baciloscopia negativa e foram confirmados como TT/BT e pacientes MB tinham baciloscopia positiva e foram confirmados como LL/BL por exames clínicos e histopatológicos. Os individuos do grupo HHC foram definidos como os adultos que viviam na mesma casa com um caso-índice MB há pelo menos seis meses antes da coleta de sangue. O recrutamento e a coleta de sangue dos contatos foram realizados mediante visitas domiciliares, após autorização do caso índice MB. Para o grupo controle EC foram recrutados indivíduos saudáveis, que nunca tinha tido tuberculose, não tinham histórico de hanseníase na família e eram residentes em Goiânia, área endêmica para hanseníase. O grupo controle TB foi composto por pacientes com tuberculose pulmonar, HIV-negativos, com escarro positivo para BAAR, entre o 3º e o 6º mês de tratamento específico para tuberculose.

Antígenos. Quarenta e três proteínas recombinantes do *M. leprae* foram avaliadas quanto à reatividade imune celular: ML0022, ML0051, ML0091, ML0098, ML0176, ML0276, ML0393, ML0398, ML0405, ML0489, ML0491, ML0540, ML0541, ML0543, ML0810, ML0811, ML0840, ML0953, ML1112, ML1213, ML1383, ML1556, ML1623, ML1632, ML1181, ML1481, ML1633, ML1685, ML2028, ML2044, ML2055, ML2203, ML2331, ML2346, ML2358, ML2380, ML2541, ML2603, ML2629, ML2655, ML2659, 46f e 57f. A clonagem unidirecional por *E. coli* e purificação das proteínas foram realizadas como descrito anteriormente (Reece *et al.* 2005). Resumidamente, o fragmento de DNA codificador das proteínas recombinantes selecionadas, a partir da cepa Thai-53, foram amplificados por PCR. Os produtos amplificados foram ligados ao vetor de expressão pET28a (Novagen, Madison, WI, EUA) e o produto desta ligação transformado em células XL10G (Stratagene, Saint Claire, CA, EUA). Os plasmídeos

recombinantes continham um sitio alvo com seis histidina na porção N-terminal, seguido pelo gene de interesse do *M. leprae* e um sítio de clivagem. Os plasmídeos foram inseridos e transformados em células *E. coli* BL21 (DE3 - pLysS) (Novagen) e as linhagens recombinantes foram cultivadas a 37ºC, "overnight", em meio Agar Yeast Tryptona (BD Difco, Franklin Lakes, NJ) e induzidas pela adição de 1mM de IPTG. Posteriormente as proteínas recombinantes foram purificadas por cromatografia de afinidade em sistema de purificação automatizado em coluna de sefarose/agarose "HisTrap™" (GE Healthcare, Waukesha, WI). A pureza das proteínas recombinantes foi avaliada por SDS-PAGE 12% e a concentração determinada utilizando o kit BCA para quantificação de proteínas (Pierce, Rockford, IL). Os níveis de endotoxinas (menores que 100 EU/mg por proteína) foram mensurados pelo ensaio "Limulus Amebocyte Lysate QCL-1000 assay" (Lonza Inc., Basel, Switzerland). As proteínas recombinantes usadas neste estudo foram produzidas pelo IDRI (Infectious Disease Research Institute).

Genómica comparativa e previsões de imunogenicidade de epítopos. As seqüências de aminoácidos das proteínas do *M. leprae* avaliadas neste estudo foram obtidos a partir dos sites Leproma (http://genolist.pasteur.fr/Leproma/) e CDS SANGER. A porcentagem de identidade de aminoácidos de cada proteína recombinante de *M. leprae* foi comparada, por BLAST protêomico, com proteínas homólogas em outras 8 micobactérias com potencial de infectar os seres humanos: *M. tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium ulcerans*, *Mycobacterium bovis* (BCG), *Mycobacterium paratuberculosis e Mycobacterium microti*. Para a realização do BLAST proteômico, foi utilizado o programa BLAST UniProt (Universal Resource Protein - http://www.uniprot.org), que compara uma dada sequência de aminoácidos com sequências de outras proteínas presentes no banco de dados do NCBI e indica as seqüências de aminoácidos com identidade acima de 30%. A quantidade potêncial epítopos promíscuos de células T presentes nas proteínas recombinates do *M. leprae* foi prevista pelo servidor PROPRED (http://www.imtech.res.in/raghava/propred/). O PROPRED analisa quais epítopos têm maior possibilidade de serem apresentados por moléculas de MHC de classe II, analisando as possíveis ligações químicas dos epítopos a um painel de 51 diferentes formas alélicas de HLA-DR (HLA-DRB1 e HLA-DRB5).

Determinação da reatividade imune celular por ensaio de sangue total (EST) de 24 horas. EST foram realizados com sangue venoso total heparinizado. Dentro de 2 horas após a coleta, o sangue foi adicionado a uma placa de 24 ou 48 poços (450 μl/poço; Sigma, St. Louis, MO) e incubado com antígenos por 24 horas a 37°C e 5% de CO_2. Posteriormente 150 μl de plasma foi coletado e armazenado a -20°C até serem analisados por ELISA. Para cada ensaio, os estímulos foram realizados com 10 μg/ml de proteína recombinante, 10 μg/ml de antigenos de *M. leprae* sonicados (fornecido pelo Dr. John Spencer, Colorado State University, Fort Collins, CO sob contrato N01 NIH AI-25469) ou 1 μg/ml de PHA (Sigma). Como controle negativo foi usado PBS1x.

ELISA para detecacao de IFNγ. kits ELISA para dosagem de IFNγ (QuantiFERON CMI, Cellestis, Carnegie, Austrália e kit eBioscience IFNγ, San Diego, CA) foram utilizado conforme as instruções do fabricante. O limite de detecção do kit QuantiFERON CMI era de 0,05 UI/ml, mas para a interpretação dos dados, foi designado como resultado positivo um ponto de corte arbitrário de 0,5 UI/ml. O limite de detecção do kit eBioscience era de 20 pg/ml, porém foi designado um ponto de corte arbitrário de 50 pg/ml.

Ensaio Multiplex de citocinas. O plasma provenientes do ensaio de sangue total estimulado individualmente com 5 proteínas recombinantes do *M. leprae* foi utilizado para dosar em pg/ml a concentração de 14 citocinas: IFNγ, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-15, IL-17A, IL-23, IL-31, CXCL10/IP-10, CCL11/eotaxina-1 e TNFα. Estas citocinas foram dosadas mediante tecnologia Multiplex usando kit customizado produzido pela Panomics/Affymetrix, Fremont, CA, em aparelho Luminex 100® (Bio Rad, Hercules, CA) de acordo com as instruções do fabricante. Neste ensaio o limite de detecção de cada citocina é de 1 pg/ml.

Análise estatística. O teste de variância não-paramétrica de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar as medianas de IFNγ entre os grupos. O teste de Mann-Whitney foi aplicado para comparação das medianas entre os dois grupos. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando os valores de p foram menores 0,05. As proteínas recombinates foram definidas como indutoras de resposta imune celular específica quando não induziram a produção de IFNγ nos grupos de indivíduos saudáveis de área endêmica e em pacientes com tuberculose.

Artigo 1

Antigen-specific T cell responses of leprosy patients

Artigo publicado na revista Clinical and Vaccine Immunology em novembro de 2008 (Vol. 15, No. 11 – doi:10.1128 / CVI.00234-08).

Antigen-specific T cell responses of leprosy patients

Malcolm S. Duthie[1,2], Wakako Goto[1], Greg C. Ireton1, Stephen T. Reece[1], Lucas H. Sampaio[3], Adriano B. Grassi[3], Ana Lucia M. Sousa[3], Mariane M. A. Stefani[3] and Steven G. Reed[1]

From the [1]Infectious Disease Research Institute, 1124 Columbia St, Suite 400, Seattle, WA 98104, [2]Protein AI, 1102 Columbia St, Seattle, WA 98104 and [3]Tropical Pathology and Public Health Institute, Federal University of Goiás, Goiânia, Brazil.

This work was supported by the American Leprosy Missions (ALM) and UNICEF/UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR) grant #A20509 (MMAS).

Address correspondence and reprint t requests:
Infectious Disease Research Institute, 1124 Columbia St, Suite 400, Seattle, WA 98104, Tel: 206-330-2517; Fax: 206-381-3678; Email address: mduthie@idri.org

Abbreviations used in this paper:

EC, endemic control

HHC, healthy household contact

IQR, interquartile range

MB, multibacillary

MDT, multi-drug therapy

NEC, non-endemic control

PB, paucibacillary

TB, tuberculosis

Running title: Leprosy-associated T cell responses.

Keywords for submission: diagnosis; leprosy; mycobacteria; T cell; vaccine.

Abstract

The identification of human T cell antigens of *Mycobacterium leprae* could improve treatment and help disrupt transmission of leprosy by directing diagnosis and vaccine programs. This study screened a panel of *M. leprae* recombinant proteins for T cell recall responses, measured by IFNγ production, among leprosy patients. After initial studies using peripheral blood mononuclear cells from leprosy patients, we transitioned our studies to simple whole blood assays (WBA) that are more applicable in field or clinical settings. T cell responses generated in WBA from individuals in Goiânia, Brazil, demonstrated that several *M. leprae* antigens (ML0276, ML0840, ML1623, ML2044 and 46f) elicited > 0.5 IU/ml IFNγ and these proteins were classified as immunogenic and leprosy specific. Several of these individual antigens were recognized by cells from more than 60% of Brazilian paucibacillary (PB) leprosy patients and ML0276, ML0840, ML1623 and 46f complemented each other such that 82% of PB patients had strong (>1.25 IU/ml IFNγ) responses to at least one of these proteins. These proteins were also recognized by cells from a significant proportion of the household contacts of MB leprosy patients, but in contrast, few responses were observed in active tuberculosis patients or healthy endemic control groups. Our results indicate several potential candidate antigens useful for either leprosy diagnosis or vaccination, and demonstrate the utility of leprosy WBA that can be broadly applied in clinical or field settings.

Introduction

Leprosy is a chronic disease with a wide range of clinical outcomes. Leprosy patients are predominantly diagnosed by the appearance of disease signs, but they can also be characterized by the physical and histological attributes of skin or nerve lesions, or by their immune response to crude *Mycobacterium leprae* antigens (Scollard *et al.* 2006). Individuals infected with *M. leprae* exhibit wide ranging immunity. One end of this immunologic spectrum comprises paucibacillary (PB) leprosy patients who have strong cellular immunity in the form of a Th1 type response, characterized by antigen-specific IFNγsecretion. This response controls bacterial growth and limits dissemination, typically resulting in a few small and localized lesions. At the other end of the spectrum, multibacillary (MB) patients have poor cellular immunity but potent humoral immunity (Araoz *et al.* 2006a).

Responses of MB patients do not control bacterial growth and infection becomes systemic, typically resulting in disseminated lesions and significant nerve function impairment. Identifying antigens that are the target of the cellular immune response could direct the development of a defined leprosy vaccine (Gelber *et al.* 1994). Despite vigorous efforts, conditions that permit the *in vitro* culture of *M. leprae* bacilli have not yet been identified. This has impaired the ability to produce antigens for research purposes and, until recently, studies of antigen-specific immune responses during the course of the disease have been limited to crude bacterial extracts or a few single *M. leprae* antigens purified from animal extracts (Ngamying *et al.* 2003; Truman and Krahenbuhl 2001). Partial vaccination against *M. leprae* can be achieved with other mycobacteria, but a defined sub-unit vaccine for leprosy is lacking (Convit *et al.* 1992; Gupte *et al.* 1998). Following the recent completion of *M. leprae* and other mycobacterial genomes (Cole *et al.* 2001; Geluk and Ottenhoff 2006), molecular biology and bioinformatic tools have revealed *M. leprae*-specific antigens that may be used for leprosy diagnosis or vaccination.

The current study was designed to simultaneously explore several recombinant proteins for specific T cell reactivity among leprosy patients, and determine the utility of a simple whole blood assay (WBA) for screening of leprosy patients to identify antigens with diagnostic or vaccine potential. Our data indicate that several antigens are recognized by PB leprosy patients and that this reactivity can be revealed in a simple 24h WBA. Determining leprosy-specific targets of the immune response will facilitate diagnosis and vaccine research aimed at controlling leprosy.

Materials and Methods

Subjects and samples. For individuals from a leprosy non-endemic region, leprosy patients and controls (non-endemic controls) were recruited at the Infectious Disease Clinic, Harborview Hospital, Seattle or the Infectious Disease Research Institute, Seattle between 2003 and 2006. For individuals from leprosy endemic regions, leprosy patients, healthy household contacts of MB patients (HHC) and endemic controls (EC) were recruited at Centro de Referencia em Diagnóstico e Terapêutica and Hospital Anuar Auad, Goiânia, Goiás State, Brazil (from March 2006-September 2007). All Brazilian donors had previously been immunized with BCG. With the exception of patients in Seattle, MB and PB leprosy patient blood used in this study were derived from recently diagnosed and previously untreated individuals. Patients were categorized by clinical, bacilloscopic and histological observations (bacterial index, skin lesions, nerve involvement and histopathology) carried out by qualified personnel. PB patients were confirmed as having either TT or BT disease by clinical and histological exams. EC were healthy individuals who had never had tuberculosis, had no history of leprosy in the family, and were living in the leprosy endemic area. HHC were defined as adults living in the same house as an MB index case for at least 6 months prior to blood collection. Blood was obtained from tuberculosis patients (*Mycobacterium tuberculosis*, sputum-positive, HIV-negative individuals with clinically confirmed pulmonary tuberculosis) who were undergoing treatment. All blood samples were obtained after informed consent and after local ethics committee approval in the related country. The composition of the Brazilian study population is summarized in Table 1.

Table 1. Brazilian study population.

Sample categorization (number)	BI (median)	Sex (M/F ratio)	Mean age (range, years)
PB[a] (23)	0	13:09	36.5 (18-58)
MB[b] (19)	2.0	10:10	43.6 (27-72)
HHC (22)	-	11:11	33.6 (20-73)
EC (19)	-	09:10	38.5 (23-73)
TB (19)	-	10:09	38.8 (19-57)

[a] PB group contained 12 TT and 10 BT by histopathologic exam.
[b] MB group contained 6 LL, 6 BL and 8 BB patients by histopathologic exam.

Cloning and purification of target antigens. We have previously used serologic screening of *M. leprae* genome libraries to identify *M. leprae* proteins that may be recognized by the immune response of leprosy patients (Reece *et al.* 2006). To express potential antigens for further evaluation, DNA encoding selected *M. leprae* proteins was PCR amplified from *M. leprae* Thai-53 genomic DNA using *Pfx* DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA). PCR primers were designed to incorporate specific restriction enzyme sites 5' and 3' of the gene of interest and excluded in the target gene for directional cloning into the expression vector pET28a (Novagen, Madison, WI). After PCR amplification, purified PCR products were digested with appropriate restriction enzymes and ligated into pET28a. Sequence verified recombinant plasmids were transformed into the *E. coli* BL21 derivative Rosetta 2 (DE3) (pLysS) (Novagen). Recombinant Histagged protein products were isolated under native (soluble recombinant proteins) or denaturing (8M urea) conditions using Ni-nitrilotriacetic acid metal ion affinity chromatography according to the manufacturer's instructions (Qiagen, Valencia, CA). Affinity-purified protein fractions were analyzed by sodium dodecyl sulfatepolyacrylamide gel electrophoresis and quantified using the BCA protein assay (Pierce, Rockford, IL). Endotoxin levels were measured by Limulus Amebocyte Lysate QCL- 1000 (Lonza Inc., Basel, Switzerland) assay and were all < 100 EU/mg protein. The characteristics of each *M. leprae* protein evaluated in Brazil are summarized in Table 2.

Table 2. Main characteristics of *M. leprae* antigens tested in Brazil [a]

Gene accession no.	Functional classification	Protein type	Size (kD)	Identity with other mycobacterial homolog (%)				
				M. tuberculosis	***M. bovis*** (BCG)	***M. avium***	***M. marinum***	*M. smegmatis*
ML0276	V	hypothetical	16.2	79.0	78	71	70	68
ML0316	I.J.1	transcriptional regulator	21.0	68.8	38	31	39	58
ML0398	III.A	D-ribose-binding	36.9	none	none	none	none	29
ML0541	I.F.1	guanylate kinase	22.6	79.1	77	82	83	78
ML0543	I.B.7	flavoprotein	44.2	87.0	84	83	82	78
ML0840	VI	hypothetical	47.7	none	none	62	none	45
ML1011	VI	hypothetical	14.6	none	30	31	30	28
ML1213	II.C.4	conserved membrane	80.1	76.5	25	28	27	54
ML1623	III.B	hsp90 family	73.8	80.8	77	77	77	none
ML2044	VI	hypothetical	7.9	none	29	62	29	37
46f	n/a	artificial chimeric fusion	46	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

[a] Annotations for gene accession number, functional classification, and protein are according to the Sanger database. Functional classifications: I.B.7, miscellaneous oxidoreductases and oxygenases; I.F.1, purine ribonucleotide biosynthesis; I.J.1, repressors/ activators; II.C.4, conserved membrane proteins; III.A, transport/ binding proteins; III.B, chaperones/ heat shock; V, conserved hypotheticals; VI, unknowns; n/a. not applicable**.**

Determining patient reactivity by stimulation of peripheral blood mononuclear cell (PBMC) and 24 hour whole blood assay (WBA). PBMC were prepared from venous undiluted heparinized whole blood (Greiner). PBMC were resuspended in RPMI-1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 50,000 U penicillin/streptomycin (BioWhittaker, Walkerville, MD) and 10% heat-inactivated human serum (Valley Biomedical Inc., Winchester, VA) and 2 x 10_5 cells were added to each well of a 96-well plate (200 µl total volume/well; Corning Inc., Corning, NY) and stimulated with antigens. After 3 days incubation at 37°C 5% CO_2, then ~100 µl supernatant was collected and stored at -20°C until assayed by ELISA. WBA were performed with venous undiluted heparinized whole blood (Greiner). Within 2 hours of collection, blood was added to each well of a 24-well plate (450 µl/well; Sigma, St. Louis, MO) and incubated with antigens for 24 hours at 37°C 5% CO_2, then ~150 µl plasma was collected and stored at -20°C until assayed by ELISA. For each assay, stimulations were conducted with 10 µg/ml of recombinant protein, 10 µg/ml *M. leprae* cell sonicate

(provided by Dr. John Spencer, Colorado State University, Fort Collins, CO under NIH contract N01 AI-25469) or 1 μg/ml PHA (Sigma).

Cytokine ELISA. IFNγ ELISA kits (either RSG, eBioscience, San Diego, CA or QuantiFERON CMI, Cellestis, Carnegie, Australia) were used according to the manufacturer's instructions. The detection limit of the RSG ELISA kit was 20 pg/ml. For data interpretation, we assigned a positive result as a concentration above an arbitrary cut-off point of 500 pg/ml. The detection limit of the QuantiFERON CMI test was 0.05 IU/ml. For data interpretation, we assigned as a positive result a concentration above an arbitrary cut-off point of 0.5 IU/ml.

Statistical analysis. The Mann Whitney U test was applied for comparison between two groups. The non-parametric Kruskal-Wallis analysis of variance test was used to compare the IFNγ levels among all of the groups. Statistical significance was considered when the *p*-values were < 0.05.

Results

Antigen reactivity in PBMC cultures. We first evaluated *M. leprae* antigens in PBMC stimulation assays with PBMC from blood of leprosy patients who were recruited in Seattle, WA. PBMC were cultured in the presence of antigen for 3 days, and then secreted IFNγ was assayed by ELISA. The antigens tested promoted no or weak IFNγ secretion from negative control cells (from leprosy-negative, PPD-negative individuals), indicating that these antigens do not nonspecifically activate cells and are therefore suitable for use in studies to determine the specificity of leprosy patient responses (Fig. 1A). Cells from MB leprosy patients responded with no or weak IFNγ responses (data not shown). Approximately one-third of the proteins tested, however, induced IFNγ secretion when they were incubated with cells from PB leprosy patients (Fig. 1B and data not shown). The reactivity of these antigens indicates their potential as components of a defined subunit vaccine or a T-cell-based diagnostic leprosy test.

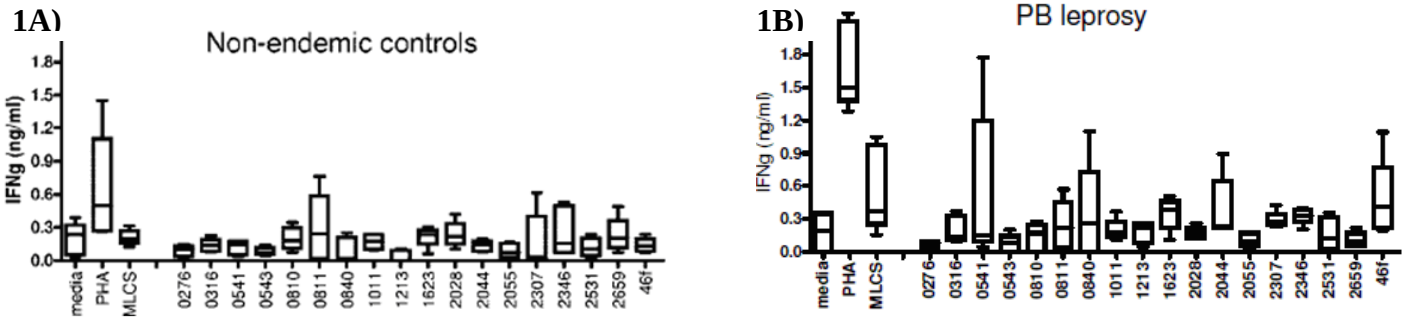


FIG. 1. IFNγ response of PBMC following antigen stimulation. PBMC were stimulated with recombinant antigen for 3 days, culture supernatants were collected, and IFNγ content was assayed by ELISA. PBMC from NEC (Seattle-based) (*n*=5) (A) and PB leprosy patients (*n*=5) (B) were stimulated. The response of each individual is shown in each panel, and results are representative of several individuals per category.

Establishing WBA with recombinant antigens. To establish assays that are simple and more appropriate for field application, we performed WBA. In order to exclude *M. leprae* antigens that stimulate nonspecific or cross-reactive responses in healthy individuals living in nonendemic areas, WBA were performed on 10 Seattle-based volunteers. The stimulants included phytohemagglutinin as a positive control, phosphate buffered saline as a negative control, and for experimentation, recombinant *M. leprae* proteins and crude mycobacterial control preparations (*M. leprae* cell sonicate, *M. tuberculosis* lysate, BCG lysate, and PPD). Some of the antigens that stimulated positive responses in PBMC assays also stimulated blood from NEC to secrete IFNγ (Fig. 2), with 30% of NEC tested responding to ML2531. As such, this antigen will not permit leprosy diagnosis and should not be included as a component of a T-cell diagnostic test for leprosy. Other antigens, such as ML0541 and 46f, stimulated responses in some NEC (30%), so we decided to examine these further in a region where leprosy is endemic. Antigens that stimulated little or no IFNγ production from NEC samples were similarly designated for further evaluation in regions where leprosy is endemic.

2)

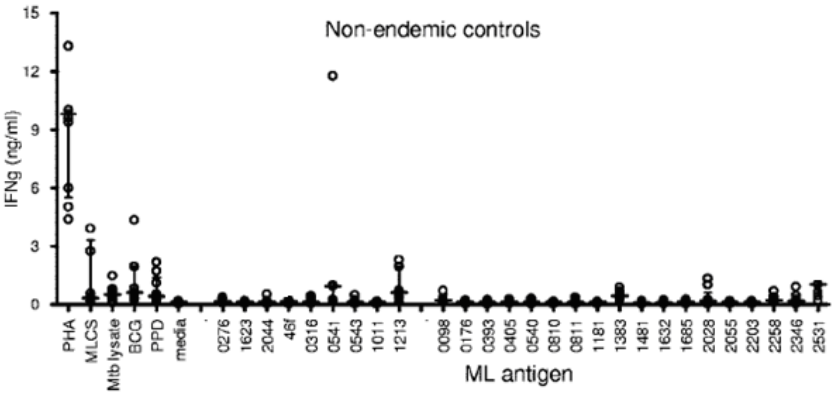


FIG. 2. WBA responses of NEC to *M. leprae* antigens. Whole blood from 10 Seattle-based healthy individuals was cultured for 36 hs in the presence of stimulant, and IFNγ content in the plasma was measured by ELISA. Data are presented as individual data points (open circles), with the lines indicating the median and IQR.

Antigen reactivity in leprosy-endemic regions (Goiânia, Brazil). We then tested a panel of *M. leprae* antigens for reactivity in a site with a high incidence of leprosy (Table 2). The study group in a leprosy endemic region consisted of newly diagnosed, previously untreated, MB and PB leprosy patients in Goiânia, Goiás State, central Brazil, as well as HHC, TB patients under treatment and healthy EC. Proteins were classified according to the pattern of IFNγ recall responses observed among leprosy patients and controls, as shown in Figure 2. Responsiveness was characterized by higher IFNγ production from individuals in the PB and HHC groups, distinct from the lower response among the EC, MB and TB groups. Among PB leprosy cases, ML0276 (19 of 22), ML0840 (13 of 21), ML1623 (13 of 21), ML2044 (9 of 21) and 46f (8 of 21) induced secretion of more than 0.5 IU/ml IFNγ. Interestingly, the same antigens induced IFNγ production among HHC: ML0276 (20 of 22), ML0840 (12 of 22), ML1623 (17 of 22), ML2044 (9 of 22) and 46f (16 of 22). Among the antigens tested, ML0276 was the most potent recombinant protein inducing median values of 1.26 IU/ml IFNγ (IQR = 3.74) among PB leprosy patients and 2.36 IU/ml IFNγ (IQR = 4.83) among HHC. ML0276-induced responses in the PB and HHC groups demonstrated a similar distribution (*p*-value = 0.83). ML0276 provided the best discrimination between the PB and HHC groups compared to the other groups, with no response detected in TB patients or EC (both *p*-value < 0.0001 compared to PB). Protein ML0840 also provided good responses in the test groups, although when compared to ML0276, responses were weaker. The median IFNγ response following ML0840 stimulation among PB leprosy was 0.69 IU/ml for PB, 0.61 IU/ml for HHC and 0.15 IU/ml for MB. Only one EC and

one TB patient responded to ML0840. ML1623 provided a similar pattern of responses, inducing IFNγ secretion among the PB and HHC groups (0.61 IU/ml and 0.68 IU/ml, respectively). TB patients and EC did not respond to ML1623. Following stimulation by each of the individual antigens ML0276, ML0840 and ML1623, a statistically significant difference between the 5 donor groups was observed (all Kruskal-Wallis *p*-values < 0.0001).

