

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS
E BIOLOGIA CELULAR

ANGÉLICA RITA GOBBO

**Avaliação de biomarcadores sorológicos em um estudo de busca ativa de
casos novos de hanseníase em área hiperendêmica**

Belém - Pará

2016

ANGÉLICA RITA GOBBO

Avaliação de biomarcadores sorológicos em um estudo de busca ativa de casos novos de hanseníase em área hiperendêmica

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular pelo Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará.

Orientador: Claudio Guedes Salgado

Belém – Pará

2016

ANGÉLICA RITA GOBBO

Avaliação de biomarcadores sorológicos em um estudo de busca ativa de casos novos de hanseníase em área hiperendêmica

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Claudio Guedes Salgado (orientador)

Instituto de Ciências Biológicas – UFPA

Prof. Dr. Josafá Gonçalves Barreto

Campus Castanhal - UFPA

Prof. Dr. Moises Batista da Silva

Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

Prof. Dr. Lacy Cardoso Brito Junior (suplente)

Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

Belém – Pará

2016

AGRADECIMENTOS

A Deus por me conceder a benção de poder seguir pelo caminho que considerei como sendo o melhor para o meu futuro.

Ao meu marido, Jeferson Bezerra, por compreender a minha ausência ao seu lado por alguns meses, por me incentivar na realização desse mestrado e por ter me proporcionado a alegria de gerar e criar a nossa princesa Nicole a qual me fortalece e me completa a cada olhar.

Aos meus pais por me darem todo o suporte psicológico, sentimental e financeiro necessário para a realização dessa etapa da minha vida. O apoio de vocês é imensurável e impagável. Obrigada!

Aos meus irmãos (William e Angelo) e irmãs (Aline e Pammela) por me distraírem em todos os churrascos de fim de semana. Esse desprendimento é necessário para a revigoração mental.

Aos meus sobrinhos (Italo, Emily, Vanessa, Pedro, Kauana, Felipe, Roginel e Lucas) por me inspirarem e brincarem com a Nicole. Vocês tornam minha vida mais alegre.

Aos meus colegas do laboratório, em especial as minhas amigas Raquel e Érika por me darem sempre uma ajudinha nos ELISA's.

As instituições Universidade Federal do Pará (UFPA), Colorado State University (CSU), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação Amazônia Paraense (FAPESPA) que fomentaram direta ou indiretamente para a execução desse trabalho.

Aos pacientes por cederem seu sangue. Sem vocês seria impossível a realização dessa pesquisa!

Ao meu orientador (Claudio Salgado) e colaboradores (John Spencer, Moises Silva e Josafá Barreto) pelas contribuições científicas que auxiliaram na minha formação acadêmica e profissional.

*“A tarefa não é ver aquilo que ninguém viu,
mas pensar o que ninguém havia pensado
sobre aquilo que todo mundo vê.”*

Arthur Schopenhauer

RESUMO

Avaliação de biomarcadores sorológicos em um estudo de busca ativa de casos novos de hanseníase em área hiperendêmica

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica caracterizada por alterações de sensibilidade tátil, térmica e dolorosa na pele e nervos periféricos. Devido a ausência de diagnóstico laboratorial para a hanseníase, novas ferramentas que contribuam para a identificação de casos são necessárias para permitir o tratamento dos doentes antes da progressão para incapacidades físicas. Nesse sentido, o presente estudo objetivou avaliar a contribuição de biomarcadores sorológicos para o diagnóstico precoce da hanseníase. Foi realizado um estudo de busca ativa no distrito de Mosqueiro - Belém – Pará onde todos os participantes foram examinados clinicamente por médicos hansenologistas experientes e então 5mL de sangue periférico foram coletados para posteriores quantificações dos anticorpos anti-ND-O-BSA, anti-LID-1 e anti-NDO-LID pela técnica de ELISA. A ação de busca ativa no distrito de Mosqueiro diagnosticou 104 casos novos entre 895 indivíduos avaliados (11.6%), indicando uma alta endemia oculta que coincide com a alta soroprevalência de anticorpos anti-ND-O-BSA observada entre os estudantes. Foi observada uma diferença significativa entre os pacientes com diagnóstico tardio e precoce, sobretudo nas formas multibacilares. Todos os biomarcadores testados demonstraram resultados promissores na detecção dos casos tardios, tal como relatado na literatura, no entanto para os casos precoces estas moléculas identificaram corretamente apenas 50% dos indivíduos. Nenhum dos biomarcadores avaliados apresentou sensibilidade capaz de identificar todos os casos novos de hanseníase, sejam eles precocemente ou tardiamente diagnosticados. Apesar da molécula LID-1 ter evidenciado uma baixíssima sensibilidade para o diagnóstico precoce, sua alta especificidade e acurácia sugere sua utilização como uma potencial ferramenta de triagem sorológica para a identificação de sujeitos assintomáticos com alto risco de adoecimento. Assim, concluiu-se que apesar de nenhum biomarcador ter revelado utilidade no diagnóstico sorológico, a detecção dos anticorpos anti-LID-1 apresentou uma possível aplicabilidade na triagem dos indivíduos com maior risco de desenvolver a doença, contribuindo indiretamente para o diagnóstico da hanseníase.

Palavras-chave: hanseníase; escolares; biomarcadores; ND-O-BSA; LID-1; NDO-LID;

ABSTRACT

Serological biomarker assessment in a study of active new cases finding for leprosy in a hiperendemic area

Leprosy is a cronic infection diasease clinically characterized by changes in tactile, thermal and painful sensitivity in skin and peripheral nerves. Due to the absence of laboratory diagnosis of leprosy, new tools that contribute for identification of cases are necessary for enable patient treatment before progression to physical disabilities. In this sense, the present study aimed evaluate serological biomarkers contribution for early diagnosis of leprosy. Was perfomed an active case finding study in Mosqueiro district, Belém – Pará. All individuals were clinically examined by experient leprologists doctors and than 5mL of peripheral blood were colleted for future titration of anti-ND-O-BSA, anti-LID-1 e anti-NDO-LID by ELISA. The action of active finding in Mosqueiro district diagnosed 104 new cases of leprosy between 895 subjects examined (11.6%), indicating a high hidden endemy that agree with the high seroprevalence between schoolchildren. Were observed a significant difference among patients with late or early diagnoses, mainly in multibacillary forms. All biomarkers tested showed promising results in detection of late cases, such as related in literature, however, for early cases those molecules identified correctly only 50% of patients. None of biomarker tested presented sufficient sensitivity to detect all leprosy patients, early or lately diagnosed. Besides, LID-1 molecule had evidenced a lower sensitivity for early cases, their high especificity and accuracy suggest their use as a potential tool for serological screening to identify assintomatic subjects with high risk of illness. Thus, we concludes that besides no biomarker had reveled utility as a serological diagnostic tool, the detection of anti-LID-1 presented a possible aplicability as a screening marker of subjects with increased risk to develop leprosy, contributing indirectly for leprosy diagnosis.