There was an indication that other proteins could also discriminate PB leprosy patients and HHC from the other groups, albeit with weaker positive responses that resulted in median IFNγ concentrations below our arbitrary cut-off of 0.5 IU/ml. Following ML2044 stimulation the median IFNγ response of PB patients was 0.20 IU/ml and of HHC was 0.33 IU/ml, whereas the median responses of the MB, TB and EC groups were all below the limit of detection. Chimeric fusion protein 46f (comprising ML0405 and ML0568) stimulated a median IFNγ response for PB of 0.12 IU/ml, for HHC 0.82 IU/ml and for MB 0.20 IU/ml, while TB and EC results were below the limit of detection. Despite the weak responses, a statistically significant difference was again observed among the 5 groups tested with these proteins (Kruskal-Wallis *p*-value < 0.0001).

When data from individuals were analyzed, we found the combination of antigens ML0276, ML0840, ML1623 and 46f complemented each other and was capable of identifying 17 of 21 with an IFNγ response of greater than 1.25 IU/ml, well above our arbitrary cut-off for positive responses. In contrast, in the HHC group, ML0276 alone provided responses of greater than 1.25 IU/ml IFNγ in 15 of 22 individuals tested, and only 46f complemented ML0276 to add another individual with a strong response.

3)

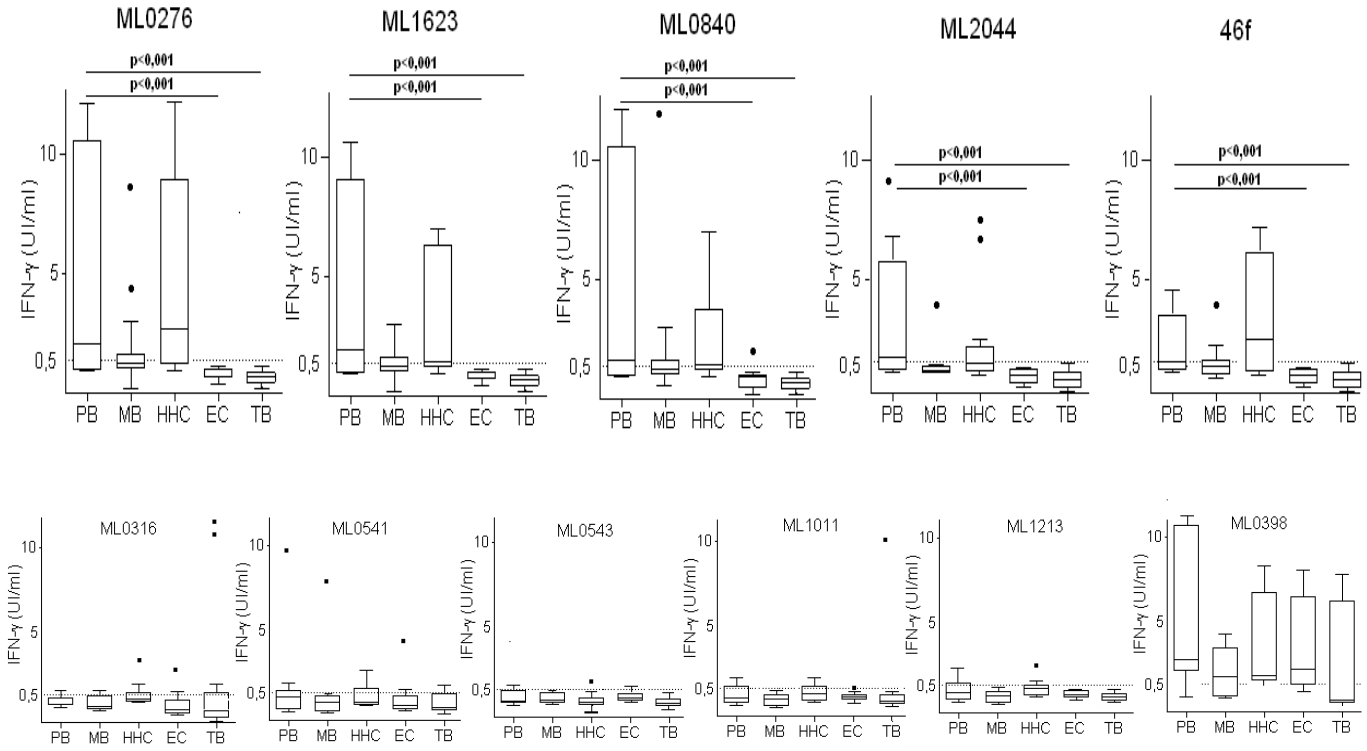


FIG. 3. IFNγ production during WBA of Brazilian study groups. Whole blood from PB, MB, HHC, TB and EC was cultured for 24 hours in the presence of antigen and IFNγ content in the plasma was measured by ELISA. Data are presented as a box plot distribution indicating the median and interquartile range (IQR) of IFNγ IU/ml values.

Discussion

Leprosy research has been constrained by the relative lack of tools with which to analyze the ongoing immune response. This deficiency has also impacted the clinical situation. Leprosy is predominantly diagnosed based on the appearance of clinical signs (dermal and neurological lesions), with patients classified as PB or MB. These clinical signs may be scarce in early disease, leading to delayed diagnosis, under diagnosis or misdiagnosis. While MB leprosy patients can be readily diagnosed by serological antibody tests, diagnosis of PB leprosy patients may require T cell-based assays (Buhrer-Sekula *et al.* 2003; Duthie *et al.* 2007; Oskam *et al.* 2003; Roche *et al.* 1999). In addition to providing data for a T cell-based diagnostic test, the identification of

antigens that are the targets of the cellular response of PB patients, who control bacterial growth, is likely to direct leprosy vaccine research. In this study we examined the antigenicity of numerous *M. leprae* proteins to simultaneously define immune reactivity of leprosy patients with recombinant proteins and determine the utility of a simple WBA for antigen screening of leprosy patients.

In response to the immunogenic proteins, we observed higher production of IFNγ production in the PB and HHC groups. These values that are distinct from the lower response among MB leprosy patients and these reactivity patterns are similar to those reported in other studies (Araoz *et al.* 2006a; Araoz *et al.* 2006b; Geluk *et al.* 2005; Spencer *et al.* 2005; Weir *et al.* 1999). The determination of specificity in leprosy endemic regions may be complicated by the high exposure rates to *M. leprae*, *M. tuberculosis* and other non-pathogenic environmental mycobacteria, in addition to the routine BCG vaccination of children. In the leprosy endemic region examined in this study (Goiânia, Brazil), some level of cross-reactivity was anticipated due to multiple exposures to mycobacteria among the study groups. We did not, however, observe responses in EC or TB groups, indicating that positive responses were related to leprosy exposure.

Interestingly, the extent of homology identified by *in silico* analyses against other mycobacterial genomes/proteins did not indicate the specificity of PB leprosy patient responses in a highly endemic leprosy region. For example, ML0276, despite having 79% identity with its TB homolog, yielded responses only in leprosy groups. In contrast, ML0398, which has no homolog in *M. tuberculosis*, induced strong IFNγ responses in all of the groups tested in Brazil, including TB patients. Additionally, the sequence of ML0840 is 59% identical to *M. paratuberculosis* MAP2122 and stimulation with a peptide representing a predicted epitope within the ML0840 protein has also been shown to elicit IFNγ from cells of leprosy patients (Spencer *et al.* 2005). Similar to the results we present here, the whole ML0840 protein has been shown to stimulate IFNγ responses in Rio de Janeiro-based leprosy patients and HHC, but not EC (A. Geluk, personal communication). Antigen expression levels and availability may determine the immune dominant antigens of each mycobacterial infection, such that differing responses to similar proteins may distinguish each disease. Whatever the reason, our results suggest caution should be used when using *in silico* predictions regarding disease-specific reactivity.

While we did not limit our study to *M. leprae* unique antigens, our study was limited to the examination of leprosy patient responses only in the context of IFNγ secretion. This approach is consistent with that used for the development of TB T cell based diagnostic assays (Pai *et al.* 2004). Several studies, however, have demonstrated differences in circulating cytokine levels such as IL-6 and TNFα in leprosy patients undergoing reversal reactions, albeit in the absence of *ex vivo* antigen stimulation (Hamerlinck *et al.* 1999; Iyer *et al.* 2007; Moraes *et al.* 1999; Sarno *et al.* 1991). It is possible that other T cell-derived cytokines, or even molecules stimulated by IFNγ, may provide either a more robust response for the diagnosis of leprosy patients or greater differences between the study groups.

At a population level, it is possible that diverse ethnic and genetic backgrounds, represented by different MHC haplotypes, contribute to the variability of responses. In partial agreement with data generated in Brazil, however, testing conducted in the Philippines indicated that ML0276 was recognized by some, but not all, PB leprosy patients (unpublished observations). T cell-mediated immunity (as assessed by IFNγ production) to some of the recombinant *M. leprae* antigens tested showed discriminatory recognition of PB and HHC groups from EC, MB and TB groups in both regions, further indicating their potential as candidates for leprosy diagnosis. It is possible that multiple antigens will have to be used to provide diagnosis in a single test format across all leprosy endemic regions, and we are currently initiating studies to address this possibility.

Attempts to produce leprosy vaccines have been limited to the use of proteins extracted from various mycobacteria in the laboratory setting, and until relatively recently, to the use of whole bacteria in the field setting (Convit *et al.* 1992; Gupte 1998; Roche *et al.* 1999). It has been argued, paradoxically, that MB leprosy contacts are both at an increased risk of developing leprosy and are protected from leprosy. HHC are at an increased risk of developing leprosy and may represent early infectious cases before or without the signs/symptoms of leprosy (Bakker *et al.* 2006; van Beers *et al.* 1999). Alternatively, responses in HHC may protect these individuals by preventing infection from becoming established. For the immunogenic proteins, the absence of response among TB patients and EC indicates specific antigen recognition by leprosy-affected individuals and the results are compatible with exposure to *M. leprae* for prolonged periods of time. The identification of molecular indicators of bacterial viability would help address if the antigen-specific cellular response of HHC is due to

sub-clinical infection or merely the continued stimulation by bacteria expelled by the contact MB leprosy case. Long-term follow-up of individuals to determine whether T cell responses can predict the onset of leprosy symptoms would also be beneficial.

The cellular immune response of PB leprosy patients inhibits bacterial growth and dissemination and as such is likely to provide significant insight as to the important antigenic targets that determine protection. Intriguingly, in contrast with the antigenspecific responses observed in PB leprosy patients, there was essentially no complementation of responses in HHC. Antigens that yield responses in both PB patients and HHC represent candidates that might be incorporated in a defined sub-unit vaccine for leprosy. The identification of high IFNγ responses against 46f in HHC, even higher than those attained with PB leprosy patients; suggest that vaccination studies with these proteins are warranted.

Simple and field-friendly T cell-based assays have recently been introduced for the diagnosis of tuberculosis, and such tests could greatly facilitate leprosy research and diagnosis (Connell *et al.* 2006; Dockrell *et al.* 2000; Pai *et al.* 2004; Roche *et al.* 1999). A leprosy diagnostic application could be developed based on comparative T cell reactivity among leprosy patients and controls. Thirty six per cent (5 of 14) of the *M. leprae* proteins we tested in Brazil demonstrated T cell immunogenicity defined by IFNγ responses in a simple 24h WBA. These antigens showed discriminatory recognition patterns that indicate their potential as candidate molecules for PB leprosy diagnosis. IFNγ recall responses identified five immunogenic *M. leprae* proteins that have diagnostic potential for PB leprosy (ML0276, ML0840, ML1623, ML2044 and 46f). The results obtained by ML0276, ML0840, ML1623 and 46f stimulation complemented each other to provide 82% strong diagnosis (> 1.25 IU/ml IFNγ) of PB patients in Goiânia,, Brazil. The availability of a simple, affordable, field- and userfriendly diagnostic test for PB leprosy would significantly impact leprosy control programs in endemic countries.

In summary, our results identify several antigens that are recognized by PB leprosy patients. Our results also demonstrate that 24h WBA are user friendly and have good potential for the expanded screening *M. leprae* antigens to assess their potential as either diagnostic indicators or vaccine candidates.

Acknowledgements

The authors thank Dr. James Harnisch, Harborview Hospital for blood collection from Seattle-based leprosy patients and Dr. Randall Howard for review and editing. This work was supported by the American Leprosy Missions and UNICEF/UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR) grant #A20509.

Artigo 2

Immunologically reactive *M. leprae* antigens with relevance to diagnosis and vaccine development.

Artigo publicado na revista BMC Infectious Disease em janeiro de 2011 (Vol. 11, No.26 – doi: 10.1186/1471-2334).

Immunologically reactive *M. leprae* antigens with relevance to diagnosis and vaccine development.

Authors: Lucas Henrique Sampaio[1], Mariane M. Stefani[1§], Regiane M. Oliveira[1], Ana Lucia M. Sousa[1], Greg C. Ireton[2], Steven G. Reed[2], Malcolm S. Duthie[2].

Affiliations:

[1]Tropical Pathology and Public Health Institute, Federal University of Goiás, Rua 235 esquina com 1a Avenida, Setor Universitário, sala 335, Phone:(55 62) 32096111; Fax: (55 62) 32096363, Goiânia, GO, 74605050, Brazil.

[2]Infectious Disease Research Institute, 1124 Columbia St, Suite 400, Phone: (206) 381-0883; Fax: (206) 381-3678, Seattle, WA 98104, USA.

§ Corresponding author

E-mail addresses:
LLS: lucashfs@gmail.com
MMS [§]: mstefani@iptsp.ufg.br
RMO: remorillas@gmail.com
ALMS: anamaroclo@gmail.com
GCI: gireton@idri.org
SGR: sreed@idri.org
MSD: mduthie@idri.org

Keywords for submission: leprosy; mycobacteria; T cell; antibody; diagnosis.

ABSTRACT

Background: Leprosy is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae* that can manifest a wide variety of immunological and clinical outcomes ranging from potent humoral responses among borderline lepromatous (BL) and lepromatous (LL) patients to strong cellular responses among tuberculoid (TT) and borderline tuberculoid (BT) patients. Until recently, relatively little has been known about the immune responses to individual proteins of *M. leprae* recognized during leprosy. **Methods:** The immune reactivity to a panel of 33 *M. leprae* recombinant proteins was evaluated among leprosy patients and controls from a high endemic area for leprosy (Goiania/GO, Central Brazil). Serum IgG responses were measured by ELISA (45 participants/group) and T cell responses (20 participants/group) were evaluated by IFN γ production in 24 hours whole blood cultures with antigen (whole blood assay-WBA). Study groups were newly diagnosed, untreated TT/BT and BL/LL leprosy patients classified by Ridley Jopling criteria and household contacts of BL/LL patients (HHC). Control groups were HIV-1 negative pulmonary tuberculosis patients (TB) and healthy individuals from the same endemic area (EC). In silico predictions indicated the level of identity of *M. leprae* proteins with homologues in other mycobacteria and the presence of T cell and B cell epitopes. **Results:** Despite the prediction that all proteins would be reactive, 16 of 33 (48%) of the single proteins tested were immunogenic (recognized in WBA or ELISA) and seventeen were non-immunogenic (not recognized in either assay). Among the 16 immunogenic proteins, 9 were considered leprosy specific in WBA inducing cell-mediated IFNγ secretion from TT/BT patients and HHC. Three of these proteins were also leprosy specific in serology being recognized by serum IgG from LL/BL patients. Seven of the immunogenic proteins were not leprosy specific. **Conclusions:** New *M. leprae* antigens recognized by antibody responses of BL/LL patients and cellular responses of TT/BT leprosy patients were identified. An improved serological diagnostic test for leprosy could be developed by incorporating these IgG-reactive antigens to the current PGL-I based tests. Moreover our data indicate that the WBA is a robust, relatively simple and user friendly format for a T cell based diagnostic test. The field use of these test formats in leprosy endemic countries could contribute to early leprosy diagnosis before the development of deformities and disabilities.

Background

Leprosy, caused by infection with *Mycobacterium leprae*, is one of the oldest known human infectious diseases and remains an important public health problem for many countries, including Brazil (WHO 2009). *M. leprae* infects macrophages and Schwann cells, causing peripheral nerve damage which results in sensory and motor loss that ultimately cause the severe disability that is a hallmark of leprosy (Scollard 2008). Leprosy actually manifests across a bacteriologic, clinical, immunologic and pathologic spectrum that allows classification into five forms according to the Ridley-Jopling scale. Weak antibody responses and strong cell-mediated immunity (CMI) classically characterize the immune response of tuberculoid (TT) and borderline tuberculoid (BT) patients who have a low bacterial burden. In contrast, strong antibody responses and weak CMI are classically observed in borderline-borderline (BB), borderline lepromatous (BL) and lepromatous (LL) cases that have a high bacterial burden and are believed to transmit *M. leprae* infection (Yamamura *et al* 1991, Duthie *et al* 2007, Duthie *et al* 2008).

Seeking to eliminate leprosy by the year 2000, a campaign by the World Health Organization was based on widespread provision and use of multidrug therapy (MDT) to control infection and reduce transmission. This campaign has produced a large decline in global prevalence of leprosy over the last 20 years, but despite this, the new case detection rate is still high in many regions (WHO 2009). The diagnosis of leprosy remains based on the appearance of clinically relevant manifestations and treatment has been simplified to incorporate recommended MDT regimen of 6 months for paucibacillary patients (PB, encompassing TT and BT forms) and of 12 months for multibacillary patients (MB, encompassing LL, BL, BB and some BT forms). Unfortunately, the scarcity of early signs or symptoms, as well as the problem that leprosy symptoms may be confused with other diseases, often leads to significant delays in proper diagnosis and appropriate treatment (Scollard *et al*. 2005). A further compounding factor is the reduction in the number of clinicians with expertise at identifying leprosy that has occurred alongside the reduction in case numbers (Aseffa *et al* 2005). Early leprosy diagnosis, to promote even earlier treatment, is regarded as critical to provide further reductions in transmission and decrease the number of patients presenting with disabilities (Geluk *et al*. 2010) To date, simple, rapid tests have been developed to diagnose MB leprosy but tests for PB leprosy are not yet available (Buhrer-Sekula *et al* 2008).

As with other diseases, rapid and objective diagnosis of leprosy could be achieved by the recognition of disease-specific immune responses (Aseffa et al. 2005). Due to the dichotomous nature of immune responses of leprosy patients, diagnostic tests for all leprosy forms would probably require antigens that are targets of both antibody and cellular responses (Stefani 2008). The identification of T cell-reactive antigens may also reveal proteins that are part of the protective response against leprosy that are worthy of further examination in the context of vaccine development. The selection and production of proteins for immune evaluation has been expedited by recent advances such as the sequencing of the *M. leprae* genome and could be further simplified when coupled with effective in silico epitope predictions (PRORED, ABCpred, Sanger, Uniprot, Leproma). Most studies investigating the reactivity of *M. leprae* antigens have described either the antibody or T cell reactivity among leprosy patients but have not typically compared these responses in parallel (Spencer *et al*. 2005, Geluk et al. 2005, Araoz et al. 2006, Geluk et al. 2009, Geluk et al. 2010). The current study was designed to explore the immune reactivity of a panel of 33 *M. leprae* recombinant proteins among leprosy patients and to concomitantly evaluate the utility of computational softwares to predict this reactivity. This study identified several antigens that are targets of the cellular response and some that are targets of the antibody response. Moreover it indicated that the benefits of current computational predictions of immune reactivity were limited.

Methods

Study participants. This study was approved by local (Comitê de Ética em Pesquisa Humana e Animal do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goias) and National Ethics Commission (Comissão Nacional de Ética Pesquisa/CONEP/Brazil protocols #4862 and #12962). Newly diagnosed, previously untreated leprosy patients were recruited between November 2006 and January 2009 at a main outpatient clinic (Centro de Referência em Diagnóstico e Terapêutica) in Goiânia, Goiás State, in Central-West Brazil. Before recruitment all patients were provided complete dermato-neurological evaluations by a dermatologist with expertise in leprosy diagnosis. Participants were included only after signing written informed consent forms. Patients were assigned to leprosy groups based upon their immediate diagnosis, and were subsequently thoroughly characterized according to Ridley-Jopling criteria, taking into account clinical, bacilloscopic and histopathological findings (Ridley & Jopling 1966). All patients assigned to the TT/BT group had negative bacilloscopic index (BI), whereas LL/BL cases were BI positive. Tuberculosis patients (TB), healthy household contacts of LL/BL patients (HHC) and healthy endemic controls (EC) from the same endemic region were included as control groups. TB patients were HIV-negative individuals with clinically confirmed pulmonary tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis* sputum-positive) in their final 3 months of chemotherapy. HHC were adults living in the same house as a multibacillary index case for at least 6 months prior to study enrollment and blood collection. EC were healthy individuals recruited among non leprosy patients at a public health center from the same endemic setting. EC had neither tuberculosis nor history of leprosy in their families. All study participants had a BCG scar, consistent with the neonatal BCG vaccination coverage close to 100% in this recruitment setting. All study participants came from Goias State, an endemic region for leprosy (prevalence rate = 6.02 patients/10000 inhabitants). The serology study included 45 participants per group and the T cell study included 20 participants per group and results from these separate studies were combined in this manuscript. The fine composition of each study group is summarized in Table 1.

Table 1. Composition of study groups.

Group	Sex (m/f)	mean age (year) (range)	mean BI (range)
PB (29 TT, 36 BT)	31/34	33 (18-76)	0 (0)
MB (23 BL, 42 LL)	37/28	51 (18-100)	3.75 (0.5-6.0)
HHC	32/33	36 (19-60)	nd[1]
TB	39/26	38 (20-67)	nd
EC	32/33	35 (18-58)	nd

[1]not determined

Antigens. Thirty-three *M. leprae* recombinant proteins were evaluated for immune reactivity (ML0022, ML0051, ML0098, ML0176, ML0276, ML0393, ML0405, ML0489, ML0491, ML0540, ML0810, ML0811, ML0840, ML1383, ML1556, ML1632, ML1181, ML1481, ML1633, ML1685, ML2028, ML2044, ML2055, ML2203, ML2331, ML2346, ML2358, ML2380, ML2541, ML2603, ML2629, ML2655 and ML2659). Proteins were selected either from previous *M. leprae* cDNA library screening results (Reece *et al.* 2005) or on the basis of homology with known secreted *M. tuberculosis* proteins. Cloning and purification from *E. coli* were performed as previously described (Reece *et al.* 2005, Duthie *et al.* 2008). Endotoxin levels for each protein were <100 EU/mg protein, as measured by Limulus Amebocyte Lysate QCL-1000 assay (Lonza Inc., Basel, Switzerland). Details for selected *M. leprae* recombinant proteins are provided in Table 2.

CMI determination by whole blood assay (WBA). WBA was performed as previously described (Duthie *et al.* 2008). Briefly, at the time of initial diagnosis and operational assignment to MB or PB groups, prior to full characterization by Ridley-Jopling, undiluted heparinized venous whole blood (Greiner) was collected. Whole blood was plated into 24-well plates (450 μl/well; Sigma, St. Louis, MO) within 2 hours of collection and incubated with stimulants for 24 hours at 37°C 5% CO_2. Each assay included stimulation with 10 μg/ml of individual *M. leprae* recombinant protein for experimental evaluations, and with PBS alone, 10 μg/ml *M. leprae* cell sonicate (MLCS; provided by Dr. John Spencer, Colorado State University, Fort Collins, CO under NIH contract N01 AI-25469) or 1 μg/ml PHA (Sigma) as controls (Additional File 1). Approximately 150 μl plasma were collected and stored at -20°C until IFNγ determination. IFNγ concentration was determined by ELISA, according to the manufacturer's instructions (eBioscience kit, San Diego, CA). The IFNγ ELISA

employed had a detection limit of 20 pg/ml and an arbitrary cut-off point of 50 pg/ml was used to determine positive responses.

Antibody ELISA to *M. leprae* recombinant proteins. Serum IgG antibodies were determined by ELISA as previously described (Duthie *et al.* 2007). Polysorp 96-well plates (Nunc, Rochester, NY) were coated with 2 μg/ml recombinant protein at 4°C and blocked with PBS/Tween-20 with 1% (wt/vol) BSA. Serum samples diluted 1/200 in 0.1% BSA were added and incubated for 1 hour at RT. Plates were washed and incubated with horseradish peroxidase-conjugated anti-human IgG (Southern Biotech, Birmingham, AL). After washing, reactions were developed with peroxidase color substrate (KPL, Gaithersburg, MD), and quenched by the addition of 1N H_2SO_4. The corrected optical density of each well at 450 nm was read using a VERSAmax microplate reader (Molecular Devices, Orleans Drive Sunnyvale, CA). Responses were defined as positive if the median was above the arbitrary cut-off (OD >0.3).

ELISA to PGL-I antigen. IgM antibodies to *M. leprae* cell wall phenolic glycolipid I (PGL-I) were detected as described (Duthie *et al.* 2008). Briefly 200 ng/ml of natural disaccharide with octyl linkage (NDO) conjugated to bovine serum albumin (NDO-BSA; kindly supplied by John Spencer, Colorado State University, under NIH contract N01 AI-25469) was used. Serum samples diluted 1/300 in 0.1% BSA were tested in duplicates. After incubation and washings horseradish peroxidase-conjugated to anti human IgM (Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, PA) was added and incubated. After washings peroxidase color substrate (KPL, Gaithersburg, MD) was added and the reaction was quenched by the addition of 1 N H2SO4. The optical density (OD) was read at 450 nm. Positive responses were defined as an OD of 2x the mean OD of healthy endemic controls. Results of IgM anti PGL-I serology in each study group are shown in Table S2.

Comparative genomics and epitope predictions. The amino acid sequences of the *M. leprae* proteins evaluated in this study were obtained from the Leproma website (available at http://genolist.pasteur.fr/Leproma/) and the SANGER CDS Retrieve Information (available at http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/yeastpub/get_cds?organism=M_leprae) . The percentage of amino acid identity of each *M. leprae* protein tested was assessed against homologues in other mycobacteria

that were revealed by the comparative protein analyses based on complete proteome databases from other mycobacteria that have the potential to infect humans: *M. tuberculosis, Mycobacterium avium, Mycobacterium smegmatis, Mycobacterium marinum, Mycobacterium ulcerans, Mycobacterium bovis* BCG, *Mycobacterium paratuberculosis* and *Mycobacterium microti.* BLAST UniProt (The Universal Protein Resource) database (available at http://www.uniprot.org) was used to compare a given amino acid sequence with sequences of other proteins from the NCBI database indicating sequences with identity above 30%. The potential of the selected *M. leprae* proteins to present promiscuous MHC class II T cell epitopes was predicted by PROPRED server (available at http://www.imtech.res.in/raghava/propred/) which uses a panel of 51 different HLA-DR alleles (HLA-DRB1 and HLA-DRB5) . The prediction of B cell epitopes containing 16 amino acids in the selected *M. leprae* proteins was attained using the artificial neural network based server ABCpred (available at http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/ABC_submission.html) .

Statistical analysis. Exploratory data analysis, including box-plots and scatter plots, medians and interquartile range (IQR) were used to analyze the IFNγ levels and OD of IgG reactivity among different study and control groups. Proteins that demonstrated reactivity above the arbitrary cut off (OD >0.3 for IgG ELISA or IFNγ secretion >50pg/ml in WBA) were classified as "immunogenic". For T cell recognition *M. leprae*-specificity was defined according to reactivity of proteins among TT/BT leprosy patients and at risk HHC, and lack of reactivity among TB and EC groups. For serology *M. leprae* specific proteins were recognized by IgG antibodies from leprosy patients especially BL/LL categories and by lack of recognition by HHC, EC and TB groups. Statistical significance was assessed by Kruskall-Wallis one way analysis of variance for comparison of multiple groups and Mann-Whitney for comparison between two groups. Results were considered statistically significant when p-values < 0.05 were obtained.

Results

ML0405, ML2055 and ML2331 proteins elicit leprosy-specific cellular and humoral responses. Dependent upon their disease presentation, leprosy patients can be characterized as having strong antibody responses (MB; LL/BL) or strong cellular responses (PB; TT/BT) against crude *M. leprae* antigens. It is unclear if these different patient groups respond to the same or different individual antigens. To address this question, we compared the antigen-specific immune response of leprosy patients and controls. When incubated with blood from TT/BT and HHC groups, the ML0405, ML2055 and ML2331 proteins induced strong IFNγ production (Figure 1). The ML0405 and ML2055 antigens each induced secretion of IFNγ greater than 50pg/ml in 95% (19 of 20) of TT/BT leprosy patients examined. The ML2331 antigen induced response greater than 50pg/ml IFNγ in 85% (17 of 20) of the TT/BT cases examined. The ML0405 and ML2331 proteins also induced production of IFNγ levels above the 50pg/ml cut-off among 80% HHC (16 of 20 cases to each antigen), consistent with this group being exposed to *M. leprae*. The ML2055 antigen similarly induced secretion of IFNγ greater than 50pg/ml in 75% HHC (15 of 20 cases). In contrast, with the exception of one LL/BL patient responding to ML0405 and one EC responding to ML2055, IFNγ responses above 50pg/ml were not observed in the LL/BL leprosy or control groups (Figure 1).

Although not recognized in terms of IFNγ production within WBA with LL/BL blood, as we previously reported, the ML0405 and ML2331 proteins were well recognized by serum IgG from LL/BL leprosy group (Figure1) (Duthie *et al.* 2007). The ML2055 antigen demonstrated a strong serum antibody reactivity in the LL/BL patient group (median OD= 1.43; IQR= 1.26) with 58% (26 of 45) sera binding above the positive threshold (OD >0.3; Figure 1). Antibody responses to ML0405, ML2055 and ML2331 within all other groups analyzed (TT/BT, HHC, TB and EC) were weak or absent. Taken together, the data indicate that ML0405, ML2055 and ML2331 are recognized specifically among leprosy patients and contacts, albeit differentially inducing either antibody or cellular responses.

1)

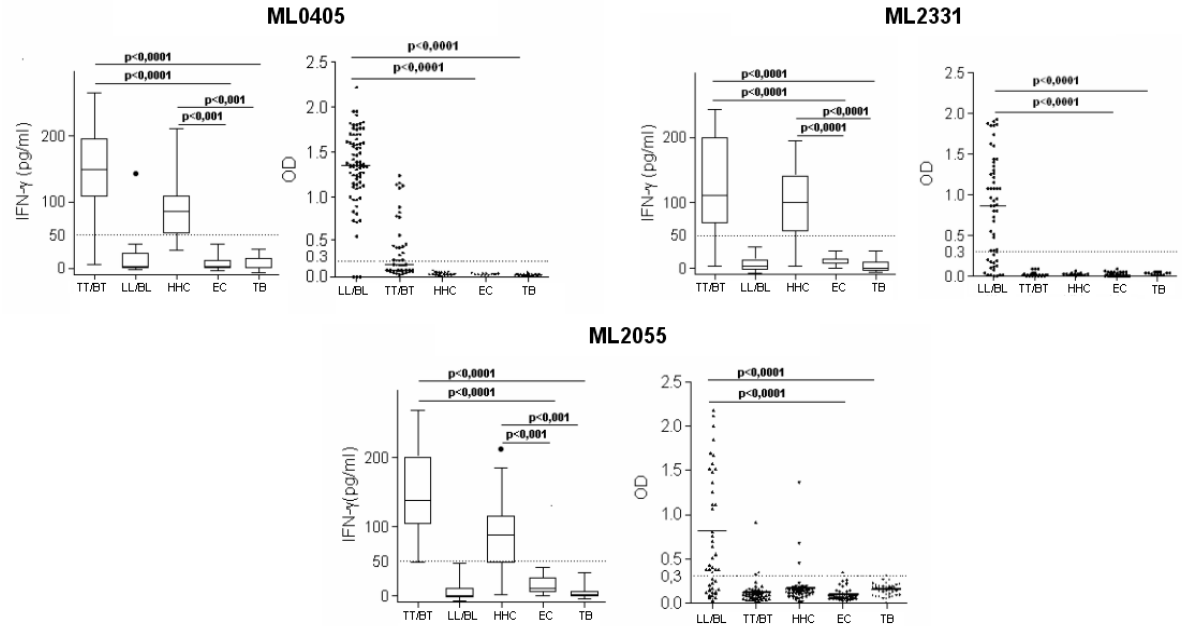


Fig.1. Identification of leprosy-specific antigens by cellular and antibody responses. WBA-IFNγ secretion and serum IgG responses were determined for ML0405, ML2331 and ML2055. For WBA blood from leprosy patients and controls were incubated for 24h with ML0405, ML2331 and ML2055 antigens, and IFNγ secretion determined by ELISA. The dotted lines represent the arbitrary cut-off IFNγ above 50 pg/ml. WBA results are presented as box plots encompassing the 25th and 75th percentiles, and the black line within each box indicating the median value, n = 20 per group. IgG ELISA data are shown in scatter plots of individual values for each individual serum tested, n = 65 per group. The dotted line indicates the calculated cut-off for positive responses (OD >0.3).

Antigens that stimulate leprosy-specific CMI without specific antibody responses. Five proteins were found to elicit cellular responses despite not being detected by serum antibodies. In agreement with our previous findings, antigens ML0840 and ML2044 induced significantly greater IFNγ secretion in WBA using blood from TT/BT leprosy patients than WBA using EC blood (Figure 2) (Duthie *et al.* 2008). These proteins did not, however, demonstrate significant antibody reactivity in any of the study groups (Figure 2). Among the TT/BT patients, IFNγ production was induced by incubation with the ML1632 protein in 80% (16 of 20) cases; by the ML1685 and ML1556 proteins in 75% (15 of 20) cases. Antigen-specific IFNγ responses were again induced in the HHC samples, with 65% HHC (13 of 20) responding to the ML1632 and

ML1685 proteins, and 25% HHC (5 of 20) responding to the ML1556 protein (Figure 2). Thus, our data identifies five *M. leprae* proteins (ML0840, ML2044, ML1632, ML1685 and ML1556) that, despite stimulating IFNγ production in WBA using blood from the TT/BT and HHC groups, are not detected by serum IgG responses of leprosy patients.

We previously demonstrated that the ML0276 protein induces IFNγ secretion from TT/BT leprosy patient and HHC blood but not from controls (Duthie *et al.* 2008). When the ML0276 protein was used in ELISA to detect antibodies, strong serum IgG reactivity was observed in all study groups (Figure 3). Our data thereby indicate that although the cellular response to ML0276 is specific to leprosy groups, the anti-ML0276 antibody response lacks specificity. Medium values of IFNγ produced in WBA and OD of ELISA tests to detect IgG to the immunogenic *M. leprae* recombinant proteins identified in this study, stratified by different study groups are shown in Additional File 2.

Non-specific cellular responses are observed against many proteins. In contrast with the leprosy-specific cellular responses of the proteins categorized above, several of the recombinant proteins tested, in addition to the TT/BT leprosy group, stimulated IFNγ release in the TB or EC groups (ML0022, ML2358, ML2346, ML2380, ML2541, ML2603 and ML2203) (Figure 4). Of note, the LL/BL leprosy group did not respond to these proteins. The number of responders to each of these proteins, and the magnitude of the response, were generally also much lower than those observed for the proteins that were specifically recognized by TT/BT leprosy group. Despite the presence of cellular responses, these proteins did not demonstrate IgG reactivity.

2)

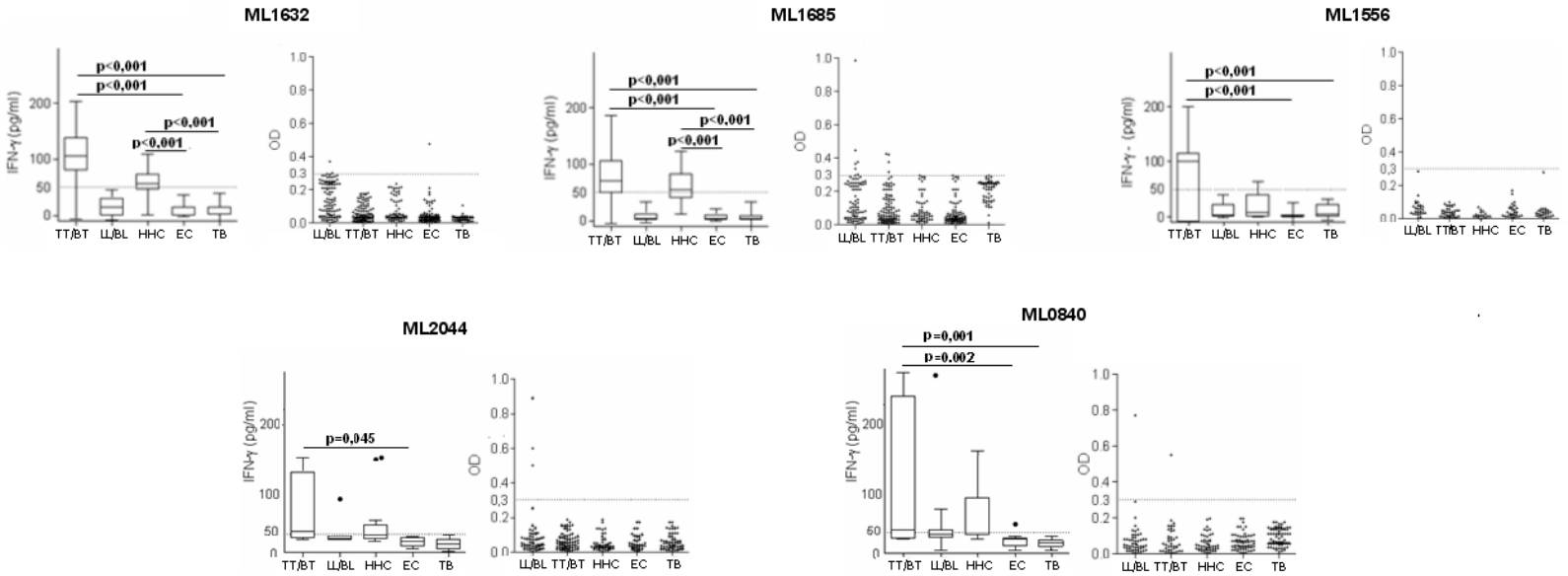


Fig.2. Proteins that are specifically recognized by cellular responses do not necessarily elicit serum antibodies. WBA-IFNγ secretion and serum IgG responses were assessed against the ML1632, ML1685, ML1556, ML2044 and ML0840 proteins. WBA results are presented as box plots encompassing the 25th and 75th percentiles, and the black line within each box indicating the median value, n = 20 per group. Antibody results are shown in scatter plots of individual values for each individual serum tested, n = 65 per group. The dotted line indicates the calculated cut-off for positive responses (OD >0.3).

3)

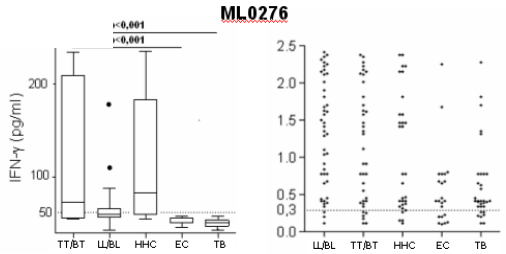


Fig.3. The ML0276 protein elicits a leprosy-specific cellular response but is detected by serum antibodies from all study groups. WBA-IFNγ and serum IgG responses against ML0276 are shown as an example of a protein specific for WBA IFNγ but that lacks specificity for serum IgG responses.

4)

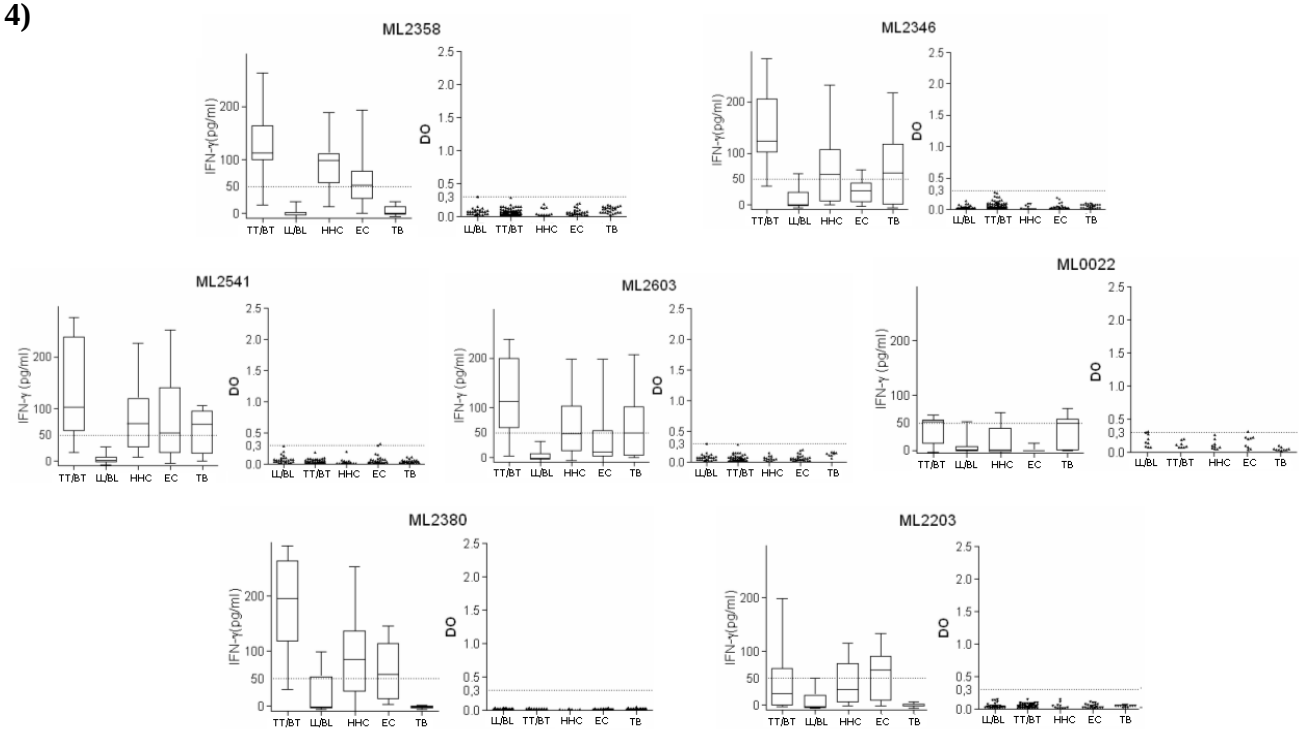


Fig.4. *M. leprae* proteins that lack specificity. The proteins ML0022, ML2358, ML2346, ML2380, ML2541, ML2603 and ML2203 were immunogenic but not specific. WBA results are presented as box plots encompassing the 25th and 75th percentiles, and the black line within each box indicating the median value, n = 20 per group. Antibody results are shown in scatter plots of individual values for each individual serum tested, n = 65 per group. The dotted line indicates the calculated cut-off for positive responses (OD >0.3).

***In silico* predictions of immune reactivity and specificity are poor.** Comparative analyses of amino acid sequences of the *M. leprae* proteins evaluated immunologically were conducted against the predicted proteomes of *M. tuberculosis, M. avium, M. marinum, M. ulcerans, M. bovis* BCG (Table 2)**,** *M. smegmatis, M. paratuberculosis* and *M. microti* (Additional File 3). Only the ML2346 protein could be considered *M. leprae* unique, with no homologues found in the other mycobacteria species examined (Table 2). The other *M. leprae* proteins tested herein possessed an ortholog protein in other pathogenic mycobacteria, with homology ranging from 29% to 97% (Table 2 and Additional File 3). This high homology was not, however, associated with a lack of specificity in *ex vivo* assays. For example, the ML2331 protein possesses 81% homology with the Rv3717 ortholog in *M. tuberculosis*, but this protein was not reactive with TB patient samples and responses against ML2331 could only be demonstrated in leprosy patients (or HHC). Thus, despite possessing significant levels of homology with other mycobacteria species, several *M. leprae* proteins are only recognized in the context of leprosy.

Having found widely discrepant levels of reactivity in our immune assays, we retrospectively compared our results with *in silico* predictions to determine if computational analyses could have streamlined the *in vivo* assays. In general, the number of predicted B cell and T cell epitopes was directly proportional to the size of the protein (Table 2). *In silico* predictions indicated that each of the proteins tested contained up to seven promiscuous T cell epitopes, indicating that all had the potential to be reactive in WBA (Table 2). This prediction clearly contradicts our observation that more than half of the antigens tested (ML0051, ML0098, ML0176, ML2028, ML1633, ML0393, ML0489, ML2655, ML0491, ML0540, ML0810, ML1383, ML1481, ML2629, ML2659, ML0811 and ML1181) neither induced IFNγ secretion nor showed IgG reactivity (Figure 5). The *in silico* predictions of HLA binding regions within an antigen sequence do not predict interactions with the T cell receptor (TCR). The analyses employed herein were poor to determine the proteins that are targets of the adaptive immune response of leprosy patients.

5)

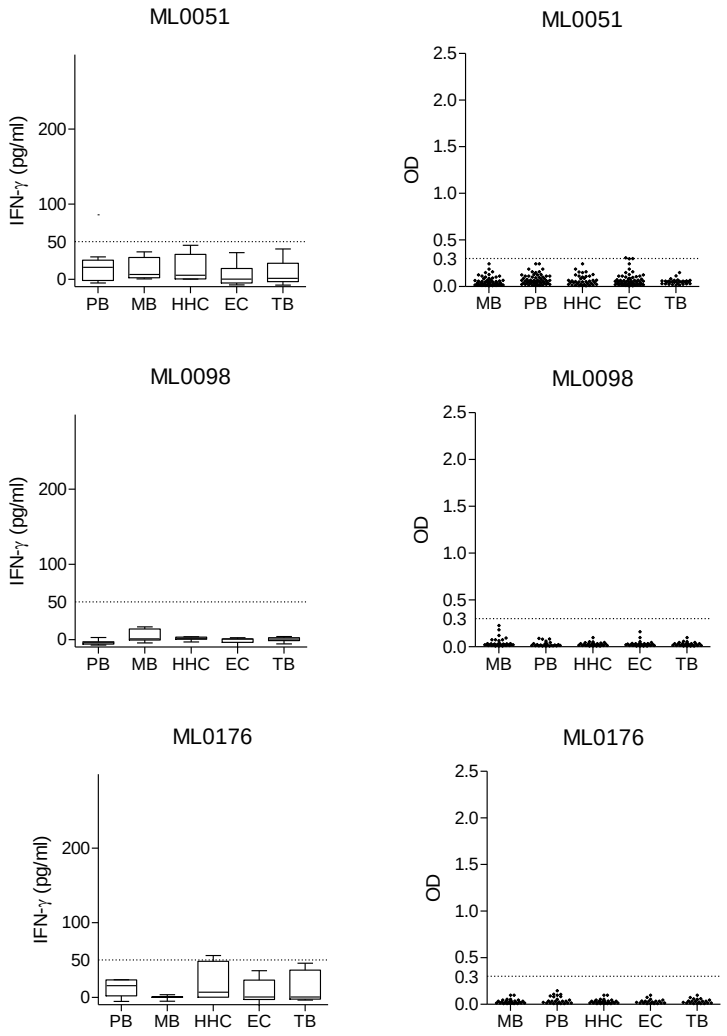


Fig.5. *M. leprae* proteins that are not reactive in WBA or antibody ELISA. WBA-IFNγ secretion and serum IgG responses were assessed against the proteins ML0051, ML0098 and ML0176.

Table 2. Representative *M. leprae* recombinant antigens examined by comparative genomics and actual immune responses.

			% Identity amino acid and orthologous genes[1]					Number of Predicted epitopes[2]		Immunogenicityy specificity[3]	
Gene	**Predicted Function**	**Size (aa)**	***M. ulcerans***	***M. avium***	***M. bovis*** (BCG)	***M. marinum***	***M. tuberculosis***	**T cell**	**B cell**	**WBA IFNγ**	**Ab**
ML0405	hypothetical protein	394	29 (MUL_5045)	-	62 (BCG_3680c)	57 (MMAR_4515)	62 (Rv3616c)	7	39	+/+	+/+
ML2331	possible secreted protein	256	81 (MUL_4308)	80 (MAV_0385)	82 (BCG_3777)	81 (MMAR_5233)	81 (Rv3717)	4	24	+/+	+/+
ML2055	fibronectin attachment protein	287	65 (MUL_3017)	57 (MAV_2859)	67 (BCG_1896)	65 (MMAR_2737)	67(Rv1860)	6	15	+/+	+/+
ML1685	3-isopropylmalato dehydratase	476	86 (MUL_1968)	88 (MAV_3838)	88 (BCG_3009c)	88 (MMAR_1726)	88 (Rv2988c)	3	25	+/+	-
ML1632	possible hydrolase	511	73 (MUL_1334)	77 (MAV_2243)	75 (BCG_2040c)	74 (MMAR_3295)	75 (Rv2223c)	4	32	+/+	-
ML1556	initiation factor IF-2	924	83 (MUL_2122)	81 (MAV_3693)	83 (BCG_2859c)	82 (MMAR_1894)	83 (Rv2839c)	3	17	+/+	-
ML2044	Possible glycosyl hydrolase	73	-	-	-	-	-	3	7	+/+	-
ML0840	hypothetical protein	434	-	66 (MAV_2053)	-	-	-	3	22	+/+	-
ML0276	hypothetical protein	147	-	71 (MAV_4774)	78 (BCG_0427)	70 (MMAR_0687)	78 (Rv0390)	5	14	+/+	+/-
ML2541	acyl-CoA synthase	146	77 (MUL_0004)	78 (MAV_0004)	83 (BCG_0004)	78 (MMAR_0004)	77 (Rv0004)	5	15	+/-	-
ML2203	hypothetical protein	373	76 (MUL_0420)	76 (MAV_0750)	77 (BCG_0863c)	75 (MMAR_4878)	77 (Rv0811c)	6	17	+/-	-
ML2358	probable acyl-CoA synthase	583	77 (MUL_2020)	56 (MAV_1328)	77 (BCG_2952)	77 (MMAR_1777)	76 (Rv2930),	3	15	+/-	-
ML2346	hypothetical protein	301	-	-	-	-	-	5	12	+/-	-
ML2380	possible secreted protein	153	65 (MUL_1413)	66 (MAV_4695)	66 (BCG_0494c)	65 (MMAR_0777)	66 (Rv0455c)	3	15	+/-	-
ML2603	possible lysophospholipase	279	73 (MUL_1077)	77 (MAV_4997)	74 (BCG_0220)	74 (MMAR_0427)	74 (Rv0183)	5	16	+/-	-
ML0022	hypothetical protein	488	71 (MUL_0024)	66 (MAV_0024)	72 (BCG_0050c)	69 (MMAR_0022)	72 (Rv0020)	5	17	+/-	-

[1] Blast Search for amino acid identity was performed using BLAST Uniprot (http://www.uniprot.org/). (-) = no homologue found. Locus_tag othologous genes are indicated within parentheses. [2] Promiscuous T cell epitopes predicted to be recognized by least 26 of 51 different HLA-DR alleles identified by PROPED server (http://www.imtech.res.in/raghava/propred/), and the number of potential B cell epitopes predicted by ABCpred server (http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/ABC_submission.html).[3]Immu/spec = immunogenicity / specificity; WBA +/+ = immunogenic protein that gives specific cellular response; WBA +/- = immunogenic protein that gives unspecific cellular response; Ab +/+: immunogenic protein that induces specific antibody response; Ab+/-: immunogenic protein that induces unspecific antibody response. (-) = not immunogenic.