Keywords: leprosy; schoolchildren; biomarkers; ND-O-BSA; LID-1; NDO-LID;

LISTA DE FIGURAS

FIG 1. Desenho do estudo.	21
FIG 2. Perfil de produção dos anticorpos anti-ND-O-BSA (A), anti-LID-1 (B) e anti-NDO-LID (C) frente a população de escolares (ESC) e contatos intradomiciliares (CI) sem hanseníase (sadios) e escolares e contatos intradomiciliares diagnosticados como casos de hanseníase.....	24
FIG 3. Comparação dos anticorpos anti-ND-O-BSA, anti-LID-1 e anti-NDO-LID entre escolares e contatos intradomiciliares que tornaram-se casos ou que permaneceram como sadios. As diferenças estatísticas foram calculadas utilizando o teste de Mann-Whitney.	26
FIG 4. Capacidade da produção dos anticorpos anti-ND-O-BSA (A), anti-LID-1 (B) e anti-NDO-LID (C) nas formas clínicas paucibacilar (PB) e multibacilar (MB) de casos de hanseníase. As diferenças estatísticas foram calculadas utilizando o teste de Mann-Whitney.	29
FIG 5. Comparação das áreas da curva ROC para pacientes com diagnóstico tardio e precoce para os anticorpos anti-ND-O-BSA (A), anti-LID-1 (B) e anti-NDO-LID (C).....	31
FIG 6. Correlação de Spearman dos biomarcadores sorológicos entre casos diagnosticados em Mosqueiro e na URE.....	34
FIG 7 Série histórica de casos novos no distrito de Mosqueiro no período de 2001 a 2014 (Fonte: SINAN).	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características epidemiológicas da população de estudo.....	22
Tabela 2. Percentual da soroprevalência dos anticorpos anti-ND-O-BSA, anti-LID-1 e anti-NDO-LID nos indivíduos avaliados em Mosqueiro.	24
Tabela 3. Análises de validação diagnóstica frente aos pacientes com sintomas clínicos tardios e iniciais.	32

LISTA DE ABREVIATURAS

AUC: área sob a curva
BAAR: bacilo álcool ácido resistente
BSA: albumina de soro bovino
CE: controle endêmico
CFP-10: proteína filtrada de cultura com 10kDa
CI: contato intradomiciliar
CNE: controle não-endêmico
DD: dimorfo-dimorfo
DO: densidade óptica
DP: desvio padrão
DT: dimorfo-tuberculóide
DV: dimorfo-virchowiano
ESAT-6: alvo antigênico precocemente secretado com 6kDa
ESC: escolar
I: indeterminado
IgG: imunoglobulina G
IgM: imunoglobulina M
LID-1: diagnóstico de hanseníase IDRI 1
MB: multibacilar
N: normal; normalidade
OMS: organização mundial de saúde
PB: paucibacilar
PBS: tampão fosfato-salino
PBS + T: tampão fosfato-salino com Tween 20
PGL-I: glicolípido fenólico I
ROC: características operacionais do receptor
SB: solução de bloqueio
SINAN: sistema de informação de agravos de notificação
TA: temperatura ambiente
TT: tuberculóide-tuberculóide
URE: unidade de referência em dermatologia
VV: virchowiano-virchowiano

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	OBJETIVOS.....	17
2.1	GERAL.....	17
2.2	ESPECÍFICOS	17
3	MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	18
3.2	PARTICIPANTES	18
3.3	ENSAIO DE IMUNOABSORÇÃO ENZIMÁTICA (ELISA).....	19
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	20
4	RESULTADOS.....	21
4.1	DIAGNÓSTICO DE HANSENÍASE EM CAMPO.....	21
4.2	SOROPREVALÊNCIA ENTRE ESCOLARES E CONTATOS INTRADOMICILIARES SAUDÁVEIS E CASOS DE HANSENÍASE.....	22
4.3	SECREÇÃO DE ANTICORPOS ENTRE CASOS E NÃO CASOS DE HANSENÍASE 24	
4.4	COMPARAÇÃO DAS FORMAS CLÍNICAS DE CASOS DE HANSENIASE DIAGNOSTICADOS EM MOSQUEIRO E/OU URE.....	27
4.5	VALIDAÇÃO DIAGNÓSTICA DOS BIOMARCADORES ND-O-BSA, LID-1 E NDO-LID	29
5	DISCUSSÃO.....	34
6	CONCLUSÃO	42
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

1 INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença infecciosa dermatoneurológica causada pelos patógenos intracelulares *Mycobacterium leprae* e *Mycobacterium lepromatosis* os quais são bacilos intracelulares álcool-ácido resistentes (BAAR) estritamente dependente das funções metabólicas do hospedeiro para sua sobrevivência (BRENNAN; VISSA, 2001; SINGH; COLE, 2011). As bactérias apresentam predileção por macrófagos e células de Schwann, onde esta interação conjuntamente com fatores genéticos predisponentes determinam a infectividade do patógeno. A instalação do *M.leprae* nas células de Schwann promove inflamação dos nervos periféricos, desmielinização e, conseqüentemente, comprometimento da transmissão dos impulsos nervosos que clinicamente se caracteriza por alteração de sensibilidade tátil, térmica e/ou dolorosa nas lesões (HART; TAPPING, 2012; MISCH et al., 2010).

Manchas hipocrômicas, eritematosas ou nódulos infiltrados na pele com hipoestesia ou anestesia são as principais manifestações clínicas da hanseníase. Ridley e Jopling classificaram a hanseníase em 5 formas clínicas de acordo com avaliação histopatológica e da resposta imune. Tuberculóide-tuberculóide (TT) e virchowiano-virchowiano (VV) são formas clínicas estáveis e polares, em contrapartida o dimorfo-tuberculóide (DT), dimorfo-dimorfo (DD) e dimorfo-virchowiano (DV) são formas intermediárias e imunologicamente instáveis (RIDLEY; JOPLING, 1966). Os casos TT apresentam um granuloma bem formado com predominância de células T CD4⁺ do subtipo Th1 que promovem uma forte imunidade adquirida celular que resultam em um quantitativo baixo ou ausente de *M.leprae* na pele e nervos. Já no polo oposto, VV, há uma predominância de linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺ do subtipo Th2 que resultam em altos títulos de anticorpos anti-*M.leprae* e granuloma bem constituído (PINHEIRO et al., 2011b; ZENHA et al., 2012).

A mucosa nasal e a pele são as principais rotas de transmissão do *M. leprae*, porém o mecanismo de entrada da bactéria no organismo ainda não está completamente elucidado (BHAT; PRAKASH, 2012). Acredita-se que a capacidade de formação da imunidade adaptativa celular seja um fator de susceptibilidade/resistência do hospedeiro envolvido mais diretamente na patogênese da hanseníase do que com a habilidade de multiplicação e penetração do bacilo nos nervos periféricos (PINHEIRO et al., 2011b).

Pacientes multibacilares, em especial os virchowianos, expelem cerca de 10 milhões de bacilos viáveis por dia através de suas secreções nasais, dessa forma, o convívio prolongado com estes pacientes resulta em um risco aumentado de 8 a 10 vezes maior dos contatos intradomiciliares evoluírem para a sintomatologia da doença (BHAT; PRAKASH, 2012; PINHEIRO et al., 2011a).

O diagnóstico clínico associado à quantificação da carga bacteriana dos pacientes direciona para o tipo de esquema terapêutico a ser adotado. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) indivíduos com poucas lesões (menos de 5) e baciloscopia negativa em todos os sítios analisados são classificados operacionalmente como paucibacilares – PB (do grego *pauci*: pouco) -, enquanto que aqueles que possuem lesões disseminadas pelo corpo (mais de 5) e baciloscopia positiva são denominados multibacilares – MB (do grego *multi*: muito).

A hanseníase é uma doença curável e o seu tratamento ocorre através da administração medicamentosa da poliquimioterapia (PQT) recomendada e distribuída pela OMS. A escolha dos fármacos é dependente da classificação operacional do paciente, sendo que os PB utilizam a rifampicina (600mg/mês) e dapsona (100mg/dia) por um período de 6 meses, enquanto aos MB é acrescido o antibiótico clofazimina (300mg/mês e 50mg/dia) (OMS).

Apesar da diminuição no número de casos acumulados de hanseníase após a implementação da PQT, a incidência da doença tem demonstrado uma detecção constante nos últimos 5 anos, especialmente em países em desenvolvimento como a Índia, Brasil e Indonésia que juntos representaram 84% de todos os casos novos de hanseníase no mundo em 2013 (WHO, 2015).