Discussion

Early and accurate diagnosis of leprosy and MDT are considered essential to disrupt *M. leprae* transmission and leprosy incidence. Due to the complex and varying immune responses that characterize leprosy spectrum, it is likely that immune diagnosis will only be achieved by antigens that specifically induce cellular and humoral responses (Stefani *et al.* 2008). Identifying antigens that are targets of the proinflammatory T cell response could also reveal those that are associated with limiting *M. leprae* burden and therefore useful for vaccination. In this study a panel of recombinant *M. leprae* proteins was evaluated for the ability to induce CMI and antibody responses to identify antigens that are specifically reactive in leprosy patients. Although many antigens were identified as cellular targets by their ability to induce IFNγ secretion in WBA of TT/BT leprosy patients and HHC, a minority of the screened proteins induced serum IgG responses in BL/LL patients, such that few proteins induced specific responses across the leprosy spectrum.

In silico analysis predicted the presence of T cell and B cell epitopes within all of the *M. leprae* proteins tested in this study. The most promiscuous T cell epitope predicted was located in ML0405 protein, which was estimated to contain T cell epitopes recognized by 50 of 51 of HLA-DR alleles along with 24 potential B cell epitopes. Consistent with this prediction, the ML0405 protein was recognized by IFNγ release in WBA using TT/BT leprosy patient blood and by serum IgG from LL/BL leprosy patients. However, despite the prediction that all of the evaluated proteins would possess multiple HLA-DR epitopes, more than half (17 of 33; 52%) of the proteins were not recognized by leprosy patients or controls. Our results are in agreement with previous studies that found some of these proteins were not immunogenic (Araoz *et al.* 2006b; Araoz *et al.* 2006a; Dockrell *et al.* 2000; Duthie *et al.* 2007; Duthie *et al.* 2008; Geluk *et al.* 2009; Geluk *et al.* 2008; Geluk and Ottenhoff 2006; Spencer *et al.* 2005). Although we cannot exclude the possibility that the proteins investigated were not recognized because individuals with the appropriate HLA were not recruited, we consider this improbable given the large degree of promiscuity that was predicted. Several other possibilities could explain the lack of reactivity. Although we consider it unlikely given the recognition of positive responses to many proteins, the simplest explanation would be that recombinant expression in *E. coli* leads to significantly different folding and processing of proteins than occurs during native

expression in *M. leprae*. A more likely possibility is that these proteins, although present in the genome of *M. leprae*, may not be translated. Another explanation could be that limited antigen-presentation or T cell suppression may occur during leprosy in order to prevent nerve damage via T cell-mediated killing of *M. leprae*-infected Schwann cells. We are aware that the softwares employed in this study identify and predict HLA binding regions from antigen sequences without predicting interactions with the TCR. Therefore the use of other *in silico* prediction softwares that also include the probability of the antigen being processed, presented in the context of a certain HLA allele and recognized by TCR could lead to different conlusions.

In leprosy endemic regions the high rates of concomitant exposure to *M. tuberculosis* and to other non-pathogenic environmental mycobacteria could confound the determination of *M. leprae*-specific immune responses. Several of the *M. leprae* antigens tested in this study have homologues in other mycobacteria with greater than 50% identity (Table 1). The routine *M. bovis* BCG vaccination of newborns in leprosy-endemic countries such as Brazil could stimulate responses that could cross-react with *M. leprae*. *M. bovis* BCG showed high homology with immunogenic *M. leprae* proteins (from 62 to 88%) This high homology was not, however, associated with neither cross - reactivity nor with a lack of specificity. For example, the ML2331 protein possesses over 80% identity with *M. tuberculosis* and *M. bovis* BCG proteins but serological and cellular responses to this antigen were highly specific to leprosy patients (or at-risk contacts). Antigen expression levels and bioavailability may determine the immune dominant antigens of each mycobacterial infection, such that differing responses to similar proteins may distinguish each disease. As a further demonstration of the limited ability of *in silico* predictions to indicate specificity, despite having no identified homologue in *M. tuberculosis*, the ML2346 protein induced strong IFNγ responses in all of the study groups, including TB patients. Based on these findings we suggest that, at present, *in silico* identification of *M. leprae* proteins with high identity to other mycobacterial proteins should not be used as a definitive criterion to exclude them from further diagnostic or vaccine evaluations.

Several studies have reported antigen-specific cellular and antibody responses during leprosy, but few studies have consolidated data to determine if particular antigens are differentially recognized across the disease spectrum (Araoz *et al.* 2006b; Araoz *et al.* 2006a). Araoz *et al.* described *M. leprae* recombinant proteins recognized

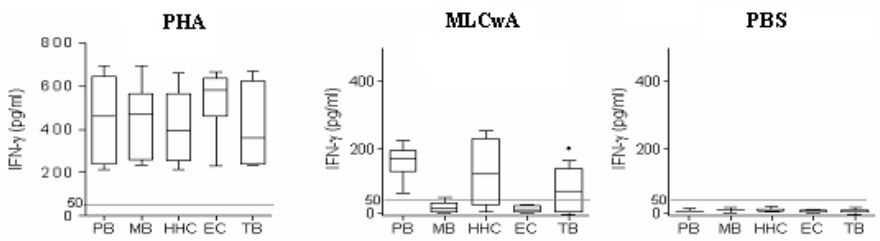
by antibodies produced by lepromatous patients that that could also induce CMI among tuberculoid patients (Araoz *et al.* 2006b). Some of the proteins analyzed in our study (ML1632, ML1685 and ML1556) induced strong and specific production of IFNγ in TT/BT and HHC groups, demonstrating their potential application for identification of those at risk of developing tuberculoid leprosy. These proteins were not, however, recognized by antibodies from LL/BL patients.

Our parallel screening suggested that the antibody response to *M. leprae* recombinant proteins was dependent upon their ability to induce cellular responses, and indicates only a limited number of *M. leprae* antigens contained T cell and B cell epitopes that are immune reactive in the context of disease (ML0405, ML2055 and ML2331). These antigens could be considered priority diagnostic antigens. In order to optimize the screening of new *M. leprae* antigens for leprosy diagnosis, our data suggest that it may be beneficial to conduct WBA testing before serological assays. If the protein is not able to induce a T cell response it could be deprioritized from further testing.

Conclusions

In summary, our results identify new *M. leprae* antigens that are recognized by antibody responses of lepromatous patients and cellular responses of tuberculoid leprosy patients. The identification of IgG-reactive antigens indicates the possibility of developing an improved serological diagnostic test for leprosy, especially if these antigens can be incorporated to supplement the current PGL-I based tests (Buhrer-Sekula *et al.* 2003; Buhrer-Sekula *et al.* 2010). For the diagnosis of tuberculoid leprosy, our data indicate the WBA is a robust, relatively simple and user friendly format with which to screen and identify new diagnostic antigens. Together, these test formats would be desirable for field use in leprosy endemic countries and could contribute to the active detection of leprosy cases before the development of deformities and disabilities.

Additional Files



Additional File 1. IFNγ production in WBA upon stimulation with PHA, MLCwA and PBS. This figure indicates IFNγ production upon stimulation with positive controls (PHA and MLCwA) and the baseline concentration without any stimulant (PBS alone) used as negative control.

	WBA IFNγ medium values (pg/ml)					IgG Serology medium values (OD)				
Protein	TT/BT	LL/BL	HHC	EC	TB	LL/BL	TT/BT	HHC	EC	TB
ML0405	153,60	0,93	85,76	0,94	0,71	1,42	0,20	0,09	0,03	0,24
ML2331	114,30	8,02	98,32	5,88	2,79	0,87	0,00	0,00	0,00	0,00
ML2055	142,75	3,08	91,97	2,13	3,19	0,88	0,01	0,08	0,00	0,01
ML1685	70,05	4,29	55,35	3,20	4,52	0.25	0,06	0,07	0,06	0,23
ML1632	109,50	13,96	56,66	1,60	1,96	0,27	0,08	0,08	0,03	0,03
ML1556	101,10	2,61	7,45	0,29	5,38	0,08	0,03	0,03	0,02	0,02
ML2044	56,09	43,56	49,53	8,76	7,87	0,18	0,14	0,13	0,12	0,12
ML0840	53,06	47,98	46,89	5,07	4,03	0,16	0,13	0,13	0,14	0,21
ML0276	62,51	48,98	76,97	2,04	1,08	1,98	1,65	0,87	0,43	0,45
ML2541	103,80	0,83	72,21	53,29	71,06	0,03	0,01	0,03	0,02	0,05
ML2203	21,03	2,57	29,07	65,62	1,37	0,02	0,00	0,00	0,01	0,02
ML2358	113,30	2,56	98,26	53,25	0,06	0,07	0,05	0,05	0,05	0,09
ML2346	123,30	0,47	58,29	26,89	61,84	0,10	0,13	0,11	0,08	0,08
ML2380	195,70	2,42	84,67	57,87	1,60	0,03	0,05	0,04	0,04	0,06
ML2603	112,90	1,38	48,56	10,13	49,32	0,04	0,07	0,04	0,04	0,06
ML0022	52,21	0,08	0,31	0,08	49,90	0,04	0,06	0,04	0,04	0,08

Additional File 2. **IFNγ produced in WBA and OD of ELISA tests to detect IgG to Immunogenic *M. leprae* recombinant proteins.** The medium values of IFNγ and IgG ELISA optical density (OD) are shown in all study groups.

	% Amino acid identity (orthologous genes)		
Gene	*M. paratuberculosis*	*M. smegmatis*	*M. microti*
ML0405	-	32 (MSMEG_0723)	72 (micro130g12.q1k)
ML2331	77 (MAP_0318)	80 (MSMEG_6281)	80 (micro299c09.q1k)
ML2055	59 (MAP_1569)	57 (MSMEG_3618)	78 (micro76h05.p1k)
ML1685	85 (MAP_1201c)	77 (MSMEG_3143)	82 (micro386a11.q1k)
ML1632	77 (MAP_1967c)	64 (MSMEG_4295)	79 (micro425b04.q1k)
ML1556	94 (MAP_4142)	87 (MSMEG_1395)	84 (micro362h01.q1k)
ML2044	71 (MAP_1587c)	66 (MSMEG_3576)	56 (micro425e08.q1k)
ML0840	35 (MAP_2122)	49 (MSMEG_4536)	43(micro4h11.q1ka)
ML0276	72 (MAP_Q73T47)	69 (MSMEG_0768)	72 (micro203h11.q1k)
ML2541	70 (MAP_2213)	67 (MSMEG_4391)	68 (micro429g03.q1ka)
ML2203	75 (MAP_0641c)	70 (MSMEG_5796)	73 (micro91h12.q1k)
ML2358	71 (MAP_2235)	61 (MSMEG_0411)	77 (micro469b02.s1k)
ML2346	-	-	-
ML2380	66 (MAP_3948c)	64 (MSMEG_3494)	69 (micro362d02.q1k)
ML2603	76 (MAP_3622)	64 (MSMEG_0220)	74 (micro414h06.p1k)
ML0022	66 (MAP_0023c)	59 (MSMEG_0035)	75 (micro473f01.s1k)

Additional File 3. **Percentage of amino acid identity of immunogenic *M. leprae* proteins with proteins from other relevant mycobacteria species.** Blast Search for amino acid identity was performed using BLAST Uniprot (http://www.uniprot.org/). (-) = no homologue found. Locus_tag orthologous genes are indicated within parentheses.

Acknowledgements

The researchers are members of the IDEAL (Initiative for Diagnostic and Epidemiological Assays for Leprosy) Consortium. This work was conducted with support from the American Leprosy Missions, The Heiser Program for Research in Leprosy and Tuberculosis of The New York Community Trust and UNICEF/UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR). Sampaio LH and Oliveira RM were supported by scholarships from CAPES and CNPq/ National Counsel of Technological and Scientific Development; Stefani MM is the recipient of a fellowship from CNPq (grant#304869/2008-2).We are grateful to the patients and staff of the Reference Center for Diagnosis and Treatment, Goiânia city for their cooperation.

Artigo 3

Evaluation of various cytokines elicited during antigen-specific recall as potential risk indicators for the differential development of leprosy

Artigo publicado na revista Europen Journal Clinical Microbiology Infection Disease em outubro de 2011. DOI 10.1007/s10096-011-1462-0.

Evaluation of various cytokines elicited during antigen-specific recall as potential risk indicators for the differential development of leprosy

Lucas H. Sampaio[1], Ana Lúcia Maroclo Sousa , Mauricio C. Barcelos[1], Steven G. Reed[2], Malcolm S. Duthie[2*] and Mariane M. A. Stefani[1*]

[*] MMAS and MSD share the senior co-authorship.

From the [1]Tropical Pathology and Public Health Institute, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil and [2]Infectious Disease Research Institute, 1124 Columbia St, Suite 400, Seattle, WA 98104

Address correspondence and reprint requests:
Infectious Disease Research Institute, 1124 Columbia St, Seattle, WA 98104
Email address: mduthie@idri.org

Abbreviations used in this paper:
BB, borderline borderline
BI, bacterial index
BL, borderline lepromatous
BT, borderline tuberculoid
HHC, healthy household contact
IQR, interquartile range
LL, lepromatous
MB, multibacillary
MDT, multi-drug therapy
PB, paucibacillary
TT, tuberculoid

Running title: Cytokine responses of leprosy.

Keywords for submission: leprosy; mycobacteria; T cell; diagnosis; IFNγ.

Abstract

Leprosy is a dermato-neurological infectious disease, caused by *Mycobacterium leprae* that can manifest across a wide range of clinical and immunological outcomes. Leprosy diagnosis is still currently based on clinical manifestations and simple, field-user friendly tests are needed. This study investigated if biomarkers induced by defined *M. leprae* antigens in whole blood assays (WBA) could discriminate active leprosy patients from at risk contacts. Newly diagnosed, untreated paucibacillary (PB; TT/BT) and multibacillary (MB; BL/LL) leprosy patients classified by Ridley Jopling and healthy household contacts of MB patients (HHC) were recruited in central western Brazil (Goiania/Goias). Blood was incubated with the recombinant antigens ML0276, ML1623, ML0405, ML1632, 92f and ML1011 for 24 hour, then luminex assays used to assess secretion of 14 cytokines (eotaxin, IFNγ, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-15, IL-17A, IL-23, IL-31, IP-10 and TNFα). Among TT/BT patients, besides IFNγ, proteins stimulated IL-2, IL-12p70 and low levels of IL-4. In WBA from LL/BL patients, higher IL-4 and IL-5 levels were detected, although IL-5 was not produced by all patients. Higher levels of IL-6, and low but significant levels of IL-15, were also elicited in BL/LL WBA. HHC produced IL-2, IL-12p70 and IL-4 besides IFNγ. While the secretion pattern from HHC was generally similar to PB patients, the cytokine pattern of one HHC was similar to MB leprosy. Our data reinforce that IFNγ remains the best biomarker of the cellular immune response of PB leprosy. None of the biomarkers tested could discriminate leprosy patients from at risk contacts.

Introduction

Leprosy is a chronic granulomatous disease that affects skin and peripheral nerves. The disease manifests across a spectrum of clinical, histopathological, and immunological outcomes, ultimately resulting in nerve damage and irreversible nerve function impairment (Scollard 2008). Major strides have been taken over the last couple of decades to eliminate leprosy as a global health problem. The provision of free-of-charge drug treatments within a WHO-directed program has driven number of registered cases down from over 15 million in 1985 to approximately 210,000 at the beginning of 2010. The number of new cases diagnosed per year has, however, remained relatively stable indicating that new breakthroughs are required to reach the intended goal of less than 1 case per 10,000 individuals that was originally set for the year 2000 (WHO 2010).

Diagnosis of leprosy remains based on clinical manifestations and delayed diagnosis is common due to either misdiagnosis or to lack of access to experienced clinicians. Estimates on the time delay between the appearance of initial symptoms to a proper diagnosis range from anywhere between 1 and 3 years in more than 50% of patients (Chen *et al.* 2000; De, Vries *et al.* 1994; Deps *et al.* 2006). Similar to leprosy, control of the global TB epidemic depends on the detection and treatment of infected persons with high risk of developing active disease, but a gold standard for diagnosis of TB has been lacking (WHO 2010). The tuberculin skin test (TST) that measures *in vivo* cell-mediated immunity to the purified protein derivative (PPD) lacks specificity and antigenic cross-reactivity can lead to false positive results (Martins *et al.* 2007). Studies have evaluated T cell responses of TB patients and BCG-vaccinated individuals to recombinant proteins and peptides derived from genes found in the RD regions present in virulent strains of *M. tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* but absent in all or most of the BCG vaccine strains (Huebner *et al.* 1993). Combinations of peptides have provided a high level of sensitivity and specificity in IFNγ T cell assays and there are now two commercially available IFNγ T-cell based assays to diagnose latent TB (QuantiFERON TB GOLD In Tube (QFN-G-IT), Cellestis Limited, Carnegie, Australia and T-SPOT TB (T-SPOT®.*TB*, T-Cell *Xtend*™), Oxford Immunotec, Abingdon, United Kingdom). These tests measure the release of IFNγ by blood T cells that have been activated *in vitro* by *M. tuberculosis* specific antigens resulting in a more specific response than the TST for the diagnosis of latent TB (Connell *et al.* 2006; Menzies *et al.* 2007; Park *et al.* 2009; Simsek *et al.* 2010). Cell-mediated interferon-γ release assays

(IGRA) are now recommended for the diagnosis of latent tuberculosis (TB) (Mazurek &Villarino 2003).

One hurdle that may complicate diagnostic test development for leprosy is the variable and dichotomous nature of immune responses of patients. Lepromatous leprosy (LL), borderline lepromatous (BL) and borderline borderline (BB) patients, which are considered as multibacillary forms (MB) for treatment purposes, demonstrate strong humoral immune responses. On the other end of the spectrum, borderline tuberculoid (BT) and tuberculoid (TT) patients, classified for treatment purposes as paucibacillary leprosy (PB), present with cellular responses to crude *M. leprae* antigen preparations (Britton *et al.* 1987; Dockrell *et al.* 2000). Strong antibody responses observed in MB patients make them amenable to diagnosis by simple rapid serologic tests (Duthie *et al.* 2007; Oskam *et al.* 2003). PB patients produce low antibody levels but typically possess strong cell mediated immunity, allowing diagnosis based upon cellular immune reactivity (Araoz *et al.* 2006a; Dockrell *et al.* 2000). Advances in the genomic and proteomic knowledge regarding *M. leprae* and other mycobacteria have prompted the discovery of novel diagnostic antigens in the research setting. Recent reports have described *M. leprae* recombinant proteins capable of inducing cellular immunity among PB leprosy (Araoz *et al.* 2006b; Geluk *et al.* 2009; Geluk *et al.* 2010). Our previous studies identified several antigens that stimulated IFNγ secretion when incubated with whole blood from TT/BT leprosy patients but not LL/BL leprosy patients or control individuals (Duthie *et al.* 2008).

Similar to the IGRA already available for TB, efforts have been made to develop a cell-mediated IFNγ-based test to diagnose PB leprosy as well as early asymptomatic disease. However a complicating factor for the development of such tests for the diagnosis of early leprosy is that *M. leprae*-exposed individuals, such as healthy household contacts (HHC) of MB patients, respond to the same antigens by secreting IFNγ (Araoz *et al.* 2006b; Geluk *et al.* 2009; Geluk *et al.* 2010). This feature limits the ability of these assays to discriminate the active PB forms (TT and BT) of leprosy from exposed at risk contacts/ early asymptomatic forms (HHC). It was unclear from those previous studies if antigen-specific production of other cytokines could distinguish PB leprosy patients from HHC.

The goal of this study was to identify at the cytokine level biomarkers that could discriminate the immune response of PB leprosy and at risk contacts. T cell reactivity

among leprosy patients and at risk contacts was explored by determining the cytokine profiles induced by defined *M. leprae* recombinant proteins.

Materials and Methods

Study participants. Newly diagnosed, previously untreated leprosy patients were recruited at a main outpatient clinic in Central-Western Brazil (Centro de Referência em Diagnóstico e Terapêutica, Goiânia, Goiás State). All leprosy patients were given complete dermato-neurological evaluations at the time of recruitment by a dermatologist with expertise in leprosy diagnosis. Leprosy patients were then further classified according to Ridley-Jopling criteria, taking into account clinical, bacilloscopic index (BI) and histopathological findings (Table 1). Healthy household contacts of MB patients (HHC) were symptom-free individuals living in the same house as the MB index case for at least 6 months prior to recruitment. HHC are presumed to be regularly exposed to *M. leprae* and has an increased risk of developing leprosy versus the general population (Bakker *et al.* 2006; Fine *et al.* 1997; Goulart *et al.* 2008). The coverage of neonatal *M. bovis* BCG vaccination in this region is almost 100% and all study participants had BCG scar. This study was approved by local and national ethics committee (CONEP, protocol # 156/2008) and participants were included after signing the appropriate informed consent forms.

Whole blood assay (WBA). WBA was performed as previously described (Duthie *et al.* 2008). Briefly, within 2 hours of collection, venous undiluted heparinized whole blood (Greiner) was plated into 24-well plates (450 µl/well; Sigma, St. Louis, MO) and incubated with stimulants for 24 hours at 37°C 5% CO_2. Each assay included stimulation with 10µg/ml of individual *M. leprae* recombinant proteins, ML0276, ML1623, ML0405, ML1632 and 92f based on previous data indicating their immunogenicity and capacity to induce specific cell mediated immune response detected only among PB leprosy and at risk contacts. The ML1011 antigen which was previously shown not to be immunogenic was used as negative control. Endotoxin levels within each protein preparation were measured by Limulus Amebocyte Lysate QCL-1000 (Lonza Inc., Basel, Switzerland) assay and were all < 100 EU/mg protein. Blood was also stimulated with PBS alone or the ML1011 protein as negative controls. Approximately 150µl plasma was collected and stored at -20°C until assay for cytokine content.

Multiplex determination of cytokine production. Luminex assays were custom developed upon request by Panomics (now Affymetrix), Fremont, CA. These 14-plex assays assessed the content of the cytokines eotaxin, IFNγ, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-15, IL-17A, IL-23, IL-31, IP-10 and TNFα. Assays were performed according to the manufacturer's instructions, with detection across a range of 1-10,000 pg/ml.

Statistical analysis. Exploratory data analysis, including box-plot and scatter plot, medians and interquartile range (IQR) were used to analyze the cytokine levels among different study groups. Statistical significance was assessed by Kruskall-Wallis one way analysis of variance for comparison of multiple groups and Mann-Whitney for comparison between two groups. Results were considered statistical significant when *p*-values < 0.05 were obtained.

Results

Main characteristics of the study groups.

Ten participants were recruited per group and the composition of each group is shown in Table 1. Among PB leprosy patients (TT or BT) females predominated and the median age of PB patients was lower than among MB patients (BL or LL) in which males prevailed. All PB leprosy patients had negative baciloscopy, while MB leprosy patients had a median BI = 3.0 (0.5-6 range). Ten healthy household contacts (HHC) of 3 recently diagnosed BL leprosy index patients with median BI = 3.0 (2-3 range) were also included. The median age of HHC was similar to the median age of the PB group. Seven out of ten HHC were consanguineous (offspring and parents) with the index case and the remaining three contacts were married with the index case. The median time of residing in the same house as the MB index case was 15 years, ranging from 4 to 40 years.

Table 1. Composition of study groups

Study group (n)	Ridley & Joplin Classification	Sex (F/M)	Median Age (min/max)
TT/BT (10)	(3 TT /7 BT)	(6/4)	35 (19-69)
BL/LL (10)	(6BL /4LL)	(4/6)	51 (22-73)
HHC (10)	n/a	(5/5)	36 (18-69)

Sex F- female; M- male; n/a- not applicable; TT/BT-Tuberculoid/Boderlne tuberculoid leprosy patients; BL/LL- Boderline lepromatous/Lepromatous leprosy patients; HHC-Lepromatous house hold contact; Min- minimum; Max-maximum.

Cytokine profiles of the antigen-specific responses of TT/BT leprosy patients. As expected based on previous IFNγ detection by ELISA on WBA plasma from TT/BT leprosy patients, antigen-specific IFNγ was readily detected using the multi-analyte luminex platform. In agreement with our previous observations, significantly more IFNγ was produced when blood from TT/BT patients was incubated with each protein, with the exception of ML1011 (Figure 1). The 92f protein stimulated the greatest IFNγ levels (Figure 1A; mean 217 pg/ml, range 170-290 pg/ml), with responses of all 10 TT/BT patients well above the detected baseline (PBS) levels (mean 49 pg/ml, range 29-71 pg/ml). A clear distinction of the antigen-stimulated from PBS-control samples could also be made following incubation with the ML1623 protein (Figure 1A; mean 171 pg/ml, range 118-269 pg/ml). The multi-analyte results confirm that TT/BT leprosy patients can produce IFNγ in response to these proteins.