O Brasil é um país endêmico para a hanseníase apresentando uma heterogeneidade de casos de acordo com a região do país. Em 2012, 33 033 casos novos foram reportados, exibindo uma taxa de incidência de 17.39 casos para cada 100 000 habitantes (WHO, 2015). O estado do Pará, situado na região Amazônica foi classificado em 2012 como hiperendêmico entre a população em geral (50.75/100 000 habitantes) sendo que as crianças <15 anos de idade (15.66/100 000 habitantes) apresentaram em 2014 o maior número absoluto de hanseníase (455 casos novos) no Brasil (SINAN). A taxa anual de detecção de casos no estado do Pará em crianças é 3.2 vezes mais alta do que a do Brasil (4.89/100.000 habitantes - de acordo com dados do SINAN – Sistema de informação nacional de agravos de notificação), indicando que o diagnóstico da hanseníase em adultos está sendo realizado tardiamente.

Crianças são indicadores epidemiológicos utilizados para o controle da hanseníase. A doença em pessoas abaixo de 15 anos confirma a existência de focos ativos de transmissão do *M.leprae* sobretudo em parentes que compartilham um contato intradomiciliar (SALES et al., 2011). A busca ativa de casos novos é uma estratégia para a detecção dos doentes no início das manifestações clínicas e dos possíveis focos de transmissão da hanseníase (BARRETO et al., 2011). No Pará, em um estudo transversal de 2009-2011, nosso grupo detectou 4% de casos novos entre escolares e 9.4% entre os contatos intradomiciliares escolares, confirmando o alto quantitativo de casos entre indivíduos que compartilham o mesmo ambiente residencial e que a avaliação de escolares é uma alternativa para a identificação da hanseníase na comunidade (BARRETO et al., 2012), SINAN.

Ferramentas diagnósticas que melhorem a detecção da hanseníase são necessárias para garantir o tratamento precoce e interromper a progressão da doença para incapacidades físicas, especialmente em crianças (GOULART; GOULART, 2008). Até o momento, a hanseníase não possui um teste laboratorial que seja simples, rápido e sensível para o diagnóstico de todas as formas clínicas e que possa ser usado em campo (BAHMANYAR et al., 2016; GELUK et al., 2005). Nesse sentido, a busca por moléculas capazes de estimular a resposta imunológica de forma diferenciada em indivíduos com hanseníase tem sido testadas como possíveis alvos para o desenvolvimento de ferramentas diagnósticas.

A primeira molécula descoberta com potencial para o diagnóstico sorológico foi o glicolípido fenólico I (PGL-I) o qual é um antígeno específico do *M.leprae* bem reconhecido pela imunidade humoral (BARROW; ULLOM; BRENNAN, 1980). Pacientes MB devido possuírem uma grande quantidade de bacilos nas lesões produzem, por consequência, altos títulos de anticorpos IgM anti-PGL-I, enquanto que nos PB há tanto uma diminuição de bacilos nas lesões como o perfil de produção de anticorpos é diminuído, sendo o anti-PGL-I detectável em apenas 20-40% dos casos (BARRETO et al., 2011; MISCH et al., 2010). Além disso, infelizmente o PGL-I poder ser detectável em uma parcela (cerca de 10%) da população saudável de região endêmica mesmo que esta não desenvolva futuramente a doença, contudo, a soropositividade proporciona um risco aumentado 8.6 vezes maior de desenvolver manifestações clínicas de hanseníase o que indica que a quantificação dos anticorpos específicos para esse antígeno contribui para a identificação dos casos com infecções subclínicas (BARRETO et al., 2011; GELUK; DUTHIE; SPENCER, 2011).

Recentemente com o sequenciamento do gene completo do *M.leprae* novas moléculas têm sido utilizadas a fim de verificar sua utilidade como marcadores no diagnóstico sorológico da hanseníase (GARNIER et al., 2001; PINHEIRO et al., 2011a). Dentre estas, a proteína recombinante LID-1 foi obtida a partir da fusão das proteínas ML0405 e ML2331 as quais evidenciaram relevância na detecção de pacientes BL com IB abaixo de 4 que não foram detectados pelo PGL-I, demonstrando assim potencial para o diagnóstico da hanseníase (REECE et al., 2006). Além disso, o LID-1 demonstrou uma resposta diferenciada em contatos intradomiciliares que tornaram-se, após 6 a 8 meses, casos de hanseníase, parecendo contribuir para o diagnóstico de casos com infecção subclínica e, conseqüentemente, na redução da transmissão da hanseníase (DUTHIE et al., 2007).

A combinação entre as moléculas ML0405 e ML2331 conjuntamente com o ND-O-HSA (análogo sintético do PGL-I) foi capaz de detectar pacientes com IB 3, evidenciando uma contribuição para a detecção de pacientes MB no início da sua evolução clínica (REECE et al., 2006). Dessa forma, visando minimizar a necessidade de uma equipe profissional altamente treinada e especializada em hanseníase foi desenvolvido um teste rápido (Orange Life®) a partir da associação do ND-O e o LID-1 em que além de ser de fácil manuseio e interpretação do resultado, pode ser confirmado também por uma leitor digital de smartphone (Smart Reader®) que facilita ainda mais a utilização do teste, principalmente em locais com pouca infra-estrutura. Com isso, a utilização do NDO-LID apresentou uma alta capacidade de detecção dos pacientes MB e de cerca de 20% dos PB (CARDOSO et al., 2013). Uma particularidade promissora prenunciada pelo teste rápido NDO-LID® consistiu na sua alta especificidade, visto que não foi detectado nos indivíduos saudáveis de região endêmica e apenas 2.5% dos contatos intradomiciliares demonstrou reatividade à molécula, podendo estar relacionado portanto a casos ocultos com infecção subclínica (DUTHIE et al., 2014).

O monitoramento de casos de hanseníase através de um teste diagnóstico sensível, específico e que minimize extensas habilidades médicas tem sido alvo de diversas pesquisas que visam a implementação de testes rápidos para a hanseníase. Nesse contexto já foram testados o PGL-I e o LID-1 isoladamente (BÜHRER-SÉKULA et al., 2003; DUTHIE et al., 2008; SOUZA et al., 2014) e associados (CARDOSO et al., 2013; DUTHIE et al., 2014) contudo todos esses testes baseados em membranas de imunocromatografia de fluxo lateral (lateral flow) tem tido a sensibilidade como um fator limitante para sua aplicabilidade clínica.

Nesse sentido, o presente trabalho buscou avaliar os títulos de 3 potenciais biomarcadores sorológicos para a hanseníase (anti-NDO-BSA, anti-LID-1 e anti-NDO-LID) em um estudo de busca ativa de novos casos a fim de verificar se a quantificação destes anticorpos resulta na contribuição para o diagnóstico precoce da hanseníase.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Realizar uma análise comparativa no perfil de produção dos anticorpos anti-ND-O-BSA, anti-LID-1 e anti-NDO-LID em casos de hanseníase precocemente diagnosticados em área endêmica a fim de verificar a possível aplicabilidade das moléculas para a detecção de casos com manifestações clínicas iniciais.

2.2 ESPECÍFICOS

- A.** Avaliar a soroprevalência de anticorpos anti-ND-O-BSA, anti-LID-1 e anti-NDO-LID entre casos novos de hanseníase, seus contatos intradomiciliares e escolares.
- B.** Identificar o perfil dos anticorpos anti-ND-O-BSA, anti-LID-1 e anti-NDO-LID entre casos de hanseníase diagnosticados tardiamente ou precocemente.
- C.** Verificar a sensibilidade, especificidade e acurácia diagnóstica dos biomarcadores sorológicos testados.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

O estudo baseou-se em uma análise transversal realizada em 2014 com indivíduos residentes na Ilha de Mosqueiro, um distrito pertencente ao município de Belém, capital do estado do Pará, Brasil. O trabalho foi constituído por uma equipe multiprofissional de saúde composta por médicos hansenologistas, enfermeiros, fisioterapeutas, farmacêuticos, biomédicos, agentes comunitários de saúde e técnicos de análises clínicas.