To determine if other cytokines could provide a stronger signal over baseline, both the pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines were analyzed. Of the additional cytokines analyzed, only IL-2, IL-4 and IL-12p70 were stimulated during incubation of TT/BT patient blood with the various proteins (ML0276, ML1623, ML0405, ML1632, 92f; Figure 1 and data not shown). Although the *M. leprae* proteins stimulated increases in each patient (Figure 1B), only the ML1632 (mean 74 pg/ml, range 61-91 pg/ml) protein increased IL-2 secretion of all 10 TT/BT patients to levels above all 10 of the baseline values (mean 43 pg/ml, range 24-58 pg/ml). For IL-12p70, the clear distinction of the PBS-control samples (mean 29 pg/ml, range 18-41 pg/ml) from stimulated samples was achieved with the ML0276 (mean 62 pg,/ ml, range 43-88 pg/ml), ML1623 (mean 61 pg/ml, range 43-89 pg/ml) and ML0405 (mean 58 pg/ml, range 42-77 pg/ml) proteins. Although IL-4 levels were significantly elevated when

stimulated with ML0276, ML1623 and 92f proteins (from a baseline mean 9 pg/ml to means of 13, 13 and 14 pg/ml, respectively), the levels produced were extremely low.

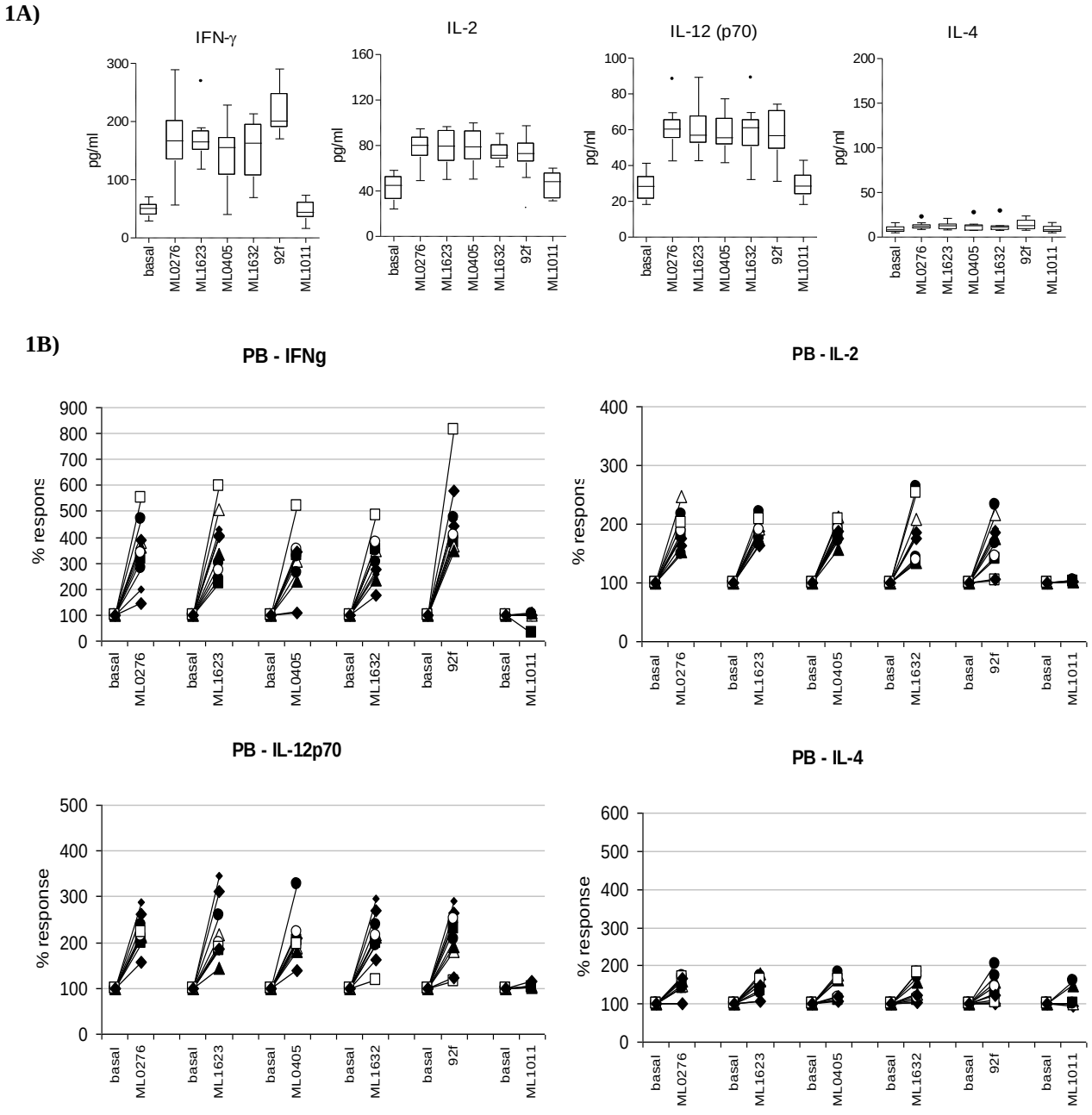


Figure 1. **Antigen-specific cytokine responses of TT/BT leprosy patients**. Blood from newly diagnosed TT/BT leprosy patients was incubated with recombinant antigen (10μg/ml) for 24 hours, then plasma was removed and subjected to multi-analyte analysis by luminex assay. In (A), the concentration of cytokine in each plasma was determined. Results are presented as box and whisker plots, with the boxes encompassing the 25th and 75th percentiles, and the black line within each box indicating the median value, n = 10 per group. In (B), the per cent change in cytokine produced upon antigen stimulation relative to PBS-stimulated (basal) levels for each is plotted. Each patient is represented by a different symbol.

Cytokine profiles of the antigen-specific responses of LL/BL leprosy patients. Antigen-specific T cell responses were also evaluated in LL/BL leprosy patients that demonstrate potent antibody responses. We anticipated that these patients would respond to antigen stimulation with cytokines characteristic of the humoral response. In agreement, the pro-inflammatory cytokines detected upon incubation with TT/BT patient blood (IL-2, IFNγ, IL-12p70) were not produced by incubating LL/BL patient blood with any of the *M. leprae* proteins (data not shown). Significantly more IL-4, however, was produced when blood from LL/BL patients was incubated with each protein, with the exceptions of ML1632 and ML1011 (Figure 2). None of the stimulatory proteins, however, generated IL-4 responses that could distinguish all of the LL/BL patients above the baseline levels (mean 27 pg/ml, range 6-68 pg/ml). The greatest IL-4 levels were stimulated by ML0276 (mean 73 pg/ml, range 23-182 pg/ml) and ML1623 (mean 71 pg/ml, range 21-181 pg/ml). Similar to IL-4, a clear distinction of the antigen-stimulated from PBS-control samples could not be made using IL-5 as a measure of response. Although incubation with the ML0276, ML1623 and ML0405 proteins significantly elevated IL-5 secretion, the amount produced in some samples was still below the highest baseline level detected (Figure 2). IL-10 production was not detected in response to any of the proteins (data not shown). Significantly elevated levels of IL-6 were induced upon incubation of LL/BL patient blood with the ML0276, ML1623, ML0405 and 92f proteins. Low, but significant, levels of IL-15 were also elicited by incubation with ML0405 and 92f. These results indicate that a weak Th2 response can be detected in LL/BL leprosy patient blood following incubation with the selected proteins.

Cytokine profiles of the antigen-specific responses of HHC. Finally, previous studies have indicated that the antigen-specific IFNγ responses of HHC are similar to those of TT/BT leprosy patients (Duthie *et al.* 2008, Sampaio *et al*. 2011). Therefore, to determine if HHC could be distinguished from TT/BT patients by the secretion of other cytokines, blood from HHC was stimulated with the same antigens and plasma subjected to luminex assay. Nine of ten HHC demonstrated strong and significant IFNγ responses to all proteins that induced responses in TT/BT patients (Figure 3). Those contacts also responded similar to TT/BT patients in respect to IL-2, IL-12p70 and IL-4 production (Figure 3). For the HHC that did not demonstrate an antigen-specific IFNγ response, incubation with ML0276, ML1623, ML0405 and ML1632 did stimulate IL-4,

IL-5 and IL-15 secretion (Figure 4). Unlike the responses of any other study participant, this HHC secreted eotaxin in response to antigen stimulation (ML0276, ML1623 and ML0405).

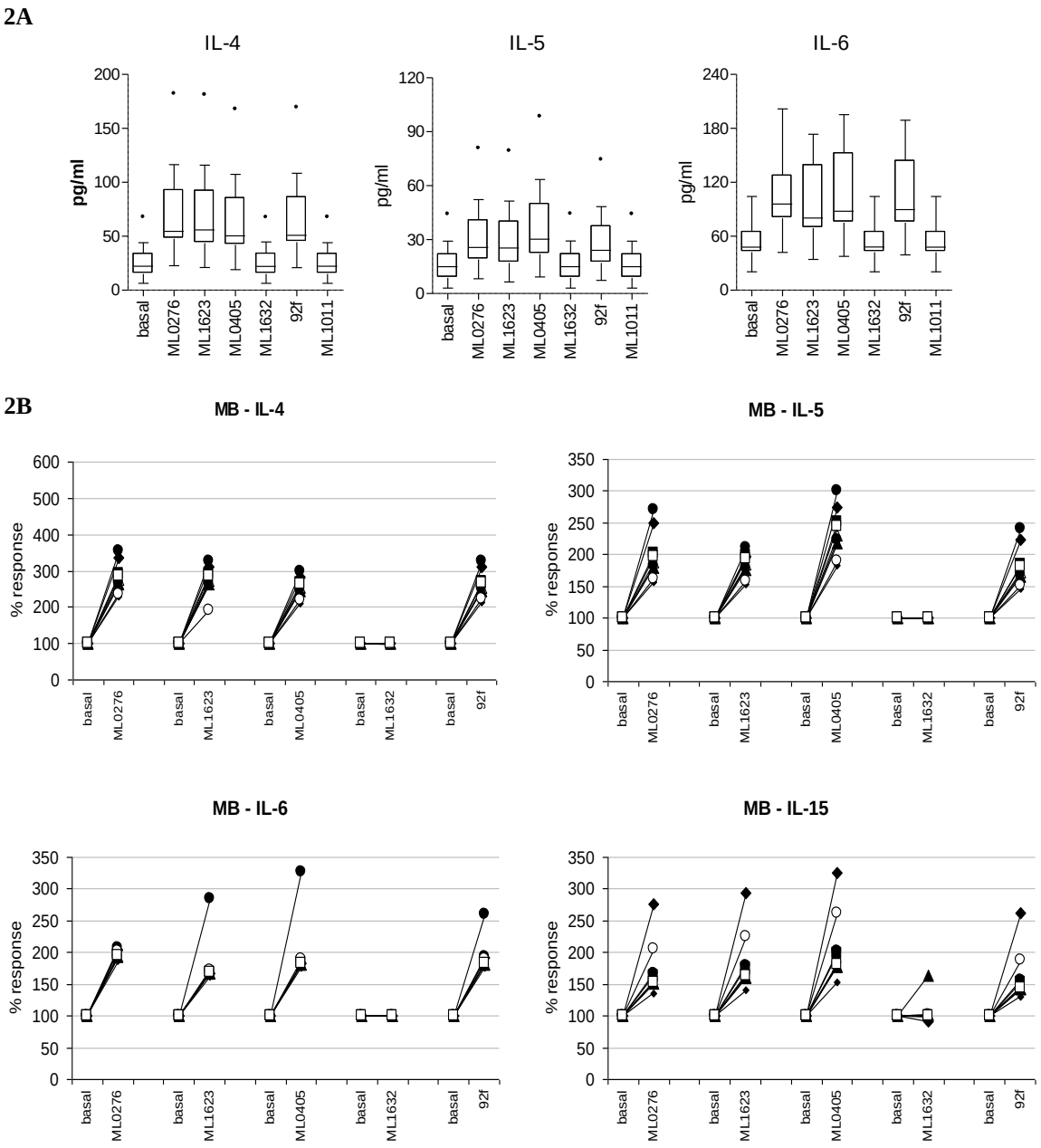


Figure 2. **Antigen-specific cytokine responses of LL/BL leprosy patients.** Blood from newly diagnosed LL/BL leprosy patients was incubated with recombinant antigen (10μg/ml) for 24 hours, then plasma was removed and subjected to multi-analyte analysis by luminex assay. In (A), the concentration of cytokine in each plasma was determined. In (B), the per cent change in cytokine produced upon antigen stimulation relative to PBS-stimulated (basal) levels for each is plotted. Each patient is represented by a different symbol.

3A)

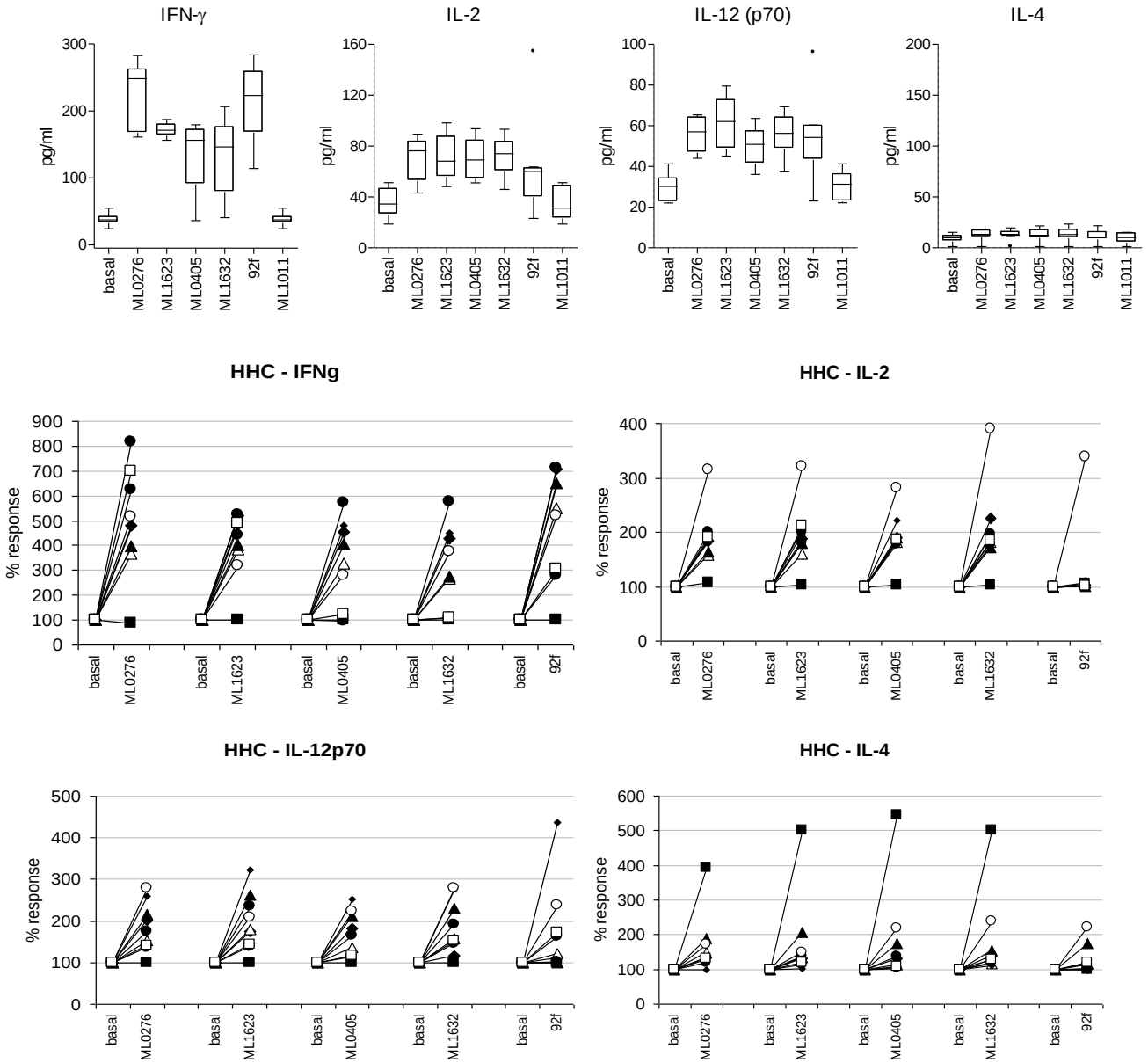


Figure 3. **Antigen-specific cytokine responses of HHC**. Blood from HHC was incubated with recombinant antigen (10μg/ml) for 24 hours, then plasma was removed and subjected to multi-analyte analysis by luminex assay. In (A), the concentration of cytokine in each plasma was determined. Results are presented as box and whisker plots, with the boxes encompassing the 25th and 75th percentiles, and the black line within each box indicating the median value, n = 10 per group. In (B), the per cent change in cytokine produced upon antigen stimulation relative to PBS-stimulated (basal) levels for each is plotted. Each patient is represented by a different symbol.

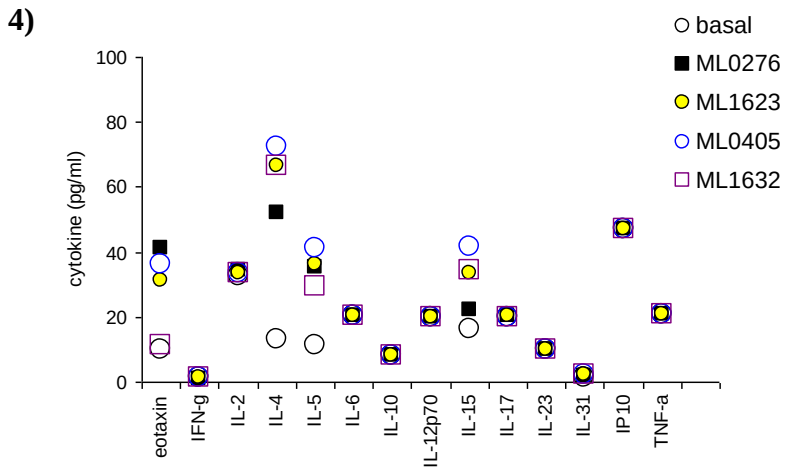


Figure 4. **Antigen-specific cytokine responses of a HHC presenting with a distinct profile.** Blood from HHC was incubated with recombinant antigen (10μg/ml) for 24 hours, then plasma was removed and subjected to multi-analyte analysis by luminex assay. The concentration of cytokine elicited in response to antigen was determined, and each antigen is represented by a different symbol.

Discussion

Although a large decline in the global prevalence of leprosy has been achieved over the last two decades, the detection rate for new cases in many regions remains above the threshold targeted within the WHO campaign (WHO 2010). Thus, even in 2010, leprosy remains an important public health problem in many countries. At present, leprosy diagnosis is classically achieved by clinical exam. It is evident that earlier diagnosis is critical for a further reduction in the sources of transmission and to prevent severe manifestations and disabilities. Our data provide evidence that antigen-specific IFNγ secretion is currently the best biomarker of tuberculoid type leprosy (TT and BT cases) and demonstrate that the same antigens promote IL-4 secretion from lepromatous leprosy (LL, BL and BB cases) patient blood. Our results also demonstrate that while most HHC have antigen-specific responses qualitatively similar to tuberculoid patients some HHC may respond like lepromatous patients.

While antibodies may provide a rapid and simple tool to evaluate for changes in bacterial load during treatment, antibody responses of TT/BT leprosy patients are generally weak, and those antigens that are recognized, are not recognized consistently across the TT/BT patient population (Cho *et al.* 2001; Duthie *et al.* 2007). On the other

hand, TT/BT patients typically possess cellular responses against *M. leprae* (Araoz *et al.* 2006b; Geluk *et al.* 2009; Geluk *et al.* 2010). Until recently, however, few proteins had been demonstrated to be reactive in a significant proportion of the TT/BT population and even fewer demonstrated specificity to leprosy patients. We recently identified a number of proteins that elicit IFNγ secretion upon incubation with TT/BT leprosy patient blood, but not when incubated with blood from tuberculosis patients and healthy endemic controls (Sampaio *et al*. 2011). A concern regarding the use of these assays to diagnose tuberculoid leprosy patients is that, in the context of IFNγ secretion, they cannot differentiate patients from HHC (Araoz *et al.* 2006b; Geluk *et al.* 2009; Geluk *et al.* 2010). The data presented here confirm that IFNγ, and an additional 13 cytokines/ chemokines analyzed, could not differentiate the antigen-specific responses of tuberculoid leprosy patients and the majority of HHC.

The cytokine/chemokine multiplex technology has proven useful in leprosy studies identifying possible biomarkers of type I (T1R) and type II (T2R) reactions as well as biomarkers of the T cell responses estimulated by *M. leprae*-peptides in short term WBA. The nested case-control study among T1R, T2R leprosy patients described elevations of plasma CXCL10/IP-10 and IL-6 in T1R patients and IL-6, IL-7 and PDGF-BB elevation in T2R (Stefani *et al*. 2009). In the T cell responses to *M. leprae* peptides the search for other candidate biomarkers of activation in WBA in the presence or absence of IL-12 included 17 cytokines/ chemokines tested in multiplex assays. Increase in cytokine production was significant only for IFNγ, not for IP-10/CXCL10 (Geluk *et al.* 2010).

The IgG response to protein antigens suggests T cell responses have been elicited in LL/BL leprosy patients, although these patients are typically considered anergic because of their lack of T cell response to crude antigen (Britton *et al.* 1987; Molloy *et al.* 1990). Indeed, we recently demonstrated that several antigens recognized by IFNγ secretion by PB patients are recognized by the antibody response of MB patients (Sampaio *et al.* 2011) We therefore believed that antigen-specific T cell responses could also be revealed in MB patients by analysis of appropriate cytokines. In response to antigen stimulation, we observed secretion of Th2-associated (IL-4 and IL-5) cytokines from MB patient blood. IL-4, via upregulation of CD209, has been implicated in Schwann cell entry by *M. leprae,* and thus the antigen-specific response of MB patients may actually perpetuate infection (Teles *et al*. 2010). Intriguingly, one of the ten HHC examined produced IL-4 and IL-5, but not IFNγ, in response to antigen. While we

acknowledge that larger sample size is necessary to validate our results and larger HHC cohorts and follow-up of such individuals are required to determine the true prognostic value of these results, it is tempting to speculate that this HHC may be predisposed to, or may in fact be in the early stages of developing, the lepromatous form of leprosy.

We were surprised to detect secretion of cytokines such as IL-12 and IL-15, as these cytokines are typically secreted from antigen presenting cells. It is possible that these cytokines produced by antigen presenting cells were induced either indirectly through antigen-specific activation of T cells leading to feedback and stimulation or directly by an endotoxin contamination of the protein preparation. We consider the latter possibility unlikely because all of the proteins evaluated possessed low levels (< 100 EU/mg) and neither the control protein ML1011 nor ML1632 stimulated IL-12p70 or IL-15 secretion from TT/BT or LL/BL patient blood, respectively. Another surprise was the differential secretion of the cytokines IL-2 and IL-15 in the PB/HHC and MB groups. Both IL-2 and IL-15 serve as T cell growth factors and are able to facilitate production of antibodies. Different roles can be observed in adaptive responses, where IL-2 can participate in the maintenance of regulatory T cells and the reduction of self-reactive T cells, and IL-15 maintains highly specific T cell responses by supporting survival of memory CD8 T cells (Rochman *et al.* 2009). How, or even if, these different roles could influence leprosy is unclear. IL-2 is one of the most abundant cytokines secreted from Th1 cells, and antigen-specific IL-2 secretion is therefore consistent with the Th1 response being the predominant immune phenotype in tuberculoid leprosy patients (Gor *et al.* 2003; Misra *et al.* 1995). Conversely, IL-15 has been shown to induce IL-4Rα expression, which indicates that it might be able to prime T cells for Th2 cell differentiation. This is consistent with involvement of IL-15 in the predominant Th2 immune phenotype observed in lepromatous leprosy patients (Liao *et al.* 2008).

Our results corroborated with previous studies and presented a great similarity between the *ex vivo* cytokines response stimulated with *M. leprae* recombinant proteins and *in situ* cytokines production in leprosy patients. Those previous studies showed a large amount of IL-4, IL-5 and IL-6 mRNA in LL/BL leprosy patients (Misra *et al.* 1995; Sieling and Modlin 1994; Yamamura *et al.* 1991). The cytokine IL-15, which was produced by LL/BL patients in our study, was not investigated in previous *in situ* cytokine mRNA studies. Although previous investigations have found high levels of IL-10 *in situ* (Sieling and Modlin 1994), we did not find an increase of this cytokine in

WBA of LL/BL patients. Similarly to our results, previous studies of cytokine mRNA *in situ* in TT/BT leprosy patients showed especially the production of IL-2, IL-12 and IFNγ (Misra *et al.* 1995; Sieling and Modlin 1994; Yamamura *et al.* 1991).

Our data suggest that antigen-specific IFNγ secretion could be used as an indicator of *M. leprae* exposure or infection that is progressing along the tuberculoid pole, whereas IL-4 or IL-5 could be used as an indicator of *M. leprae* exposure or infection that is progressing toward the lepromatous pole. These data can be used to inform new diagnostic initiatives with the intent of identifying highly at-risk individuals and providing differential leprosy diagnoses/ prognoses. It is hoped that the development and application of a simple, user and field friendly diagnostic test for the early detection of leprosy will help leprosy control programs.

Acknowledgements

This work was conducted with support from the American Leprosy Missions, The Heiser Program for Research in Leprosy and Tuberculosis of The New York Community Trust and UNICEF/UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR). The researchers are members of the IDEAL (Initiative for Diagnostic and Epidemiological Assays for Leprosy) Consortium. Stefani MM is the recipient of a fellowship from the National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq/ Brazil) (grant#304869/2008-2). The authors are grateful to the patients and staff of the "Centro de Referência em Diagnóstico e Terapêutica" in Goiânia/Goiás for their cooperation and support.