A pesquisa de campo consistiu em visitas de escolas municipais e residências de escolares diagnosticados na escola como casos novos de hanseníase. Anteriormente às visitas da equipe multiprofissional, informações básicas sobre hanseníase e do escopo do estudo foram repassadas para os professores e diretores das escolas e os mesmos escolheram aleatoriamente as turmas que participariam do projeto de pesquisa.

Os critérios de inclusão do estudo foram: estar na escola ou na residência no momento da visita da equipe multiprofissional e assinar o termo de consentimento livre e esclarecido; no caso dos indivíduos que possuíam idade inferior a 18 anos o termo de consentimento foi assinado por seus pais ou responsáveis legais. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal do Pará (protocolo número 197/07 CEP-ICS/UFPa). Fatores como sexo, raça, presença de comorbidade ou hábitos sociais não foram considerados como critérios de exclusão.

3.2 PARTICIPANTES

Foram selecionadas 4 escolas públicas (1 de ensino fundamental e médio 3 de ensino médio) em diferentes bairros periféricos do distrito de Mosqueiro, onde os diretores e professores selecionaram os estudantes com idade entre 6 a 18 anos a participarem do estudo.

No momento da visita escolar pela equipe multiprofissional de saúde, 705 estudantes foram incluídos no estudo. Primeiramente os estudantes foram examinados pelos médicos hansenólogos da equipe, os quais realizaram a avaliação dermatológica a fim de identificar a

presença/ausência de áreas com lesões de pele (mancha, placa ou nódulo) com alteração de sensibilidade térmica, tátil e/ou dolorosa, sendo que aqueles diagnosticados como casos novos de hanseníase tiveram suas residências visitadas posteriormente para a avaliação clínica dos seus contatos intradomiciliares. Os casos novos foram classificados baseado em Ridley-Jopling acrescido das formas clínicas indeterminada e primariamente neural da classificação de Madri.

A fim de comparar se o tempo de doença interfere no quantitativo dos anticorpos avaliados foram inseridos no estudo 25 casos de hanseníase diagnosticados na Unidade de Referência em Dermatologia Sanitária do Pará Dr. Marcello Candia nas formas clínicas TT, DT com baciloscopia negativa, DT com baciloscopia positiva, DV e VV além de 49 contatos intradomiciliares que não possuíam manifestações clínicas de hanseníase no momento da avaliação médica.

Como controle negativo 13 indivíduos sem sinais e sintomas de hanseníase residentes na mesma área endêmica que os pacientes foram também incluídos no estudo para estabelecer um limite de positividade para a produção dos anticorpos testados (*cut-off*). Todos os indivíduos participantes do estudo tiveram uma amostra de sangue (5ml) coletada para posterior quantificação sorológica.

3.3 ENSAIO DE IMUNOABSORÇÃO ENZIMÁTICA (ELISA)

Resumidamente, placas de cultura de 96 poços (Immulon®, USA) foram sensibilizadas com 50ng/50µl de solução de carbonato/bicarbonato de sódio com os antígenos ND-O-BSA, LID-1 ou NDO-LID “overnight”. As placas foram bloqueadas com solução de bloqueio (SB) contendo solução salina tamponada (PBS - pH 7.2) com 1% de albumina de soro bovino (BSA) e 0.05% de Tween-20 (T) por uma hora a temperatura ambiente (TA). As amostras de soro foram diluídas 1:300 em SB e testadas em duplicata por um período de incubação de 2h. O anticorpo secundário anti-humano IgM conjugado com a peroxidase foi utilizado para a detecção do ND-O-BSA (diluição 1:10 000), IgG para o LID-1 (diluição 1:20 000) e ambos os anticorpos para o NDO-LID. A reação foi desenvolvida pela adição do anticorpo secundário em PBS + T por 1.5h e então o substrato colorimétrico *o*-phenylenediamine dihydrochloride (SIGMAFAST™ OPD, Sigma-Aldrich P9187, USA) foi adicionado a cada poço por 15 min. Para parar a reação 50µl/poço de H₂SO₄ 4N foram inseridos

e imediatamente lidos em espectrofotômetro a 490nm utilizando o leitor de microplaca MRX Revelation 4.25 (Dynex Technologies, USA).

Para verificar as variações intra e inter-teste controles positivos (paciente VV) e negativos (controle não endêmico) foram adicionados a cada placa. Todas as amostras foram testadas em duplicata mais um controle individual contendo apenas a SB (branco).

Os valores de *cut-off* foram estabelecidos utilizando a média do resultado da densidade óptica (DO) mais 3 vezes o desvio padrão de 13 indivíduos sadios de região endêmica para hanseníase (controle endêmico – CE). Os resultados para cada indivíduo foram considerados como sendo a média das duplicatas menos o branco. O *cut-off* do anti-ND-O-BSA e anti-LID-1 foi 0.295 e para o anti-NDO-LID foi 0.475.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A fim de comparar os níveis dos anticorpos anti-ND-O-BSA, anti-LID-1 e anti-NDO-LID em amostras independentes e não paramétricas foi utilizado o teste U de Mann-Whitney. A curva ROC foi elaborada utilizando indivíduos doentes e não doentes pertencentes ao estudo, enquanto a correlação de Spearman comparou a associação dos resultados dos antígenos dentre os casos de hanseníase.

Para a análise da validação diagnóstica foram calculadas os percentuais de sensibilidade (n° de indivíduos com a doença e positivo para o teste \div n° total de doentes), especificidade (n° de indivíduos sem a doença e negativo para o teste \div n° total de não doentes) e acurácia (total de indivíduos verdadeiros positivos e verdadeiros negativos \div n° total de indivíduos) para cada antígeno.

4 RESULTADOS

4.1 DIAGNÓSTICO DE HANSENÍASE EM CAMPO

Inicialmente 705 escolares (ESC) foram avaliados clinicamente sendo que 8.9% (n=63) destes manifestavam lesões características de hanseníase. Em geral, os casos do grupo de ESC apresentaram manchas discretas de pele (quantitativo médio \pm DP: 2.5 ± 1.8) e 87.3% não reportaram contato com casos de hanseníase. A maioria dos casos entre ESC foram classificados nas formas clínicas DT e I (n=34 e 13, respectivamente). Para cada caso diagnosticado entre os ESC foi realizada a avaliação clínica de todos os indivíduos que residiam na mesma casa e que estavam disponíveis no momento. No total, 189 contatos intradomiciliares (CI) foram examinados e mais 41 casos novos (21.6%) foram detectados. Os CI casos apresentaram em média 3.9 lesões de pele e predominância das formas clínicas MB (87.8%) classificadas como DT e DD (n=24 e 11, respectivamente). Em síntese, 104 (14.7%) casos novos foram detectados nesse estudo de busca ativa, sendo 53.8% (n=56) representado por menores de 15 anos de idade, sendo que 14.4% (n=15) dos mesmos apresentando grau 1 de incapacidade física. (FIG 1 e Tabela 1).