7. DISCUSSÃO GERAL

No contexto da eliminação da hanseníase como problema de saúde pública no mundo, o diagnóstico precoce de todas as formas clínicas juntamente com a MDT são cruciais para diminuir a transmissão e a progressão da doença. O tratamento precoce contribui para reduzir as deformidades e incapacidades permanentes características de doença avançada. Entretanto para introduzir o tratamento precoce é preciso que o diagnóstico também seja feito precocemente. Apesar do agente causador da hanseníase ter sido o primeiro patógeno associado à infecção humana descrito, ainda hoje o diagnóstico da doença se baseia em sinais e sintomas. Pacientes com hanseníase PB apresentam, do ponto de vista clínico, poucas lesões cutâneas que são geralmente pequenas, hipocrômicas ou eritematosas, com limites bem definidos (Ridley and Jopling 1966). O diagnóstico diferencial destas manifestações cutâneas pode ser dificultado, pois as lesões são facilmente confundidas com outras doenças de pele. Esta dificuldade pode levar ao sub-diagnóstico ou até mesmo a erros no diagnóstico da hanseníase.

Na ausência de sinais clínicos patognomônicos, o diagnóstico de certeza de uma doença infecciosa pode ser realizado pelo achado do patógeno nos tecidos dos hospedeiros (Bravo and Procop 2009). O exame histopatológico da lesão tuberculóide geralmente mostra a formação de um granuloma robusto, com células epitelióides, múltiplas células fagocitárias mononucleares e linfócitos entre a derme e epiderme basal. Porém o achado de bacilos, crucial para a definição do diagnóstico da hanseníase, dificilmente ocorre nos cortes histológicos de pacientes tuberculóides (Ridley and Jopling 1966). O resultado do exame baciloscópico de raspado intradérmico desses pacientes também se mostra geralmente negativo (Bloom 1998). Desta forma o diagnóstico de certeza da hanseníase PB pode ser dificultado pela escassez de sintomas clínicos e pela baixa sensibilidade dos testes laboratoriais para identificar o *M. leprae* em biópsia de lesão de pele e em raspado intradérmico. Nas duas últimas décadas vários estudos focaram abordagens para o diagnóstico molecular da hanseníase pela amplificação de diferentes genes do *M. leprae* por reação em cadeia da polimerase (ML-PCR) (Santos *et al.* 1995; Sousa *et al.* 2007; Williams & Gillis 1991). Em geral os resultados destes estudos indicaram que diferentes ensaios de ML-PCR se mostraram extremamente específicos, porém pouco sensível para as formas PB. Neste contexto, estudos como este, que pesquisam novos antígenos e o desenvolvimento de testes para

diagnóstico laboratorial da hanseníase paucibacilar, representam uma prioridade na pesquisa da hanseníase.

Levando-se em conta a dificuldade em se confirmar a hanseníase PB pelo achado direto do *M. leprae* ou do seu material genético por PCR, a aplicação de métodos sorológicos para o diagnóstico da hanseníase PB também tem sido investigada. Métodos sorológicos utilizam amostras biológicas menos invasivas e são considerados de simples execução, rápidos e de baixo custo operacional. O teste sorológico melhor padronizado e mais utilizado para hanseníase é a pesquisa de anticorpos IgM anti PGL-I, que é um antígeno específico do *M. leprae*. Diversos estudos indicaram que a sorologia anti PGL-I apresenta alta especificidade e sensibilidade para pacientes MB. Entretanto a sorologia anti PGL-I apresenta baixa sensibilidade para pacientes PB, pois estes apresentam classicamente resposta imune celular do tipo Th1 ao *M. leprae* (Buhrer-Sekula *et al.* 2003; Cellona *et al.* 1993; Douglas *et al.* 1992). Vários outros estudos pesquisaram a reatividade sorológica de pacientes com hanseníase a outros antígenos, como proteínas secretadas e recombinantes do *M. leprae* (Araoz *et al.* 2006; Duthie *et al.* 2007; Klatser *et al.* 1997; Reece *et al.* 2006). Estes estudos empregando antígenos protéicos do *M. leprae* reafirmaram a baixa sensibilidade dos testes sorológicos para o diagnóstico da hanseníase PB. Os resultados do presente trabalho, que também avaliou a reatividade humoral a proteínas recombinantes *do M. leprae,* confirmaram a resposta baixa ou ausente de anticorpos em pacientes PB. Analisando estes resultados em conjunto concluímos que dificilmente serão desenvolvidos testes sorológicos sensíveis para o diagnóstico das formas PB da hanseníase, pois estes pacientes não produzem anticorpos contra os antígenos do *M. leprae* ou o fazem em baixa concentração.

A resposta imune na hanseníase apresenta natureza dicotômica, na qual pacientes PB apresentam resposta imune humoral fraca ou ausente e forte resposta imune celular a antígenos do *M.* leprae, enquanto pacientes MB apresentam forte produção de anticorpos e baixa resposta celular. Neste contexto, vários grupos passaram então a explorar a reatividade imune celular induzida a peptídeos e proteínas do *M. leprae* em ensaios *ex vivo* utilizando PBMCs de pacientes PB (Dockrell *et al.* 2000; Geluk *et al.* 2009; Geluk *et al.* 2008; Spencer *et al.* 2005). Esses estudos demonstraram alguns peptídeos imunogênicos e indutores resposta imune celular, com potencial aplicabilidade no diagnóstico de pacientes PB. Entretanto além de específico e sensível,

um teste laboratorial para diagnóstico deve ser de baixo custo, rápido, reprodutível e de simples execução. A separação e cultura de PBMCs depende de laboratório com equipamentos e reagentes laboratoriais de alto custo além de pessoal técnico altamente treinado. Estes fatores dificultariam a sua realização em rotina como teste diagnóstico. Nesse sentido, o ensaio de sangue total (EST) foi proposto como uma alternativa mais simples para se avaliar resposta imune celular *ex vivo*. O uso de sangue total não diluído parece ser uma abordagem mais usual e mais facilmente aplicável que a utilização de PBMCs para o desenvolvimento de um teste diagnóstico. O EST exige menor manipulação, diminuindo o risco de contaminação e não requer separação de células, o que diminui os custos do teste. Nosso grupo tem pesquisado a resposta imune celular, avaliada pela capacidade de estimular IFNγ, a várias proteínas recombinantes do *M. leprae* em pacientes com hanseníase e controles com tuberculose e indivíduos saudáveis de área endêmica. Os resultados do presente estudo comprovam que a pesquisa de IFNγ em EST é um teste robusto, relativamente simples e eficiente, que pode potencialmente ser empregado para o diagnóstico da hanseníase PB. Esse formato de teste seria desejável para uso de rotina em países endêmicos e poderiam contribuir para a detecção ativa de casos de hanseníase paucibacilar, antes do desenvolvimento de deformidades e incapacidades físicas.

Como existe uma enorme homologia entre o proteoma do *M. leprae* e o proteoma de outras micobactérias, estudos mostraram que o uso de peptídeos pode resultar em melhor especificidade do teste comparado a proteínas. Esta abordagem permitiria o uso de porções antigênicas não existentes em outras micobactérias, evitando assim uma possível reatividade cruzada. Um estudo multicêntrico do consórcio internacional de pesquisa IDEAL, do qual nosso grupo participou, avaliou a reatividade imunológica frente à estimulação com 22 peptídeos do *M. leprae.* Este estudo mostrou que os peptídeos selecionados não induziram a produção de IFNγ em EST de pacientes com hanseníase PB (Geluk *et al.* 2009). Estudo posterior mostrou que peptídeos do *M. leprae* requerem a adição de IL-12 recombinante para induzir a produção de IFNγ em EST de pacientes com hanseníase PB (Geluk *et al.* 2010). No entanto, a adição de IL-12 aumentaria ainda mais os custos de um possível teste com potencial aplicabilidade no diagnóstico de rotina da hanseníase PB. Além disso, a IL-12 pode estimular de forma inespecífica a produção de IFNγ por células T e NKs contidas no sangue periférico do paciente (Lee *et al.* 1998). Tais fatores limitam a adição dessa citocina no EST com

peptídeos do *M. leprae* na tentativa de desenvolvimento de um teste laboratorial para diagnóstico da hanseníase PB. A dificuldade em se identificar peptídeos que induzam resposta imune celular em sangue total diminui muito a possibilidade do uso de peptídeos do *M. leprae* em formato de um teste simples. Adicionalmente estes resultados reforçam a importância de estudos como este, que pesquisou a potencial aplicabilidade de proteínas recombinantes no diagnóstico da hanseníase PB por EST.

De acordo com a resposta imune celular a antígenos recombinantes do *M. leprae* observada em pacientes com hanseníase e controles as proteínas recombinantes do *M. leprae* que foram testadas apresentaram diferentes padrões de resposta. Baseados na reatividade imune mensurada pela produção de IFNγ, propusemos a categorização das proteínas do *M leprae* em três grupos. Os seguintes grupos foram propostos: "Proteínas Imunogênicas e Indutoras de Resposta Imune Celular Específica", "Proteínas Imunogênicas e Indutoras de Resposta Imune Celular Não Específica" e "Proteínas Não Imunogênicas". Estudos anteriores sobre a resposta imune celular baseada na produção de IFNγ a outras 47 proteínas recombinantes do *M. leprae* também mostraram classificação semelhante (Dockrell *et al.* 1989; Dockrell *et al.* 1996; Dockrell *et al.* 2000, Spencer *et al*. 2005, Araoz *et al.* 2006, Araoz *et al.* 2005 Geluk *et al.* 2005, Geluk *et al.* 2006, Geluk *et al.* 2009).

Nossos resultados com EST e proteínas recombinantes mostraram que a maior a produção de IFNγ em resposta a proteínas imunogênicas foi observada nos grupos de pacientes com hanseníase PB e em contactantes de pacientes com hanseníase MB (HHC). Esse padrão de reatividade é semelhante ao padrão observado em outros estudos que pesquisaram a resposta imune celular a proteínas recombinantes do *M. leprae* em pacientes e controles de diferentes regiões do planeta. Em geral, todos os estudos mostraram que pacientes PB e contactantes de MB respondem com maior intensidade a estimulação aos antígenos do *M leprae* (Araoz *et al.* 2006, Geluk *et al.* 2005, Geluk *et al.* 2009). Contatos domiciliares de pacientes com hanseníase multibacilar têm um risco aumentado de adoecimento e podem representar casos inicias da doença, antes mesmo do aparecimento dos primeiros sinais e sintomas da hanseníase (Bakker *et al* 2006; Van Beers *et al* 1999). Não se sabe o real significado desta forte resposta imune celular as proteínas recombinantes do *M. leprae* em contactantes sendo difícil predizer se estes indivíduos apresentam resposta imune protetora ou se estão com infecção subclínica (Araoz *et al.* 2006). Estudo de coorte com seguimento de longo prazo com contatos

domiciliares que apresentam resposta imune a proteínas recombinantes do *M. leprae* poderá determinar se essa resposta antígeno-específica de HHC é devido a uma infecção sub-clínica ou simplesmente uma resposta imune protetora contra a hanseníase.

O uso de testes com base na secreção de IFNγ em resposta a proteínas recombinantes não permite discernir os pacientes PB de HHC (Araoz *et al.* 2006b; Geluk *et al.* 2009; Geluk *et al.* 2008). Porém a pesquisa adicional de outras 12 diferentes citocinas/quimiocinas realizada em nosso estudo também não conseguiu diferenciar as respostas antígeno-específica de pacientes com hanseníase PB e da maioria dos HHC. Curiosamente, um dos dez HHC examinados produziu IL-4 e IL-5, mas não IFNγ em resposta as proteínas recombinantes. Reconhecemos que um estudo com um número maior de amostras seja necessário para determinar o verdadeiro valor prognóstico desses resultados. No entanto, é possível especular que este único contactante que produziu IL-4 e IL-5 em resposta as proteínas recombinantes, pode ser uma paciente MB sub-clínico ou no mínimo que este contactante esteja mais predisposto ao desenvolvimento da forma lepromatosa da hanseníase.

De acordo com os resultados das análises *in silico*, o alto grau de homologia de grande parte das proteínas testadas em nosso estudo em relação ao proteoma de outras micobactérias parece não interferir na especificidade das respostas de pacientes com hanseníase PB. Por exemplo, a ML2331, apesar de ter 81% de identidade com o seu homólogo TB, induziu resposta imune celular apenas nos grupos PB e HHC. Em contraste, a ML0398, que não tem homólogo no *M. tuberculosis*, induziu fortes respostas IFNγ em todos os grupos testados, incluindo pacientes com TB. Segundo nossas análises, as proteínas imunogênicas e indutoras de resposta específica têm homologia que variam de 0 a 83% com alguma proteína do *M. tuberculosis e M. bovis.* É importante destacar que apesar do alto percentual de homologia apresentada, as proteínas imunogênicas e indutoras de resposta imune específica não demonstraram reação cruzada com pacientes do grupo TB nem entre indivíduos do grupo CE, cujos integrantes eram vacinados com BCG. Nossos resultados sugerem que, ao contrário do que defende outros estudos (Geluk *et al.* 2009; Geluk *et al.* 2005), previsões *in silício* devem ser usadas com muita cautela na tentativa de prever a especificidade na triagem de antígenos com potencial aplicabilidade diagnóstica.

Análises *in silico* de imunogenicidade realizadas em nossos estudos previram a presença de epítopos de células T em todas as proteínas do *M. leprae* testadas. No

entanto, apesar da previsão de que todas as proteínas avaliadas seriam imunogênicas pois possuiriam vários epítopos de HLA-DR, mais da metade das proteínas avaliadas (27 de 43) não foi reconhecida por células T periféricas de pacientes com hanseníase ou controles. Nossos resultados estão de acordo com estudos anteriores, que mostraram que grande parte das proteínas recombinantes do *M. leprae* não são imunogênicas (Araoz *et al.* 2006b; Geluk *et al*. 2009; Geluk *et al.* 2008, Geluk e Ottenhoff 2006). Várias possibilidades poderiam explicar a falta de reatividade. Uma possibilidade mais provável é que essas proteínas, embora presentes no genoma do *M. leprae*, possam não ser traduzidas. Outra explicação poderia ser a supressão de células T a fim de evitar danos nos nervos pela morte de células de Schwann infectadas pelo *M. leprae*. Não podemos excluir, ainda, a possibilidade de que as proteínas investigados não foram reconhecidos, pois os indivíduos com o HLA adequado não foram recrutados. Além disso, o fato de as proteínas apresentarem peptídeos que se ligam a varias formas alélicas de MHC, não significa que essas proteínas serão reconhecidas pelos TCRs dos indivíduos recrutados. Porém concluímos que as ferramentas *in silico* utilizadas nesse estudo não foram capazes de prever a imunogenicidade e especificidade das proteínas recombinantes do *M. leprae* e por isso não devem ser utilizadas como critério definitivo para excluir qualquer antígeno de outras avaliações quanto a potencial aplicabilidade no diagnóstico da hanseníase.

Como o *M. leprae* é uma bactéria não cultivável em meio de cultura axênico é possível apenas predizer a função, imunopatogenicidade e grau de virulência da maioria das proteínas recombinantes com base em comparações por semelhança com proteínas de outras micobactérias (Cole *et al.* 2001). De acordo com o site do Leproma a maioria dos antígenos investigados em nosso estudo, por exemplo a ML0405, ML0276 e ML0840, são proteínas hipotéticas. Apenas algumas proteínas têm função atribuída por comparação proteômica com outras espécies. Entre as proteínas imunogênicas e indutoras de resposta imune específica, a ML2055 parece ser uma fibronectina de ligação com a célula hospedeira, a ML2331 é possivelmente uma proteína secretada com função desconhecida, enquanto as proteínas ML2044 e ML1632 são prováveis hidrolases presentes na parede celular do *M. leprae*.

É possível que as proteínas imunogênicas e indutoras de resposta imune celular específica mostradas em nosso estudo sejam menos imunogênicas em outras populações devido diferenças étnicas e genéticas. Um estudo mostrou que as diversas populações respondem de forma diferenciada a uma determinada proteína do *M. leprae*,

provavelmente devido a diversidades alélicas de HLA (Geluk & Ottenhoff 2006). É provável que vários antígenos tenham que ser usados para fornecer o diagnóstico em um teste de formato único aplicável todas as regiões endêmicas de hanseníase e estamos neste momento realizando estudos para tratar dessa possibilidade. O kit Quantiferon TB Gold in tube, por exemplo, utiliza uma mistura de antígenos das proteínas ESAT-6, CFP-10 e TB7.7 para diagnosticar pacientes com tuberculose latente de diferentes populações (Perry *et al.* 2008; Legesse *et al.* 2011).

Em estudo anterior do nosso grupo de pesquisa, a reatividade de anticorpos IgG contra proteínas recombinantes do *M. leprae* sugeriu a existência de resposta de células T em pacientes MB (Duthie *et al*. 2007). Porém não foi observada em nossos estudos ou em trabalhos de outros grupos a produção de IFNγ em resposta a proteínas recombinantes *M. leprae*, entre pacientes MB (Spencer *et al.* 2005, Araoz *et al.* 2006b, Geluk *et al*. 2009; Geluk *et al.* 2008). Por isso acreditávamos que a respostas antígeno específica de células T também poderia ser mostradas em pacientes MB, pela análise das citocinas apropriadas. Em resposta à estimulação antigênica, nossos resultados mostraram uma significativa secreção de citocinas Th2 (IL-4 e IL-5) no EST de paciente MB. Essa forte secreção das citocinas IL-4 e IL-5 corrobora com estudos anteriores que mostraram grandes concentrações *in situ* de RNAm codificador dessas mesmas citocinas (Yamamura *et al.* 1991, Misra *et al.* 1995). Embora as investigações anteriores já haviam mostrado altos níveis de IL-10 *in situ* em pacientes MB (Nath *et al*. 2000, Sieling & Modlin 1994), não encontramos um aumento desta citocina no sangue de pacientes MB, após o estímulo com proteínas recombinantes do *M. leprae*.

Além da secreção de IL-4 e IL-5, nós encontramos ainda a secreção significativa de IL-6, uma citocina geralmente não associada ao perfil Th2, em resposta as proteínas recombinantes do *M. leprae* no EST de paciente MB. Estudos anteriores mostram que IL-6 estimula fortemente a ativação de células B em plasmócitos produtores de anticorpos (Suematsu *et al*. 1989; Kishimoto 2010) e a forte resposta imune humoral é uma das características mais marcantes de pacientes MB. Além disso, estudos anteriores mostraram grandes concentrações *in situ* de RNAm codificador da citocinas IL-6 em pacientes MB (Misra *et al.* 1995, Sieling & Modlin 1994).

De forma inesperada, observamos a secreção diferencial das citocinas IL-2 e IL-15 nos grupos PB e MB. Tanto a IL-2 quanto a IL-15 servem como fatores de crescimento de células T. Porém, diferentes papéis podem ser observados para essas

citocinas, como o fato de a IL-2 ser crucial na manutenção de células T reguladoras e na redução de células T auto-reativas, enquanto a IL-15 estimula mais fortemente a sobrevivência e proliferação de células NK e TCD8+ de memória (Rochman *et al*. 2009). A IL-2 é uma das citocinas mais abundantemente secretada pelas células Th1 na lesão de pacientes PB (Yamamura *et al.* 1991, Misra *et al.* 1995) e a produção antígeno-específica dessa citocina é, portanto, consistente com a resposta Th1 observada nos pacientes com hanseníase PB em resposta as proteínas recombinantes avaliadas. A produção de IL-15 não foi demonstrada em estudos anteriores que pesquisavam a produção de citocinas em pacientes com hanseníase, o que dificulta a explicação da secreção dessa citocina, geralmente não associada ao perfil Th2, em resposta as proteínas recombinantes do *M. leprae* em pacientes MB. Porém, Liao *et al.* 2008 mostraram que a citocina IL-15 induziu um aumento da expressão de IL-4Rα, uma molécula chave na diferenciação Th2. Esse achado é consistente com fato de termos observado a secreção de IL-15 em pacientes MB.

Nosso estudo mostrou uma intensa produção de citocinas Th1 em resposta às proteínas recombinantes do *M. leprae* em EST de pacientes PB. Similarmente aos nossos resultados, prévios estudos *in situ* de RNAm de citocinas na lesão de pacientes PB mostraram intensa produção de IL-2, IL-12 e IFNγ (Yamamura *et al.* 1991, Misra et al. 1995, Stefani *et al.* 2003). Porém nossos resultados mostraram que a citocina com secreção mais significativa após a estimulação com proteínas recombinantes do *M. leprae* foi o IFNγ, comprovando que esta citocina é atualmente o melhor marcador da resposta imune celular em pacientes PB a proteínas recombinantes do *M. leprae*.

Este trabalho mostrou onze proteínas recombinantes imunogênicas e indutoras de resposta imune celular específica com potencial aplicação no diagnóstico laboratorial da hanseníase PB: ML0405, ML2055, ML2331, ML0840, ML1556, ML1632, ML1623, ML1685, ML0276, ML2044 e 46f. O EST, realizado com uma combinação de alguns destes onze antígenos, pode oferecer um método robusto e relativamente simples que sirva como base para o desenvolvimento de um teste de diagnóstico eficiente para a hanseníase paucibacilar.

8. CONCLUSÕES

1. Foram identificados 11 antígenos recombinantes (ML0405, ML2055 ML2331; ML0840, ML1556, ML1632, ML1623, ML1685, ML0276, ML2044 e 46f) que se mostraram imunogênicas e indutoras de resposta imune celular específica, com potencial aplicação no diagnóstico laboratorial para hanseníase. A pesquisa de IFNγ em resposta a proteínas do *M. leprae* em sangue total comprovou ser um ensaio eficiente, robusto e facilmente reprodutível.

2. As análises *in silico* para previsão da especificidade e imunogenicidade de proteínas recombinantes do *M. leprae* atualmente disponíveis não foram validadas pelo EST com proteínas recombinantes.

3. O IFNγ é atualmente o melhor marcador imunológico da resposta imune celular a proteínas recombinantes em pacientes com hanseníase PB.

4. As citocinas IL-4 e IL-5 podem ser usadas como marcador imunológ□ico da resposta de células T a proteínas recombinantes do *M. leprae* em pacientes LL/BL.

5. A maioria dos indivíduos expostos e sob risco de infecção pelo *M. leprae* respondem de maneira idêntica e produzem as mesmas citocinas que os pacientes com hanseníase TT/BT, em resposta as proteínas recombinantes do *M. leprae.* Por enquanto ainda não é possível definir dentro do grupo HHC aqueles que têm resposta imune celular protetora daqueles que poderão manifestar clinicamente a hanseníase.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Hafez, H. Z., Mohamed, E. E., and bd-Elghany, A. A. 2010. Tissue and blood superoxide dismutase activity and malondialdehyde level in leprosy. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 24(6), 704-708.

Abel, L., Cua, V. V., Oberti, J., Lap, V. D., Due, L. K., Grosset, J., and Lagrange, P. H. 1990. Leprosy and BCG in southern Vietnam. *Lancet* 335(8704), 1536.

Adetifa, I. M., Ota, M. O., Jeffries, D. J., Hammond, A., Lugos, M. D., Donkor, S., Patrick, O., Adegbola, R. A., and Hill, P. C. 2010. Commercial interferon gamma release assays compared to the tuberculin skin test for diagnosis of latent Mycobacterium tuberculosis infection in childhood contacts in the Gambia. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 29(5), 439-443.

Aliprantis, A. O., Yang, R. B., Mark, M. R., Suggett, S., Devaux, B., Radolf, J. D., Klimpel, G. R., Godowski, P., and Zychlinsky, A. 1999. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science* 285(5428), 736-739.

Araoz, R., Honore, N., Banu, S., Demangel, C., Cissoko, Y., Arama, C., Uddin, M. K., Hadi, S. K., Monot, M., Cho, S. N., Ji, B., Brennan, P. J., Sow, S., and Cole, S. T. 2006a. Towards an immunodiagnostic test for leprosy. *Microbes. Infect.* 8(8), 2270-2276.

Araoz, R., Honore, N., Cho, S., Kim, J. P., Cho, S. N., Monot, M., Demangel, C., Brennan, P. J., and Cole, S. T. 2006b. Antigen discovery: a postgenomic approach to leprosy diagnosis. *Infect. Immun.* 74(1), 175-182.

Aseffa, A., Brennan, P., Dockrell, H., Gillis, T., Hussain, R., Oskam, L., and Richardus, J. H. 2005. Report on the first meeting of the IDEAL (Initiative for Diagnostic and Epidemiological Assays for Leprosy) consortium held at Armauer Hansen Research Institute, ALERT, Addis Ababa, Ethiopia on 24-27 October 2004. *Lepr. Rev.* 76(2), 147-159.

Bafica, A., Scanga, C. A., Feng, C. G., Leifer, C., Cheever, A., and Sher, A. 2005. TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to Mycobacterium tuberculosis. *J. Exp. Med.* 202(12), 1715-1724.

Bagshawe, A., Scott, G. C., Russell, D. A., Wigley, S. C., Merianos, A., and Berry, G. 1989. BCG vaccination in leprosy: final results of the trial in Karimui, Papua New Guinea, 1963-79. *Bull. World Health Organ* 67(4), 389-399.

Bakker, M. I., Hatta, M., Kwenang, A., Faber, W. R., van Beers, S. M., Klatser, P. R., and Oskam, L. 2004. Population survey to determine risk factors for Mycobacterium leprae transmission and infection. *Int. J. Epidemiol.* 33(6), 1329-1336.

Bakker, M. I., Hatta, M., Kwenang, A., Van, M. P., Faber, W. R., Klatser, P. R., and Oskam, L. 2006. Risk factors for developing leprosy--a population-based cohort study in Indonesia. *Lepr. Rev.* 77(1), 48-61.

Basith, S., Manavalan, B., Lee, G., Kim, S. G., and Choi, S. 2011. Toll-like receptor modulators: a review 2. *Expert. Opin. Ther. Pat* 21(6), 927-944.

Bleharski, J. R., Li, H., Meinken, C., Graeber, T. G., Ochoa, M. T., Yamamura, M., Burdick, A., Sarno, E. N., Wagner, M., Rollinghoff, M., Rea, T. H., Colonna, M., Stenger, S., Bloom, B. R., Eisenberg, D., and Modlin, R. L. 2003. Use of genetic profiling in leprosy to discriminate clinical forms of the disease. *Science* 301(5639), 1527-1530.