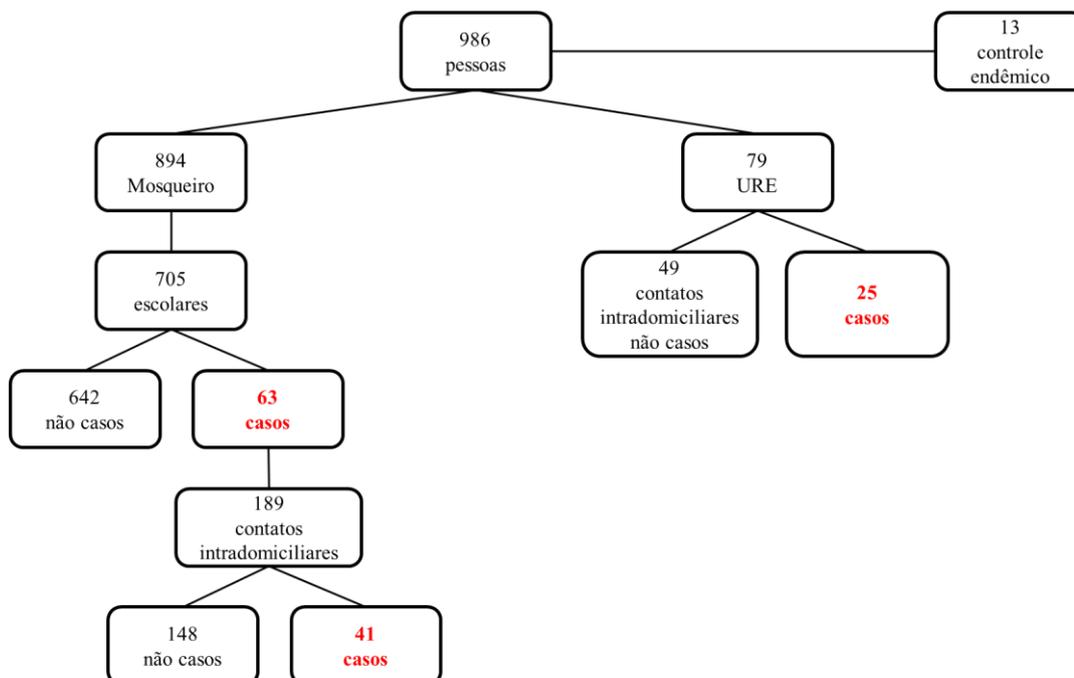


FIG 1. Desenho do estudo.

Tabela 1. Características epidemiológicas da população de estudo.

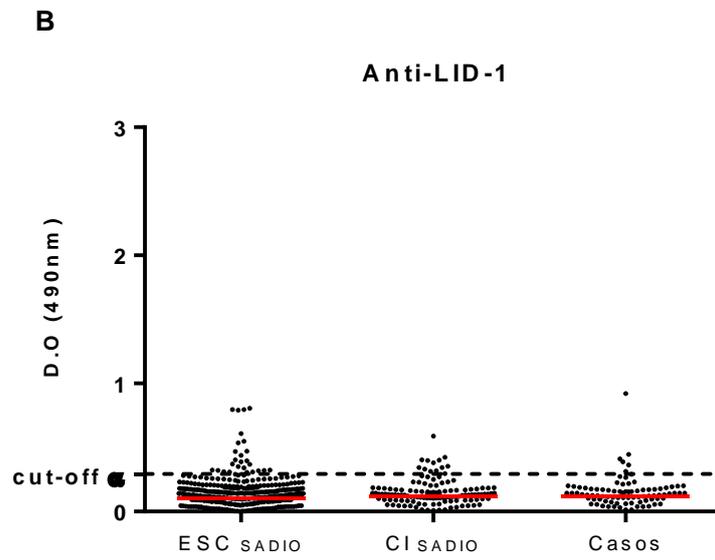
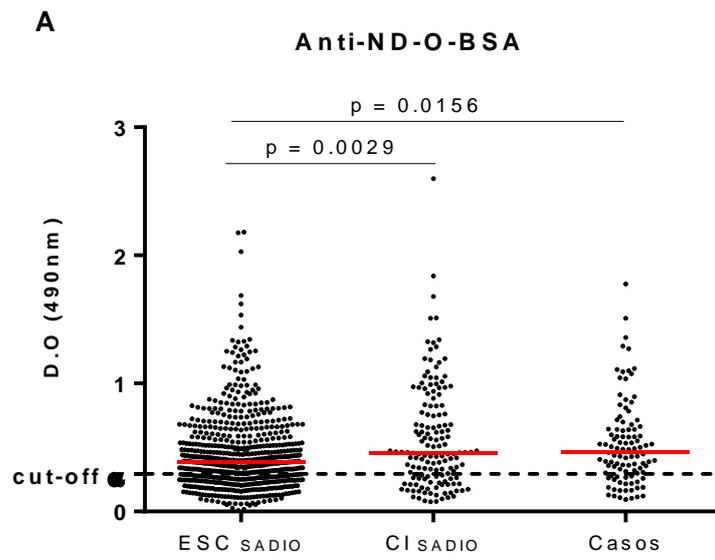
	n	H/M	< 15 anos (média ± DP)	≥ 15 anos (média ± DP)	Forma clínica		Índice bacilar (média ± DP)	Grau de incapacidade		
					PB	MB		0	1	2
Paucibacilar URE	10	05/05	1 (9 ± 0)	9 (38 ± 20.5)	10	-	0 ± 0	8	2	0
Multibacilar URE	15	11/04	1 (8 ± 0)	14 (45.4 ± 20.4)	-	15	3.4 ± 1.6	7	6	2
Contato intradomiciliar URE	49	18/31	13 (26.8 ± 20.2)	36 (27.5 ± 19.0)	-	-	-	-	-	-
Escolar	705	324/381	610 (10.3 ± 2.5)	95 (16.1 ± 1.3)	14	49	-	53	10	0
Contato intradomiciliar	189	70/119	39 (9.7 ± 2.9)	150 (35.2 ± 13.9)	5	36	-	36	5	0
Controle endêmico	13	07/06	0	13 (56 ± 9.8)	-	-	-	-	-	-

Nota: M: masculino; F: feminino; DP: desvio padrão; PB: paucibacilar; MB: multibacilar; URE: Unidade de referência em dermatologia Dr Marcello Candia;

4.2 SOROPREVALÊNCIA ENTRE ESCOLARES, CONTATOS INTRADOMICILIARES E CASOS DE HANSENÍASE

Para analisar a soroprevalência da hanseníase em Mosqueiro foram quantificados os anticorpos anti-ND-O-BSA, anti-LID-1 e anti-NDO-LID e os indivíduos foram classificados em soropositivos e soronegativos baseado na capacidade individual de induzir resposta imune humoral específica para cada antígeno. A soroprevalência apresentou um padrão de produção de anticorpos anti-ND-O-BSA e anti-NDO-LID semelhantes, onde ambos exibiram altos títulos de anticorpos para os casos e CI. Em contrapartida, a quantificação do anticorpo anti-LID-1 foi incapaz de distinguir os grupos populacionais analisados, além disso a maioria dos indivíduos não produziu anti-LID-1 e anti-NDO-LID acima dos seus respectivos *cut-offs*, dificultando também a diferenciação dos grupos.

Apesar de haver uma discreta diminuição dos títulos dos anticorpos anti-ND-O-BSA e anti-NDO-LID nos escolares em relação aos demais grupos analisados ainda é possível observar uma alta soroprevalência entre escolares sadios, havendo inclusive indivíduos com densidade óptica equivalente à dos casos (FIG 2).



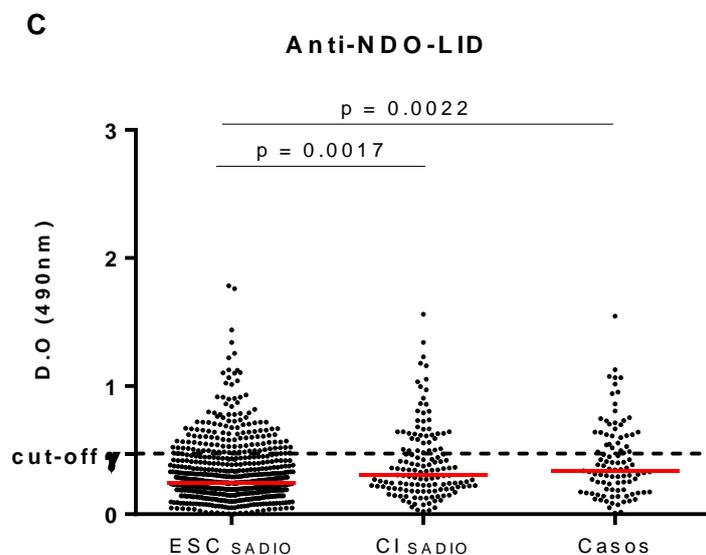


FIG 2. Perfil de produção dos anticorpos anti-ND-O-BSA (A), anti-LID-1 (B) e anti-NDO-LID (C) frente a população de escolares (ESC) e contatos intradomiciliares (CI) sem hanseníase (sadios) e escolares e contatos intradomiciliares diagnosticados como casos de hanseníase

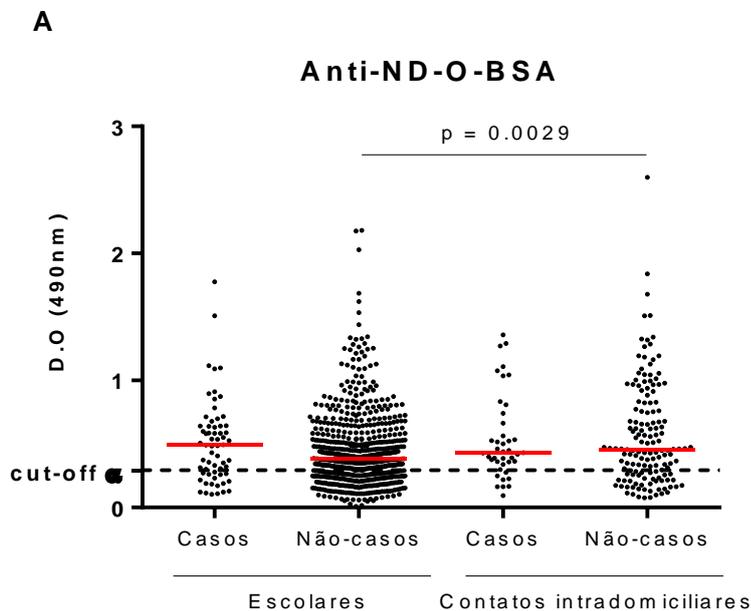
Nota: *cut-off* α : 0.295; *cut-off* γ : 0.475

Em relação ao percentual de positividade, nenhum anticorpo foi capaz de ser detectado apenas por indivíduos doentes, não havendo também distinção no percentual de reconhecimento antígeno para os ESC, CI ou casos para nenhum dos anticorpos testados. O ND-O-BSA apresentou o maior percentual de detecção, seguido pelo NDO-LID e LID-1 para todos os grupos analisados. Foi observada uma alta soropositividade entre ESC e CI sadios, confirmando a alta endemicidade da hanseníase no local e a limitação diagnóstica dos biomarcadores ND-O-BSA e NDO-LID devido a alta soroprevalência entre sadios (Tabela 2).

Tabela 2. Percentual da soroprevalência dos anticorpos anti-ND-O-BSA, anti-LID-1 e anti-NDO-LID nos indivíduos avaliados em Mosqueiro.

	ND-O-BSA	LID-1	NDO-LID
ESC SADIO	68.53%	4.04%	20.24%
CI SADIO	70.94%	8.78%	29.45%
Casos	75.00%	5.76%	33.65%

Afim de comparar se a quantificação dos anticorpos anti-ND-O-BSA, anti-LID-1 e anti-NDO-LID contribuiria para a distinção sorológica dos indivíduos com hanseníase daqueles indivíduos sem manifestações clínicas da doença foi avaliada a soroprevalência entre ESC e CI casos e não casos. Não foi observada diferença estatística na produção dos anticorpos testados entre não casos e os casos diagnosticados no grupo dos ESC ou CI, porém os títulos dos anticorpos anti-ND-O-BSA e anti-NDO-LID foram ligeiramente superiores nos contatos intradomiciliares não casos em relação aos escolares não casos, ratificando que o convívio prolongado com um paciente pode contribuir para o aumento da produção de anticorpos anti-*M.leprae* (FIG 3).