Bloom, B. R. 1998. Tools for leprosy diagnosis. *TDR. News*(55), 4.

Bochud, P. Y., Hawn, T. R., Siddiqui, M. R., Saunderson, P., Britton, S., Abraham, I., Argaw, A. T., Janer, M., Zhao, L. P., Kaplan, G., and Aderem, A. 2008. Toll-like receptor 2 (TLR2) polymorphisms are associated with reversal reaction in leprosy. *J. Infect. Dis.* 197(2), 253-261.

Bravo, L. T., and Procop, G. W. 2009. Recent advances in diagnostic microbiology. *Semin. Hematol.* 46(3), 248-258.

Brennan, P. J. 2009. IDEAL: in the footsteps of IMMLEP and THELEP. *Lepr. Rev.* 80(3), 236-245.

Brennan, P. J., Cho, S. N., and Klatser, P. R. 1996. Bangkok Workshop on Leprosy Research. Immunodiagnostics, including skin tests. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 64(4 Suppl), S58-S62.

Brightbill, H. D., Libraty, D. H., Krutzik, S. R., Yang, R. B., Belisle, J. T., Bleharski, J. R., Maitland, M., Norgard, M. V., Plevy, S. E., Smale, S. T., Brennan, P. J., Bloom, B. R., Godowski, P. J., and Modlin, R. L. 1999. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science* 285(5428), 732-736.

Britton, W. J., Garsia, R. J., and Basten, A. 1987a. The serological response to the phenolic glycolipid of Mycobacterium leprae in Australian and Nepali leprosy patients. *Aust. N. Z. J. Med.* 17(6), 568-573.

Britton, W. J., Hellqvist, L., Garsia, R. J., and Basten, A. 1987b. Dominant cell wall proteins of Mycobacterium leprae recognized by monoclonal antibodies. *Clin. Exp. Immunol.* 67(1), 31-42.

Brookes, A. J. 1999. The essence of SNPs. *Gene* 234(2), 177-186.

Buhrer-Sekula S, Illarramendi X, Teles RB, Penna ML, Nery JA, Sales AM *et al*. 2009. The additional benefit of the ML Flow test to classify leprosy patients. *Acta Trop*. 111: 172-176.

Buhrer-Sekula, S., Smits, H. L., Gussenhoven, G. C., van Leeuwen, J., Amador, S., Fujiwara, T., Klatser, P. R., and Oskam, L. 2003. Simple and fast lateral flow test for classification of leprosy patients and identification of contacts with high risk of developing leprosy. *J. Clin. Microbiol.* 41(5), 1991-1995.

Buhrer-Sekula, S., Cunha, M. G., Foss, N. T., Oskam, L., Faber, W. R., and Klatser, P. R. 2001. Dipstick assay to identify leprosy patients who have an increased risk of relapse. *Trop. Med. Int. Health* 6(4), 317-323.

Buhrer-Sekula, S., Illarramendi, X., Teles, R. B., Penna, M. L., Nery, J. A., Sales, A. M., Oskam, L., Sampaio, E. P., and Sarno, E. N. 2009. The additional benefit of the ML Flow test to classify leprosy patients. *Acta Trop.* 111(2), 172-176.

Buhrer-Sekula, S., Sarno, E. N., Oskam, L., Koop, S., Wichers, I., Nery, J. A., Vieira, L. M., de Matos, H. J., Faber, W. R., and Klatser, P. R. 2000. Use of ML dipstick as a tool to classify leprosy patients. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 68(4), 456-463.

Buhrer-Sekula, S., van, B. S., Oskam, L., Lecco, R., Madeira, E. S., Dutra, M. A., Luis, M. C., Faber, W. R., and Klatser, P. R. 2008. The relation between seroprevalence of antibodies against phenolic glycolipid-I among school children and leprosy endemicity in Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 41 Suppl 2, 81-88.

Buhrer-Sekula, S., Visschedijk, J., Grossi, M. A., Dhakal, K. P., Namadi, A. U., Klatser, P. R., and Oskam, L. (2007). The ML flow test as a point of care test for leprosy control programmes: potential effects on classification of leprosy patients. *Lepr. Rev.* 78(1), 70-79.

Cardoso, C. C., Pereira, A. C., de Sales, M. C., and Moraes, M. O. 2011. Leprosy susceptibility: genetic variations regulate innate and adaptive immunity, and disease outcome. *Future. Microbiol.* 6, 533-549.

Cellona, R. V., Walsh, G. P., Fajardo, T. T., Jr., Abalos, R. M., la Cruz, E. C., Guido-Villahermosa, L., Felicio-Balagon, M. V., Steenbergen, G. J., and Douglas, J. T. 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. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 61(2), 192-198.

Chambers, I. R., Cone, T. R., Oswald-Richter, K., and Drake, W. P. (2010). Enzyme-linked Immunospot Assay (ELISPOT): Quantification of Th-1 Cellular Immune Responses Against Microbial Antigens. *J. Vis. Exp.*(45).

Chan, J., Fujiwara, T., Brennan, P., McNeil, M., Turco, S. J., Sibille, J. C., Snapper, M., Aisen, P., and Bloom, B. R. 1989. Microbial glycolipids: possible virulence factors that scavenge oxygen radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 86(7), 2453-2457.

Chen, X. S., Li, W. Z., Jiang, C., and Ye, G. Y. 2000. Leprosy in China: delay in the detection of cases. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 94(2), 181-188.

Chiplunkar, S. V., Deshmukh, M. V., Samson, P. D., Butlin, R., Bhatki, W. S., Chulawalla, R. G., Deo, M. G., and Gangal, S. G. 1990. Natural killer-cell-mediated and antibody-dependent cellular cytotoxicity in leprosy. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 58(2), 334-341.

Cho, S. N., Hunter, S. W., Gelber, R. H., Rea, T. H., and Brennan, P. J. 1986. Quantitation of the phenolic glycolipid of Mycobacterium leprae and relevance to glycolipid antigenemia in leprosy. *J. Infect. Dis.* 153(3), 560-569.

Cho, S. N., Yanagihara, D. L., Hunter, S. W., Gelber, R. H., and Brennan, P. J. 1983. Serological specificity of phenolic glycolipid I from Mycobacterium leprae and use in serodiagnosis of leprosy. *Infect. Immun.* 41(3), 1077-1083.

Cole, S. T., Eiglmeier, K., Parkhill, J., James, K. D., Thomson, N. R., Wheeler, P. R., Honore, N., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Mungall, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R. M., Devlin, K., Duthoy, S., Feltwell, T., Fraser, A., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Lacroix, C., Maclean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Quail, M. A., Rajandream, M. A., Rutherford, K. M., Rutter, S., Seeger, K., Simon, S., Simmonds, M., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Stevens, K., Taylor, K., Whitehead, S., Woodward, J. R., and Barrell, B. G. 2001. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature* 409(6823), 1007-1011.

Connell, T. G., Rangaka, M. X., Curtis, N., and Wilkinson, R. J. 2006. QuantiFERON-TB Gold: state of the art for the diagnosis of tuberculosis infection? *Expert. Rev. Mol. Diagn.* 6(5), 663-677.

Convit, J., Pinardi, M. E., Avila, J. L., and Aranzazu, N. 1975. Specificity of the 48-hour reaction to Mitsuda antigen. Use of a soluble antigen from human and armadillo lepromin. *Bull. World Health Organ* 52(2), 187-191.

Convit, J., Smith, P. G., Zuniga, M., Sampson, C., Ulrich, M., Plata, J. A., Silva, J., Molina, J., and Salgado, A. 1993. BCG vaccination protects against leprosy in Venezuela: a case-control study. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 61(2), 185-191.

Cruz, D., Watson, A. D., Miller, C. S., Montoya, D., Ochoa, M. T., Sieling, P. A., Gutierrez, M. A., Navab, M., Reddy, S. T., Witztum, J. L., Fogelman, A. M., Rea, T. H., Eisenberg, D., Berliner, J., and Modlin, R. L. 2008. Host-derived oxidized phospholipids and HDL regulate innate immunity in human leprosy. *J. Clin. Invest* 118(8), 2917-2928.

Dagur, P. K., Sharma, B., Kumar, G., Khan, N. A., Katoch, V. M., Sengupta, U., and Joshi, B. 2010. Mycobacterial antigen(s) induce anergy by altering TCR- and TCR/CD28-induced signalling events: insights into T-cell unresponsiveness in leprosy. *Mol. Immunol.* 47(5), 943-952.

de Souza, S. J., Lara, F. A., Amadeu, T. P., de Oliveira, F. T., da Costa Nery, J. A., Sampaio, E. P., Pinheiro, R. O., and Sarno, E. N. 2011. The role of indoleamine 2, 3-dioxygenase in lepromatous leprosy immunosuppression. *Clin. Exp. Immunol.*

De Vries, R. R. 1992. HLA and disease: from epidemiology to immunotherapy. *Eur. J. Clin. Invest* 22(1), 1-8.

Deps, P. D., Guedes, B. V., Bucker, F. J., Andreatta, M. K., Marcari, R. S., and Rodrigues, L. C. 2006. Characteristics of known leprosy contact in a high endemic area in Brazil. *Lepr. Rev.* 77(1), 34-40.

Dhungel, S., Ranjit, C., Sapkota, B. R., and Macdonald, M. 2008. Role of PGL-I of M. leprae in TNF-alpha production by in vitro whole blood assay. *Nepal. Med. Coll. J.* 10(1), 1-3.

Dockrell, H. M., Black, G. F., Weir, R. E., and Fine, P. E. 2000. Whole blood assays for interferon-gamma: practicalities and potential for use as diagnostic tests in the field. *Lepr. Rev.* 71 Suppl, S60-S62.

Dockrell, H. M., Brahmbhatt, S., Robertson, B. D., Britton, S., Fruth, U., Gebre, N., Hunegnaw, M., Hussain, R., Manadhar, R., Murrillo, L., Pessolani, M. C., Roche, P., Salgado, J. L., Sampaio, E., Shahid, F., Thole, J. E., and Young, D. B. 2000. Diagnostic assays for leprosy based on T-cell epitopes. *Lepr. Rev.* 71 Suppl, S55-S58.

Dockrell, H. M., Stoker, N. G., Lee, S. P., Jackson, M., Grant, K. A., Jouy, N. F., Lucas, S. B., Hasan, R., Hussain, R., and McAdam, K. P. 1989. T-cell recognition of the 18-kilodalton antigen of Mycobacterium leprae. *Infect. Immun.* 57(7), 1979-1983.

Dockrell, H. M., Young, S. K., Britton, K., Brennan, P. J., Rivoire, B., Waters, M. F., Lucas, S. B., Shahid, F., Dojki, M., Chiang, T. J., Ehsan, Q., McAdam, K. P., and Hussain, R. 1996. Induction of Th1 cytokine responses by mycobacterial antigens in leprosy. *Infect. Immun.* 64(10), 4385-4389.

Dockrell, H. M., Young, S. K., Britton, K., Brennan, P. J., Rivoire, B., Waters, M. F., Lucas, S. B., Shahid, F., Dojki, M., Chiang, T. J., Ehsan, Q., McAdam, K. P., and Hussain, R. 1996. Induction of Th1 cytokine responses by mycobacterial antigens in leprosy. *Infect. Immun.* 64(10), 4385-4389.

Douglas, J. T., Celona, R. V., Abalos, R. M., Madarang, M. G., and Fajardo, T. 1987. Serological reactivity and early detection of leprosy among contacts of lepromatous patients in Cebu, the Philippines. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 55(4), 718-721.

Duppre, N. C., Camacho, L. A., da Cunha, S. S., Struchiner, C. J., Sales, A. M., Nery, J. A., and Sarno, E. N. 2008. Effectiveness of BCG vaccination among leprosy contacts: a cohort study. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 102(7), 631-638.

Duthie, M. S., Goto, W., Ireton, G. C., Reece, S. T., Cardoso, L. P., Martelli, C. M., Stefani, M. M., Nakatani, M., de Jesus, R. C., Netto, E. M., Balagon, M. V., Tan, E., Gelber, R. H., Maeda, Y., Makino, M., Hoft, D., and Reed, S. G. 2007. Use of protein antigens for early serological diagnosis of leprosy. *Clin. Vaccine Immunol.* 14(11), 1400-1408.

Duthie, M. S., Goto, W., Ireton, G. C., Reece, S. T., Sampaio, L. H., Grassi, A. B., Sousa, A. L., Martelli, C. M., Stefani, M. M., and Reed, S. G. 2008. Antigen-specific T-cell responses of leprosy patients. *Clin. Vaccine Immunol.* 15(11), 1659-1665.

Eisenstadt, J., and Hall, G. S. 1995. Microbiology and classification of mycobacteria. *Clin. Dermatol.* 13(3), 197-206.

Euzeby, J. 2005. Notification that new names and new combinations have appeared in volume 55, part 1, of the IJSEM. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55(Pt 3), 987-991.

Fine, P. E. 1988. BCG vaccination against tuberculosis and leprosy. *Br. Med. Bull.* 44(3), 691-703.

Fine, P. E. 1996. Regarding antileprosy vaccine--an apprehension by Dr. Prakash. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 64(4), 448-449.

Fine, P. E. 2006. Global leprosy statistics: a cause for pride, or frustration? *Lepr. Rev.* 77(4), 295-297.

Fine, P. E., Sterne, J. A., Ponnighaus, J. M., Bliss, L., Saui, J., Chihana, A., Munthali, M., and Warndorff, D. K. 1997. Household and dwelling contact as risk factors for leprosy in northern Malawi. *Am. J. Epidemiol.* 146(1), 91-102.

Garnier, T., Eiglmeier, K., Camus, J. C., Medina, N., Mansoor, H., Pryor, M., Duthoy, S., Grondin, S., Lacroix, C., Monsempe, C., Simon, S., Harris, B., Atkin, R., Doggett, J., Mayes, R., Keating, L., Wheeler, P. R., Parkhill, J., Barrell, B. G., Cole, S. T., Gordon, S. V., and Hewinson, R. G. 2003. The complete genome sequence of Mycobacterium bovis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100(13), 7877-7882.

Gelber, R. H., Hunter, S. W., Murray, L. P., Siu, P., Tsang, M., and Brennan, P. J. 1994. Effective vaccination of mice against Mycobacterium leprae with density-gradient subfractions of soluble M. leprae proteins: clues to effective protein epitopes. *Lepr. Rev.* 65(3), 175-180.

Geluk, A., and Ottenhoff, T. H. 2006. HLA and leprosy in the pre and postgenomic eras. *Hum. Immunol.* 67(6), 439-445.

Geluk, A., Klein, M. R., Franken, K. L., van Meijgaarden, K. E., Wieles, B., Pereira, K. C., Buhrer-Sekula, S., Klatser, P. R., Brennan, P. J., Spencer, J. S., Williams, D. L., Pessolani, M. C., Sampaio, E. P., and Ottenhoff, T. H. 2005. Postgenomic approach to identify novel Mycobacterium leprae antigens with potential to improve immunodiagnosis of infection. *Infect. Immun.* 73(9), 5636-5644.

Geluk, A., Spencer, J. S., Bobosha, K., Pessolani, M. C., Pereira, G. M., Banu, S., Honore, N., Reece, S. T., MacDonald, M., Sapkota, B. R., Ranjit, C., Franken, K. L., Zewdie, M., Aseffa, A., Hussain, R., Stefani, M. M., Cho, S. N., Oskam, L., Brennan, P. J., and Dockrell, H. M. 2009. From genome-based in silico predictions to ex vivo verification of leprosy diagnosis. *Clin. Vaccine Immunol.* 16(3), 352-359.

Geluk, A., van der Ploeg-van Schip JJ, van Meijgaarden, K. E., Commandeur, S., Drijfhout, J. W., Benckhuijsen, W. E., Franken, K. L., Naafs, B., and Ottenhoff, T. H. 2010. Enhancing sensitivity of detection of immune responses to Mycobacterium leprae peptides in whole-blood assays. *Clin. Vaccine Immunol.* 17(6), 993-1004.

Geluk, A., van der, P. J., Teles, R. O., Franken, K. L., Prins, C., Drijfhout, J. W., Sarno, E. N., Sampaio, E. P., and Ottenhoff, T. H. 2008. Rational combination of peptides derived from different Mycobacterium leprae proteins improves sensitivity for immunodiagnosis of M. leprae infection. *Clin. Vaccine Immunol.* 15(3), 522-533.

Gillis, T. P. and Williams, D. L. 1991. Polymerase chain reaction and leprosy. Int.J.Lepr.Other Mycobact.Dis.. 75(2), 118-130.
Gillis, T. P., and Williams, D. L. 1991. Polymerase chain reaction and leprosy. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 59(2), 311-316.

Godal, T., and Negassi, K. 1973. Subclinical infection in leprosy. *Br. Med. J.* **3**(5880), 557-559.

Gor, D. O., Rose, N. R., and Greenspan, N. S. 2003. TH1-TH2: a procrustean paradigm. *Nat. Immunol.* 4(6), 503-505.

Goulart, L. R., Ferreira, F. R., and Goulart, I. M. 2006. Interaction of TaqI polymorphism at exon 9 of the vitamin D receptor gene with the negative lepromin response may favor the occurrence of leprosy. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 48(1), 91-98.

Grossi, M. A., Leboeuf, M. A., Andrade, A. R., Lyon, S., Antunes, C. M., and Buhrer-Sekula, S. 2008. The influence of ML Flow test in leprosy classification. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 41 Suppl 2, 34-38.

Gupte, M. D. 1998. Field trials of antileprosy vaccines. *Indian J. Lepr.* 70(4), 363-367.

Gupte, M. D., Vallishayee, R. S., Anantharaman, D. S., Nagaraju, B., Sreevatsa, Balasubramanyam, S., de Britto, R. L., Elango, N., Uthayakumaran, N., Mahalingam, V. N., Lourdusamy, G., Ramalingam, A., Kannan, S., and Arokiasamy, J. 1998. Comparative leprosy vaccine trial in south India. *Indian J. Lepr.* 70(4), 369-388.

Hamerlinck, F. F., Klatser, P. R., Walsh, D. S., Bos, J. D., Walsh, G. P., and Faber, W. R. 1999. Serum neopterin as a marker for reactional states in leprosy. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 24(4), 405-409.

Hsu, Y. M., Zhang, Y., You, Y., Wang, D., Li, H., Duramad, O., Qin, X. F., Dong, C., and Lin, X. 2007. The adaptor protein CARD9 is required for innate immune responses to intracellular pathogens. *Nat. Immunol.* 8(2), 198-205.

Imtech: ABCpred. 2010. [http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/ABC_submission.html].

Imtech: PROPRED.2010. [http://www.imtech.res.in/raghava/propred/].

Institut Pasteur. Leproma. 2010. [http://genolist.pasteur.fr/Leproma/].

Iyer, A., Hatta, M., Usman, R., Luiten, S., Oskam, L., Faber, W., Geluk, A., and Das, P. 2007. Serum levels of interferon-gamma, tumour necrosis factor-alpha, soluble interleukin-6R and soluble cell activation markers for monitoring response to treatment of leprosy reactions. *Clin. Exp. Immunol.* 150(2), 210-216.

Johnson, C. M., Lyle, E. A., Omueti, K. O., Stepensky, V. A., Yegin, O., Alpsoy, E., Hamann, L., Schumann, R. R., and Tapping, R. I. 2007. Cutting edge: A common polymorphism impairs cell surface trafficking and functional responses of TLR1 but protects against leprosy. *J. Immunol.* 178(12), 7520-7524.

Kamble, R. R., Shinde, V. S., Madhale, S. P., and Jadhav, R. S. 2010. Study of cytokine response against panel of purified Mycobacterium leprae antigens by using whole blood assay in subjects residing in a resettlement village of cured leprosy patients. *Indian J. Lepr* 82(1), 23-31.

Kawai, T., and Akira, S. (2011). Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. *Immunity.* 34(5), 637-650.

Klatser, P. R., Janson, A. M., Thole, J. E., Buhrer, S., Bos, C., Soebono, H., and De Vries, R. R. 1997. Humoral and cellular immune reactivity to recombinant M. leprae antigens in HLA-typed leprosy patients and healthy controls. *Int. J. Lepr Other Mycobact. Dis.* 65(2), 178-189.

Krutzik, S. R., Ochoa, M. T., Sieling, P. A., Uematsu, S., Ng, Y. W., Legaspi, A., Liu, P. T., Cole, S. T., Godowski, P. J., Maeda, Y., Sarno, E. N., Norgard, M. V., Brennan, P. J., Akira, S., Rea, T. H., and Modlin, R. L. 2003. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. *Nat. Med.* 9(5), 525-532.

Krutzik, S. R., Hewison, M., Liu, P. T., Robles, J. A., Stenger, S., Adams, J. S., and Modlin, R. L. 2008. IL-15 links TLR2/1-induced macrophage differentiation to the vitamin D-dependent antimicrobial pathway. *J. Immunol.* 181(10), 7115-7120.

Krutzik, S. R., Tan, B., Li, H., Ochoa, M. T., Liu, P. T., Sharfstein, S. E., Graeber, T. G., Sieling, P. A., Liu, Y. J., Rea, T. H., Bloom, B. R., and Modlin, R. L. 2005. TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. *Nat. Med.* 11(6), 653-660.

Launois, P., Blum, L., Dieye, A., Millan, J., Sarthou, J. L., and Bach, M. A. (1989). Phenolic glycolipid-1 from M. leprae inhibits oxygen free radical production by human mononuclear cells. *Res. Immunol.* 140(9), 847-855.

Lee, D. J., Sieling, P. A., Ochoa, M. T., Krutzik, S. R., Guo, B., Hernandez, M., Rea, T. H., Cheng, G., Colonna, M., and Modlin, R. L. (2007). LILRA2 activation inhibits dendritic cell differentiation and antigen presentation to T cells. *J. Immunol.* 179(12), 8128-8136.

Lee, S. M., Suen, Y., Qian, J., Knoppel, E., and Cairo, M. S. (1998). The regulation and biological activity of interleukin 12. *Leuk. Lymphoma* 29(5-6), 427-438.

Legesse, M., Ameni, G., Mamo, G., Medhin, G., Bjune, G., and Abebe, F. 2010. Performance of QuantiFERON-TB Gold In-Tube (QFTGIT) for the diagnosis of Mycobacterium tuberculosis (Mtb) infection in Afar Pastoralists, Ethiopia. *BMC. Infect. Dis.* 10, 354.

Liao, W., Schones, D. E., Oh, J., Cui, Y., Cui, K., Roh, T. Y., Zhao, K., and Leonard, W. J. 2008. Priming for T helper type 2 differentiation by interleukin 2-mediated induction of interleukin 4 receptor alpha-chain expression. *Nat. Immunol.* 9(11), 1288-1296.

Libraty, D. H., Airan, L. E., Uyemura, K., Jullien, D., Spellberg, B., Rea, T. H., and Modlin, R. L. 1997. Interferon-gamma differentially regulates interleukin-12 and interleukin-10 production in leprosy. *J. Clin. Invest* 99(2), 336-341.

Lockwood, D. N., and Suneetha, S. 2005. Leprosy: too complex a disease for a simple elimination paradigm. *Bull. World Health Organ* 83(3), 230-235.

Lombardi, C., Pedrazzani, E. S., Pedrazzani, J. C., Ferreira, F. P., and Zicker, F. 1995. The protective efficacy of BCG against leprosy in Sao Paulo, Brazil. *Bol. Oficina Sanit. Panam.* 119(5), 415-421.

Lopez Roa, R. I., Guerrero, V. C., Alvarado, N. A., Montoya, B. M., Garcia, N. C., and Fafutis, M. M. 2008. Recovery of IFN-gamma levels in PBMCs from lepromatous leprosy patients through the synergistic actions of the cytokines IL-12 and IL-18. *Int. Immunopharmacol.* 8(13-14), 1715-1720.

Lwin, K., Sundaresan, T., Gyi, M. M., Bechelli, L. M., Tamondong, C., Garbajosa, P. G., Sansarricq, H., and Noordeen, S. K. 1985. BCG vaccination of children against leprosy: fourteen-year findings of the trial in Burma. *Bull. World Health Organ* 63(6), 1069-1078.

Maeda, Y., Gidoh, M., Ishii, N., Mukai, C., and Makino, M. 2003. Assessment of cell mediated immunogenicity of Mycobacterium leprae-derived antigens. *Cell Immunol.* 222(1), 69-77.

Maeda, Y., Mukai, T., Spencer, J., and Makino, M. 2005. Identification of an Immunomodulating Agent from Mycobacterium leprae. *Infect. Immun.* 73(5), 2744-2750.

Martinez, A. N., Britto, C. F., Nery, J. A., Sampaio, E. P., Jardim, M. R., Sarno, E. N., and Moraes, M. O. 2006. Evaluation of real-time and conventional PCR targeting complex 85 genes for detection of Mycobacterium leprae DNA in skin biopsy samples from patients diagnosed with leprosy. *J. Clin. Microbiol.* 44(9), 3154-3159.

Martins, M. V., Lima, M. C., Duppre, N. C., Matos, H. J., Spencer, J. S., Brennan, P. J., Sarno, E. N., Fonseca, L., Pereira, G. M., and Pessolani, M. C. 2007. The level of PPD-specific IFN-gamma-producing CD4+ T cells in the blood predicts the in vivo response to PPD. *Tuberculosis.* 87(3), 202-211.

Massone, C., Nunzi, E., Ribeiro-Rodrigues, R., Talhari, C., Talhari, S., Schettini, A. P., Parente, J. N., Brunasso, A. M., Puntoni, M., Clapasson, A., Noto, S., and Cerroni, L. 2010. T regulatory cells and plasmocytoid dentritic cells in hansen disease: a new insight into pathogenesis? *Am. J. Dermatopathol.* 32(3), 251-256.

Mazurek, G. H., and Villarino, M. E. 2003. Guidelines for using the QuantiFERON-TB test for diagnosing latent Mycobacterium tuberculosis infection. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR Recomm. Rep.* 52(RR-2), 15-18.