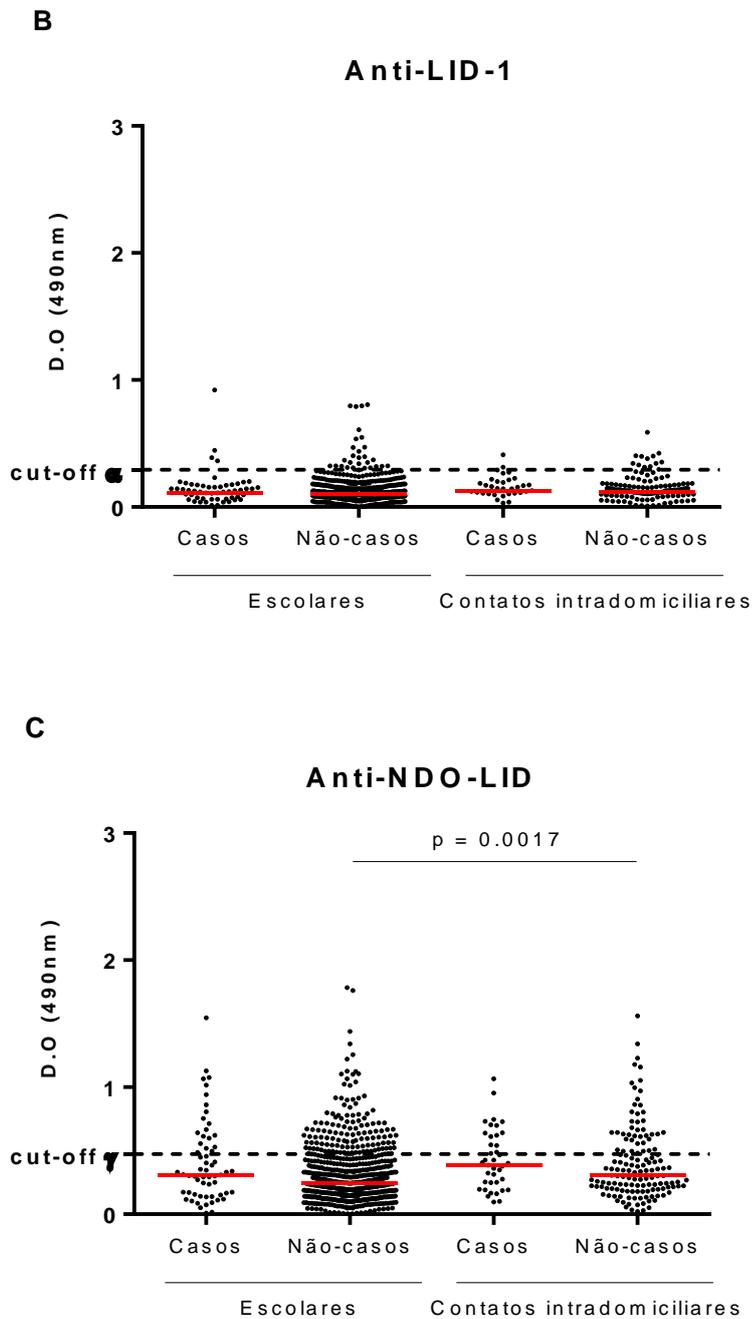


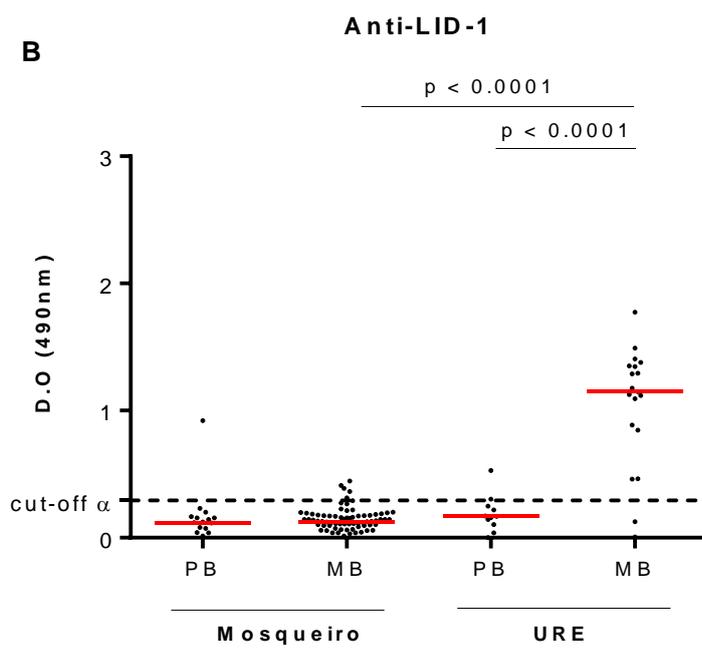
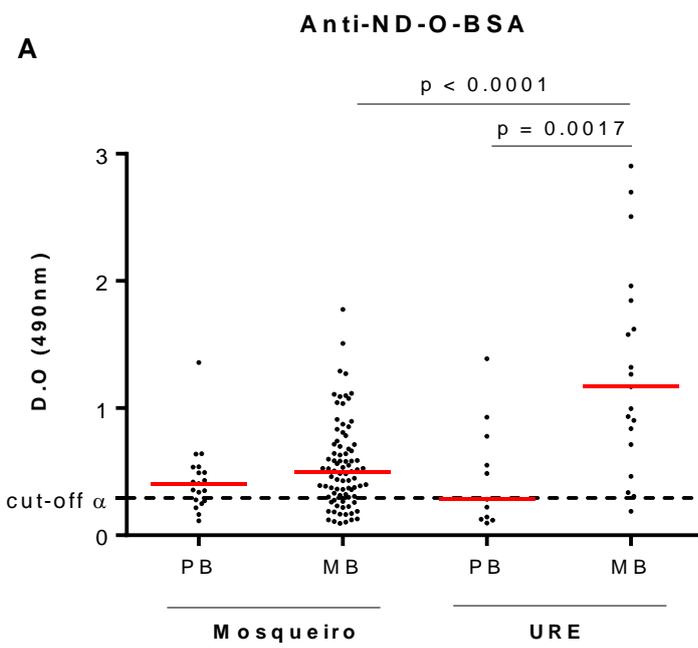
FIG 3. Comparação dos anticorpos anti-ND-O-BSA, anti-LID-1 e anti-NDO-LID entre escolares e contatos intradomiciliares que tornaram-se casos ou que permaneceram como saudáveis. As diferenças estatísticas foram calculadas utilizando o teste de Mann-Whitney.

Nota: *cut-off* α : 0.295; *cut-off* γ : 0.475.

4.3 COMPARAÇÃO DO PERFIL SOROLÓGICO DE PACIENTES DE HANSENÍASE DIAGNOSTICADOS PRECOCEMENTE OU TARDIAMENTE

Estudos anteriores demonstraram que a Unidade de Referência Estadual em Dermatologia Sanitária Dr Marcello Cândia (URE) diagnostica, em geral, casos de hanseníase com manifestações clínicas clássicas, podendo isto estar associado a um diagnóstico mais tardio em decorrência do exame clínico ser requerido a partir da demanda espontânea dos indivíduos com suspeita de alguma doença dermatológica. Dessa maneira, estes pacientes comumente infectam-se com o *M.leprae* por um período mais prolongado e portanto exibem níveis de anticorpos superiores aos dos pacientes diagnosticados em campo em que foi realizada uma busca ativa de possíveis focos da doença (BARRETO et al., 2012). Baseado nisso, 25 pacientes da URE foram adicionados ao estudo (10 PB e 15 MB) a fim de compará-los sorologicamente com os 104 pacientes (19 PB e 85 MB) diagnosticados em Mosqueiro (Tabela 1).

Foi observado um perfil de produção dos anticorpos testados bastante diferente entre os casos precoces e tardios, sobretudo em relação aos pacientes MB visto que aqueles com diagnóstico tardio exibiram níveis de anti-ND-O-BSA, anti-LID-1 e anti-NDO-LID muito superiores aos dos MB diagnosticados precocemente. Verificou-se também uma diferença significativa entre os PB e MB da URE, enquanto que os casos de Mosqueiro não exibiram diferenciação sorológica de acordo com a classificação operacional. Os biomarcadores analisados no estudo não exibiram capacidade de estimulação sorológica diferenciada entre os PB, independente do tempo de progressão e diagnóstico da doença (FIG 4).



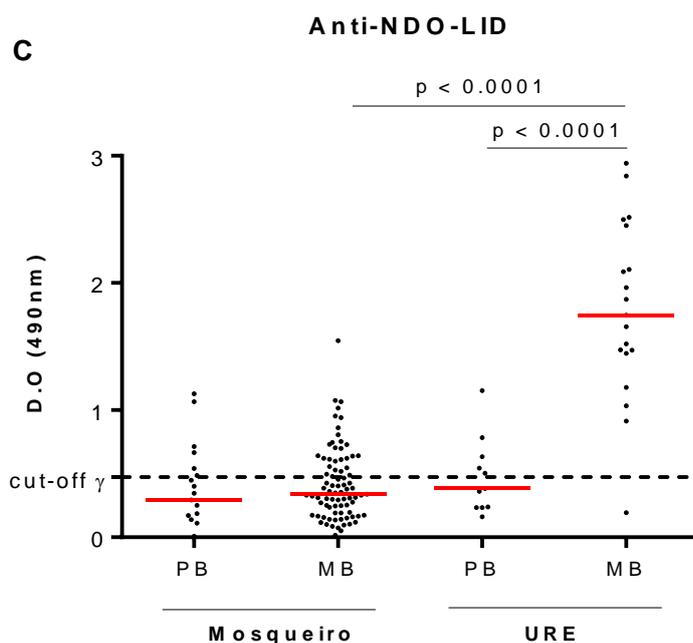


FIG 4. Capacidade da produção dos anticorpos anti-ND-O-BSA (A), anti-LID-1 (B) e anti-NDO-LID (C) nas formas clínicas paucibacilar (PB) e multibacilar (MB) de casos de hanseníase. As diferenças estatísticas foram calculadas utilizando o teste de Mann-Whitney.

Nota: *cut-off* α : 0.295; *cut-off* γ : 0.475.