Means, T. K., Wang, S., Lien, E., Yoshimura, A., Golenbock, D. T., and Fenton, M. J. 1999. Human toll-like receptors mediate cellular activation by Mycobacterium tuberculosis. *J. Immunol.* 163(7), 3920-3927.

Mira, M. T., Alcais, A., Nguyen, V. T., Moraes, M. O., Di, F. C., Vu, H. T., Mai, C. P., Nguyen, T. H., Nguyen, N. B., Pham, X. K., Sarno, E. N., Alter, A., Montpetit, A., Moraes, M. E., Moraes, J. R., Dore, C., Gallant, C. J., Lepage, P., Verner, A., Van, D., V, Hudson, T. J., Abel, L., and Schurr, E. 2004. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. *Nature* 427(6975), 636-640.

Misra, N., Murtaza, A., Walker, B., Narayan, N. P., Misra, R. S., Ramesh, V., Singh, S., Colston, M. J., and Nath, I. 1995. Cytokine profile of circulating T cells of leprosy patients reflects both indiscriminate and polarized T-helper subsets: T-helper phenotype is stable and uninfluenced by related antigens of Mycobacterium leprae. *Immunology* 86(1), 97-103.

Modlin, R. L. 2002. Learning from leprosy: insights into contemporary immunology from an ancient disease. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol* 15(1), 1-6.

Modlin, R. L., and Rea, T. H. 1988. Immunopathology of leprosy granulomas. *Springer Semin. Immunopathol.* 10(4), 359-374.

Modlin, R. L., Gersuk, G. M., Nelson, E. E., Pattengale, P. K., Gunter, J. R., Chen, L., Cooper, C. L., Bloom, B. R., and Rea, T. H. 1986. T-lymphocyte clones from leprosy skin lesions. *Lepr. Rev.* 57 Suppl 2, 143-147.

Modlin, R. L., Hofman, F. M., Horwitz, D. A., Husmann, L. A., Gillis, S., Taylor, C. R., and Rea, T. H. 1984. In situ identification of cells in human leprosy granulomas with monoclonal antibodies to interleukin 2 and its receptor. *J. Immunol.* 132(6), 3085-3090.

Modlin, R. L., Melancon-Kaplan, J., Young, S. M., Pirmez, C., Kino, H., Convit, J., Rea, T. H., and Bloom, B. R. 1988. Learning from lesions: patterns of tissue inflammation in leprosy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 85(4), 1213-1217.

Moet, F. J., Meima, A., Oskam, L., and Richardus, J. H. 2004. Risk factors for the development of clinical leprosy among contacts, and their relevance for targeted interventions. *Lepr. Rev.* 75(4), 310-326.

Molloy, A., Gaudernack, G., Levis, W. R., Cohn, Z. A., and Kaplan, G. 1990. Suppression of T-cell proliferation by Mycobacterium leprae and its products: the role of lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87(3), 973-977.

Monot, M., Honore, N., Garnier, T., Araoz, R., Coppee, J. Y., Lacroix, C., Sow, S., Spencer, J. S., Truman, R. W., Williams, D. L., Gelber, R., Virmond, M., Flageul, B., Cho, S. N., Ji, B., Paniz-Mondolfi, A., Convit, J., Young, S., Fine, P. E., Rasolofo, V., Brennan, P. J., and Cole, S. T. 2005. On the origin of leprosy. *Science* 308(5724), 1040-1042.

Monot, M., Honore, N., Garnier, T., Zidane, N., Sherafi, D., Paniz-Mondolfi, A., Matsuoka, M., Taylor, G. M., Donoghue, H. D., Bouwman, A., Mays, S., Watson, C., Lockwood, D., Khamesipour, A., Dowlati, Y., Jianping, S., Rea, T. H., Vera-Cabrera, L., Stefani, M. M., Banu, S., Macdonald, M., Sapkota, B. R., Spencer, J. S., Thomas, J., Harshman, K., Singh, P., Busso, P., Gattiker, A., Rougemont, J., Brennan, P. J., and Cole, S. T. (2009). Comparative genomic and phylogeographic analysis of Mycobacterium leprae. *Nat. Genet.* 41(12), 1282-1289.

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

Montoya, D., Cruz, D., Teles, R. M., Lee, D. J., Ochoa, M. T., Krutzik, S. R., Chun, R., Schenk, M., Zhang, X., Ferguson, B. G., Burdick, A. E., Sarno, E. N., Rea, T. H., Hewison, M., Adams, J. S., Cheng, G., and Modlin, R. L. 2009. Divergence of macrophage phagocytic and antimicrobial programs in leprosy. *Cell Host. Microbe* 6(4), 343-353.

Moraes, M. O., Duppre, N. C., Suffys, P. N., Santos, A. R., Almeida, A. S., Nery, J. A., Sampaio, E. P., and Sarno, E. N. 2001. Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism TNF2 is associated with a stronger delayed-type hypersensitivity reaction in the skin of borderline tuberculoid leprosy patients. *Immunogenetics* 53(1), 45-47.

Moraes, M. O., Pacheco, A. G., Schonkeren, J. J., Vanderborght, P. R., Nery, J. A., Santos, A. R., Moraes, M. E., Moraes, J. R., Ottenhoff, T. H., Sampaio, E. P., Huizinga, T. W., and Sarno, E. N. 2004. Interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms as markers for disease susceptibility and disease severity in leprosy. *Genes Immun.* 5(7), 592-595.

Moraes, M. O., Sarno, E. N., Almeida, A. S., Saraiva, B. C., Nery, J. A., Martins, R. C., and Sampaio, E. P. 1999. Cytokine mRNA expression in leprosy: a possible role for interferon-gamma and interleukin-12 in reactions (RR and ENL). *Scand. J. Immunol.* 50(5), 541-549.

Moura, R. S., Calado K, Oliveira , M. L. W. D. R., and Buhrer-Sekula, S. 2008. Sorologia da hanseníase utilizando PGL-I: revisão sistemática. *Rev Soc. Bras Med Trop.* 41(Suplemento II).

Naafs, B. 1992. Reactions in leprosy: immunopatology. The proceedings of Dermatology, 890-892.

Naito, M., Matsuoka, M., Ohara, N., Nomaguchi, H., and Yamada, T. 1999. The antigen 85 complex vaccine against experimental Mycobacterium leprae infection in mice. *Vaccine* 18(9-10), 795-798.

Nath, I., Vemuri, N., Reddi, A. L., Bharadwaj, M., Brooks, P., Colston, M. J., Misra, R. S., and Ramesh, V. 2000. Dysregulation of IL-4 expression in lepromatous leprosy patients with and without erythema nodosum leprosum. *Lepr. Rev.* 71 Suppl, S130-S137.

Ngamying, M., Sawanpanyalert, P., Butraporn, R., Nikasri, J., Cho, S. N., Levy, L., and Brennan, P. J. 2003. Effect of vaccination with refined components of the organism on infection of mice with Mycobacterium leprae. *Infect. Immun.* 71(3), 1596-1598.

Oliveira, A. L., Antunes, S. L., Teles, R. M., Costa da Silva, A. C., Silva, T. P., Brandao, T. R., Ferreira, M. M., Britto, C., Jardim, M. R., Pereira, S. E., and Nunes, S. E. 2010. Schwann cells producing matrix metalloproteinases under Mycobacterium leprae stimulation may play a role in the outcome of leprous neuropathy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 69(1), 27-39.

Oliveira, R. B., Ochoa, M. T., Sieling, P. A., Rea, T. H., Rambukkana, A., Sarno, E. N., and Modlin, R. L. 2003. Expression of Toll-like receptor 2 on human Schwann cells: a mechanism of nerve damage in leprosy. *Infect. Immun.* 71(3), 1427-1433.

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

Pai, M., Riley, L. W., and Colford, J. M., Jr. 2004. Interferon-gamma assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect. Dis.* 4(12), 761-776.

Perry, S., Sanchez, L., Yang, S., Agarwal, Z., Hurst, P., and Parsonnet, J. 2008. Reproducibility of QuantiFERON-TB gold in-tube assay. *Clin. Vaccine Immunol.* 15(3), 425-432.

PATRIC. 2011. National Institute of Allergy and Infectious Diseases. [http://www.patricbrc.org/portal/portal/patric/Taxon?cType=taxon&cId=1763]

Prado-Montes de, O. E., Velarde-Felix, J. S., Rios-Tostado, J. J., Picos-Cardenas, V. J., and Figuera, L. E. 2009. 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. *Infect. Genet. Evol.* 9(4), 617-625.

Prigozy, T. I., Sieling, P. A., Clemens, D., Stewart, P. L., Behar, S. M., Porcelli, S. A., Brenner, M. B., Modlin, R. L., and Kronenberg, M. 1997. The mannose receptor delivers lipoglycan antigens to endosomes for presentation to T cells by CD1b molecules. *Immunity.* 6(2), 187-197.

Rao, P. N., and Lakshmi, T. S. 2005. 'Final push of leprosy' in India: What is being pushed? *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.* 71(4), 226-229.

Reece, S. T., Ireton, G., Mohamath, R., Guderian, J., Goto, W., Gelber, R., Groathouse, N., Spencer, J., Brennan, P., and Reed, S. G. 2006. ML0405 and ML2331 are antigens of Mycobacterium leprae with potential for diagnosis of leprosy. *Clin. Vaccine Immunol.* 13(3), 333-340.

Ridley, D. S. 1955. The bacteriological interpretation of skin smears and biopsies in leprosy. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 49(5), 449-452.
Ridley, D. S., and Jopling, W. H. (1966). Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 34(3), 255-273.

Ridley, D. S., and Jopling, W. H. 1966. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 34(3), 255-273.

Roche, P. W., Failbus, S. S., Britton, W. J., and Cole, R. 1999. Rapid method for diagnosis of leprosy by measurements of antibodies to the M. leprae 35-kDa protein: comparison with PGL-I antibodies detected by ELISA and "dipstick" methods. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 67(3), 279-286.

Roche, P. W., Neupane, K. D., Failbus, S. S., Kamath, A., and Britton, W. J. 2001. Vaccination with DNA of the Mycobacterium tuberculosis 85B antigen protects mouse foot pad against infection with M. leprae. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 69(2), 93-98.

Rochman, Y., Spolski, R., and Leonard, W. J. 2009. New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines. *Nat. Rev. Immunol.* 9(7), 480-490.

Rodrigues, M. L., Silva, S. A., Neto, J. C., de Andrade, A. L., Martelli, C. M., and Zicker, F. 1992. Protective effect of intradermal BCG against leprosy; a case-control study in central Brazil. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 60(3), 335-339.

Roy, S., Frodsham, A., Saha, B., Hazra, S. K., Mascie-Taylor, C. G., and Hill, A. V. 1999. Association of vitamin D receptor genotype with leprosy type. *J. Infect. Dis.* 179(1), 187-191.

Sabet, S., Ochoa, M. T., Sieling, P. A., Rea, T. H., and Modlin, R. L. 2007. Functional characterization of a T-cell receptor BV6+ T-cell clone derived from a leprosy lesion. *Immunology* 120(3), 354-361.

Sampaio, L. H., Stefani, M. M., Oliveira, R. M., Sousa, A. L., Ireton, G. C., Reed, S. G., and Duthie, M. S. 2011. Identification of immunologically relevant *M. leprae* antigens. *BMC. Infect. Dis*.

Samy, A. A. 2007. 'Leprosy elimination'--need for sample survey. *Lepr. Rev.* 78(2), 167-169.

SANGER CDS Retrieve Information. 2010. Sanger Institute. [http://www.sanger.ac.uk/Projects/M_leprae/].

Santos, A. R., De Miranda, A. B., Sarno, E. N., Suffys, P. N., and Degrave, W. M. 1993. Use of PCR-mediated amplification of Mycobacterium leprae DNA in different types of clinical samples for the diagnosis of leprosy. *J. Med. Microbiol.* 39(4), 298-304.

Santos, D. O., Santos, S. L., Esquenazi, D., Nery, J. A., Defruyt, M., Lorre, K., and Van, H. H. 2001. Evaluation of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) costimulatory molecules and dendritic cells on the immune response in leprosy. *Nihon Hansenbyo. Gakkai Zasshi* 70(1), 15-24.

Sapkota, B. R., Macdonald, M., Berrington, W. R., Misch, E. A., Ranjit, C., Siddiqui, M. R., Kaplan, G., and Hawn, T. R. 2010. Association of TNF, MBL, and VDR polymorphisms with leprosy phenotypes. *Hum. Immunol.* 71(10), 992-998.

Sarno, E. N., Grau, G. E., Vieira, L. M., and Nery, J. A. 1991. Serum levels of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta during leprosy reactional states. *Clin. Exp. Immunol.* 84(1), 103-108.

Schlesinger, L. S., and Horwitz, M. A. 1990. Phagocytosis of leprosy bacilli is mediated by complement receptors CR1 and CR3 on human monocytes and complement component C3 in serum. *J. Clin. Invest* 85(4), 1304-1314.

Schlesinger, L. S., and Horwitz, M. A. 1991. Phenolic glycolipid-1 of Mycobacterium leprae binds complement component C3 in serum and mediates phagocytosis by human monocytes. *J. Exp. Med.* 174(5), 1031-1038.

Schuring, R. P., Hamann, L., Faber, W. R., Pahan, D., Richardus, J. H., Schumann, R. R., and Oskam, L. 2009. Polymorphism N248S in the human Toll-like receptor 1 gene is related to leprosy and leprosy reactions. *J. Infect. Dis.* 199(12), 1816-1819.

Scollard, D. M. 2008. The biology of nerve injury in leprosy. *Lepr. Rev.* 79(3), 242-253.

Scollard, D. M., Chaduvula, M. V., Martinez, A., Fowlkes, N., Nath, I., Stryjewska, B. M., Kearney, M. T., and Williams, D. L. 2011. Increased CXCL10 Levels and Gene Expression in Type 1 Leprosy Reactions. *Clin. Vaccine Immunol.*

Scollard, D. M., Smith, T., Bhoopat, L., Theetranont, C., Rangdaeng, S., and Morens, D. M. 1994. Epidemiologic characteristics of leprosy reactions. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 62(4), 559-567.

Secretaria Estadual de Saúde 2011. Situação atual da hanseníase no estado de Goiás. Boletim 109/09.

Setia, M. S., Steinmaus, C., Ho, C. S., and Rutherford, G. W. 2006. The role of BCG in prevention of leprosy: a meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* 6(3), 162-170.

Sharma, N., Sharma, V. K., Gupta, A., Kaur, I., Kaur, S., and Ganguly, N. K. 1998. Alterations in early biochemical events following T cell activation in leprosy patients. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 88(2), 142-149.

Sieling, P. A., Abrams, J. S., Yamamura, M., Salgame, P., Bloom, B. R., Rea, T. H., and Modlin, R. L. 1993. Immunosuppressive roles for IL-10 and IL-4 in human infection. In vitro modulation of T cell responses in leprosy. *J. Immunol.* 150(12), 5501-5510.

Sieling, P. A., and Modlin, R. L. 1994. Cytokine patterns at the site of mycobacterial infection. *Immunobiology* 191(4-5), 378-387.

Sieling, P. A., Hill, P. J., Dobos, K. M., Brookman, K., Kuhlman, A. M., Fabri, M., Krutzik, S. R., Rea, T. H., Heaslip, D. G., Belisle, J. T., and Modlin, R. L. 2008. Conserved mycobacterial lipoglycoproteins activate TLR2 but also require glycosylation for MHC class II-restricted T cell activation. *J. Immunol.* 180(9), 5833-5842.

Sieling, P. A., Jullien, D., Dahlem, M., Tedder, T. F., Rea, T. H., Modlin, R. L., and Porcelli, S. A. 1999. CD1 expression by dendritic cells in human leprosy lesions: correlation with effective host immunity. *J. Immunol.* 162(3), 1851-1858.

Sieling, P. A., Torrelles, J. B., Stenger, S., Chung, W., Burdick, A. E., Rea, T. H., Brennan, P. J., Belisle, J. T., Porcelli, S. A., and Modlin, R. L. 2005. The human CD1-restricted T cell repertoire is limited to cross-reactive antigens: implications for host responses against immunologically related pathogens. *J. Immunol.* 174(5), 2637-2644.

Sousa, A. L., Stefani, M. M., Pereira, G. A., Costa, M. B., Rebello, P. F., Gomes, M. K., Narahashi, K., Gillis, T. P., Krahenbuhl, J. L., and Martelli, C. M. 2007. Mycobacterium leprae DNA associated with type 1 reactions in single lesion paucibacillary leprosy treated with single dose rifampin, ofloxacin, and minocycline. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77(5), 829-833.

Spencer, J. S., Dockrell, H. M., Kim, H. J., Marques, M. A., Williams, D. L., Martins, M. V., Martins, M. L., Lima, M. C., Sarno, E. N., Pereira, G. M., Matos, H., Fonseca, L. S., Sampaio, E. P., Ottenhoff, T. H., Geluk, A., Cho, S. N., Stoker, N. G., Cole, S. T., Brennan, P. J., and Pessolani, M. C. 2005. Identification of specific proteins and peptides in mycobacterium leprae suitable for the selective diagnosis of leprosy. *J. Immunol.* 175(12), 7930-7938.

Sreenivasan, P., Misra, R. S., Wilfred, D., and Nath, I. 1998. Lepromatous leprosy patients show T helper 1-like cytokine profile with differential expression of interleukin-10 during type 1 and 2 reactions. *Immunology* 95(4), 529-536.

Stanley, S. J., Howland, C., Stone, M. M., and Sutherland, I. 1981. BCG vaccination of children against leprosy in Uganda: final results. *J. Hyg. (Lond)* 87(2), 233-248.

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

Stefani, M. M., Guerra, J. G., Sousa, A. L., Costa, M. B., Oliveira, M. L., Martelli, C. T., and Scollard, D. M. 2009. Potential plasma markers of Type 1 and Type 2 leprosy reactions: a preliminary report. *BMC. Infect. Dis.* 9, 75.

Stefani, M. M., Martelli, C. M., Gillis, T. P., and Krahenbuhl, J. L. 2003. In situ type 1 cytokine gene expression and mechanisms associated with early leprosy progression. *J. Infect. Dis.* 188(7), 1024-1031.

Stefani, M. M., Martelli, C. M., Morais-Neto, O. L., Martelli, P., Costa, M. B., and de Andrade, A. L. 1998. Assessment of anti-PGL-I as a prognostic marker of leprosy reaction. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 66(3), 356-364.

Suzuki, K., Takeshita, F., Nakata, N., Ishii, N., and Makino, M. 2006. Localization of CORO1A in the macrophages containing Mycobacterium leprae. *Acta Histochem. Cytochem.* 39(4), 107-112.

Tabouret, G., starie-Dequeker, C., Demangel, C., Malaga, W., Constant, P., Ray, A., Honore, N., Bello, N. F., Perez, E., Daffe, M., and Guilhot, C. 2010. Mycobacterium leprae phenolglycolipid-1 expressed by engineered M. bovis BCG modulates early interaction with human phagocytes. *PLoS. Pathog.* **6**(10), e1001159.

Takeuchi, O., Sato, S., Horiuchi, T., Hoshino, K., Takeda, K., Dong, Z., Modlin, R. L., and Akira, S. 2002. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J. Immunol.* 169(1), 10-14.

Tanigawa, K., Suzuki, K., Kimura, H., Takeshita, F., Wu, H., Akama, T., Kawashima, A., and Ishii, N. 2009. Tryptophan aspartate-containing coat protein (CORO1A) suppresses Toll-like receptor signalling in Mycobacterium leprae infection. *Clin. Exp. Immunol.* 156(3), 495-501.

Teles, R. M., Krutzik, S. R., Ochoa, M. T., Oliveira, R. B., Sarno, E. N., and Modlin, R. L. 2010. Interleukin-4 regulates the expression of CD209 and subsequent uptake of Mycobacterium leprae by Schwann cells in human leprosy. *Infect. Immun.* 78(11), 4634-4643.

The Universal Protein Resource.2010. Uniprot. [http://www.uniprot.org/taxonomy/362242].

Tripathy, S. P. 1983. The case for B.C.G. *Ann. Natl. Acad. Med. Sci.* 19(1), 11-21.

Truman, R. W., and Krahenbuhl, J. L. 2001. Viable M. leprae as a research reagent. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 69(1), 1-12.

Tukhvatulin, A. I., Logunov, D. Y., Shcherbinin, D. N., Shmarov, M. M., Naroditsky, B. S., Gudkov, A. V., and Gintsburg, A. L. 2010. Toll-like receptors and their adapter molecules. *Biochemistry (Mosc.)* **75**(9), 1098-1114.

van Beers, S. M., Hatta, M., and Klatser, P. R. 1999. Patient contact is the major determinant in incident leprosy: implications for future control. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 67(2), 119-128.

Vasconcelos, L. R., Fonseca, J. P., Carmo, R. F., Mendonca, T. F., Pereira, V. R., Lucena-Silva, N., Pereira, L. M., Moura, P., and Cavalcanti, M. D. 2011. Mannose-binding lectin serum levels in patients with leprosy are influenced by age and MBL2 genotypes. *Int. J. Infect. Dis.*

Venturini, J., Soares, C. T., Belone, A. F., Barreto, J. A., Ura, S., Lauris, J. R., and Vilani-Moreno, F. R. 2011. In vitro and skin lesion cytokine profile in Brazilian patients with borderline tuberculoid and borderline lepromatous leprosy. *Lepr Rev* 82(1), 25-35.

Verhagen, C., Faber, W., Klatser, P., Buffing, A., Naafs, B., and Das, P. 1999. 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-I) with leprosy reactions. *Am. J Pathol.* 154(6), 1793-1804.

Weir, R. E., Brennan, P. J., Butlin, C. R., and Dockrell, H. M. 1999. Use of a whole blood assay to evaluate in vitro T cell responses to new leprosy skin test antigens in leprosy patients and healthy subjects. *Clin. Exp. Immunol.* 116(2), 263-269.
WHO (1996). Randomised controlled trial of single BCG, repeated BCG, or combined BCG and killed Mycobacterium leprae vaccine for prevention of leprosy and tuberculosis in Malawi. Karonga Prevention Trial Group. *Lancet* 348(9019), 17-24.

WHO 1994. Chemotherapy of Leprosy. 847. 1994. Geneva, World Health Organization. Technical Report Series.

WHO 2005. Global leprosy situation, 2005. *Weekly Epidemiological Record* 80(34), 289-296.

WHO 2006. Global strategy for further reducing the leprosy burden and sustaining leprosy control activities 2006-2010. Operational guidelines. *Lepr. Rev.* 77(3), IX, X, 1-IX, X,50.

WHO 2010. Global leprosy situation, 2010. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 85(35), 337-348.

Wong, S. H., Gochhait, S., Malhotra, D., Pettersson, F. H., Teo, Y. Y., Khor, C. C., Rautanen, A., Chapman, S. J., Mills, T. C., Srivastava, A., Rudko, A., Freidin, M. B., Puzyrev, V. P., Ali, S., Aggarwal, S., Chopra, R., Reddy, B. S., Garg, V. K., Roy, S., Meisner, S., Hazra, S. K., Saha, B., Floyd, S., Keating, B. J., Kim, C., Fairfax, B. P., Knight, J. C., Hill, P. C., Adegbola, R. A., Hakonarson, H., Fine, P. E., Pitchappan, R. M., Bamezai, R. N., Hill, A. V., and Vannberg, F. O. 2010. Leprosy and the adaptation of human toll-like receptor 1. *PLoS. Pathog.* 6, e1000979.

Yamamura, M., Uyemura, K., Deans, R. J., Weinberg, K., Rea, T. H., Bloom, B. R., and Modlin, R. L. 1991. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science* 254(5029), 277-279.

Yamashita, Y., Maeda, Y., Takeshita, F., Brennan, P. J., and Makino, M. 2004. Role of the polypeptide region of a 33kDa mycobacterial lipoprotein for efficient IL-12 production. *Cell Immunol.* 229(1), 13-20.

Yamauchi, P. S., Bleharski, J. R., Uyemura, K., Kim, J., Sieling, P. A., Miller, A., Brightbill, H., Schlienger, K., Rea, T. H., and Modlin, R. L. 2000. A role for CD40-CD40 ligand interactions in the generation of type 1 cytokine responses in human leprosy. *J. Immunol.* 165(3), 1506-1512.

Yawalker, S. J. 2002. Leprosy. 2o Edição. Editora Novartis.

Zhang, F. R., Huang, W., Chen, S. M., Sun, L. D., Liu, H., Li, Y., Cui, Y., Yan, X. X., Yang, H. T., Yang, R. D., Chu, T. S., Zhang, C., Zhang, L., Han, J. W., Yu, G. Q., Quan, C., Yu, Y. X., Zhang, Z., Shi, B. Q., Zhang, L. H., Cheng, H., Wang, C. Y., Lin, Y., Zheng, H. F., Fu, X. A., Zuo, X. B., Wang, Q., Long, H., Sun, Y. P., Cheng, Y. L., Tian, H. Q., Zhou, F. S., Liu, H. X., Lu, W. S., He, S. M., Du, W. L., Shen, M., Jin, Q. Y., Wang, Y., Low, H. Q., Erwin, T., Yang, N. H., Li, J. Y., Zhao, X., Jiao, Y. L., Mao, L. G., Yin, G., Jiang, Z. X., Wang, X. D., Yu, J. P., Hu, Z. H., Gong, C. H., Liu, Y. Q., Liu, R. Y., Wang, D. M., Wei, D., Liu, J. X., Cao, W. K., Cao, H. Z., Li, Y. P., Yan, W. G., Wei, S. Y., Wang, K. J., Hibberd, M. L., Yang, S., Zhang, X. J., and Liu, J. J. 2009. Genomewide association study of leprosy. *N. Engl. J. Med.* 361(27), 2609-2618.

Zodpey, S. P. 2007. Protective effect of bacillus Calmette Guerin (BCG) vaccine in the prevention of leprosy: a meta-analysis. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.* 73(2), 86-93.