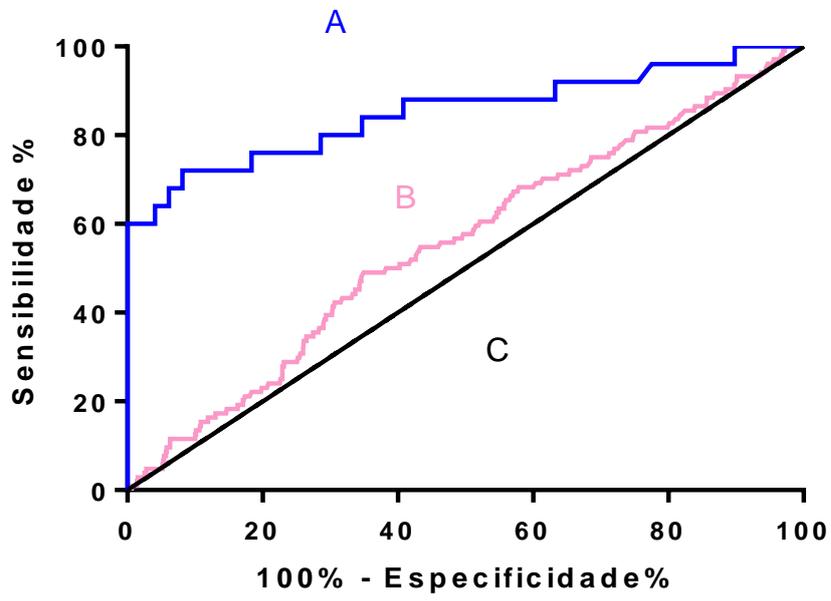
4.4 VALIDAÇÃO DIAGNÓSTICA DOS BIOMARCADORES ND-O-BSA, LID-1 E NDO-LID

A fim de avaliar o desempenho dos antígenos ND-O-BSA, LID-1 e NDO-LID como possíveis biomarcadores para o diagnóstico da hanseníase foi verificada a interrelação dos verdadeiros positivos aos falsos positivos - através da curva ROC – de indivíduos com e sem a doença (respectivamente casos e contatos intradomiciliares sadios).

A comparação constituída entre os contatos intradomiciliares sadios e os pacientes atendidos na URE (HC_{URE}) (item A) evidenciou que utilizando como parâmetro os indivíduos com manifestações clínicas clássicas, todos os marcadores analisados foram capazes de diferenciar satisfatoriamente os doentes dos não doentes, com AUC de 0.85. Contraditoriamente para os pacientes cujo diagnóstico foi realizado no início das manifestações clínicas (item B) não foi observada uma boa discriminação entre doentes e não doentes, possuindo todos AUC próximas à linha de indiscriminação (item C) (FIG 5).

A

ND-O-BSA



AUC

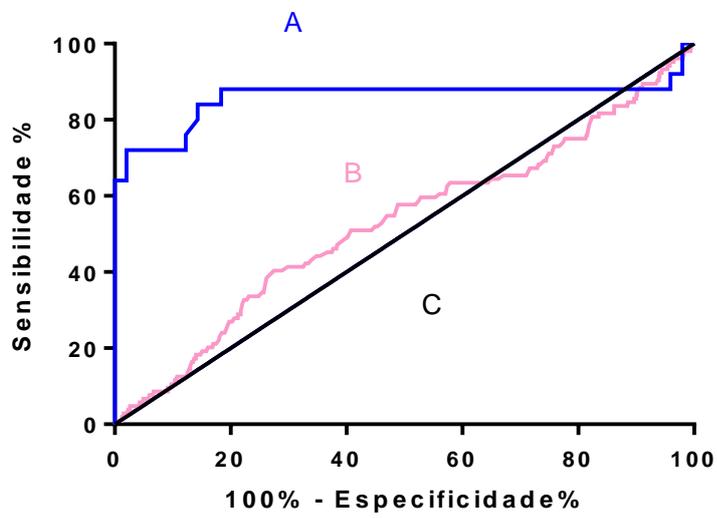
A = 0.85

B = 0.55

C = 0.50

B

LID-1



AUC

A = 0.85

B = 0.52

C = 0.50

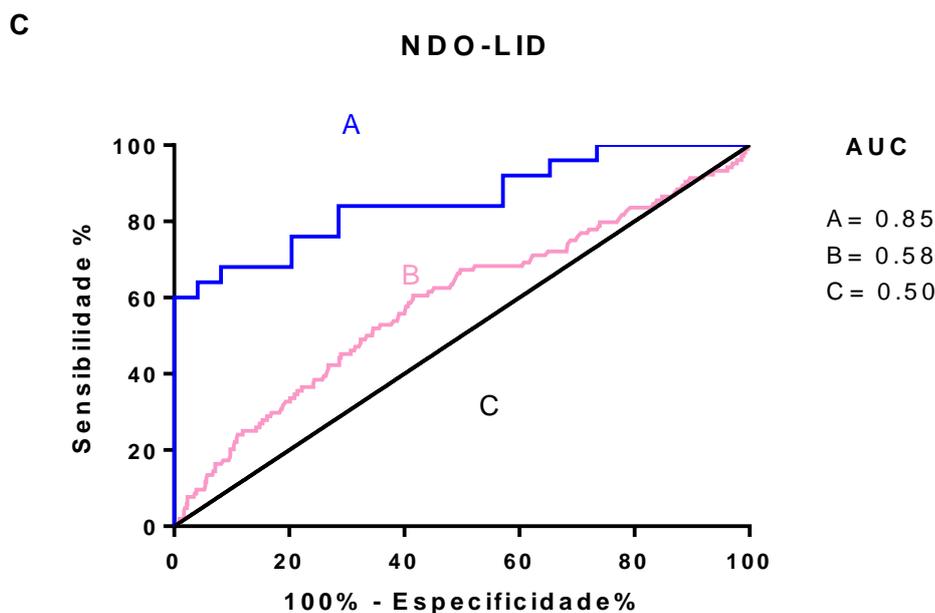


FIG 5. Comparação das áreas da curva ROC para pacientes com diagnóstico tardio e precoce para os anticorpos anti-ND-O-BSA (A), anti-LID-1 (B) e anti-NDO-LID (C).

Nota: AUC: área sob a curva. A: linha de tendência para pacientes da URE (diagnóstico tardio). B: linha de tendência para pacientes de Mosqueiro (diagnóstico precoce). C: linha de tendência de indiscriminação do teste.

Analisando isoladamente os parâmetros de validação diagnóstica observou-se que todos os marcadores foram incapazes de detectar todos os indivíduos doentes (não houve 100% de sensibilidade). A capacidade de detecção dos doentes através da sorologia (verdadeiros positivos) foi maior para o anti-ND-O-BSA seguida pelo anti-NDO-LID e, por fim, anti-LID-1 tanto para os pacientes com diagnóstico tardio ou precoce. O antígeno ND-O-BSA foi o único capaz de manter seu percentual de sensibilidade entre os pacientes de Mosqueiro e da URE, enquanto que os demais antígenos demonstraram uma diminuição drástica no reconhecimento dos casos precoces.

Em relação ao padrão de especificidade constatou-se um baixo quantitativo de falsos positivos entre os HC sadios examinados na URE para todos os anticorpos testados, enquanto que os HC e ESC sadios de Mosqueiro exibiram uma especificidade para o anti-ND-O-BSA baixa, limitando sua utilização como ferramenta de triagem. Nenhum HC sadios avaliado na URE foi soropositivo para o anti-LID-1, assim como apenas 5% dos não doentes de Mosqueiro foram falsos-positivos para essa molécula, confirmando sua alta especificidade na detecção dos doentes. De forma semelhante, porém minimizada, o anti-NDO-LID também foi soronegativo

em cerca de 80% dos indivíduos sadios do estudo, exibindo vantajosamente também poucos falsos-positivos.

Além dos parâmetros descritos acima para a validação do desempenho de uma molécula como alvo diagnóstico utiliza-se também como critério a acurácia para avaliar a eficácia do teste. Sendo assim, observou-se o anti-LID-1 foi o melhor anticorpo para a identificação dos indivíduos soropositivos doentes (verdadeiros positivos) e dos soronegativos não doentes (verdadeiros negativos), distinguindo sorologicamente assim os casos de hanseníase precocemente ou tardiamente diagnosticados. Da mesma maneira, porém com uma capacidade de acerto menor, o anti-NDO-LID apresentou uma acurácia semelhante tanto para os indivíduos da URE como de Mosqueiro. Já o anti-ND-O-BSA evidenciou uma diminuição no percentual da acurácia para os indivíduos de Mosqueiro em decorrência do alto quantitativo de falsos-positivos vistos entre os não doentes.

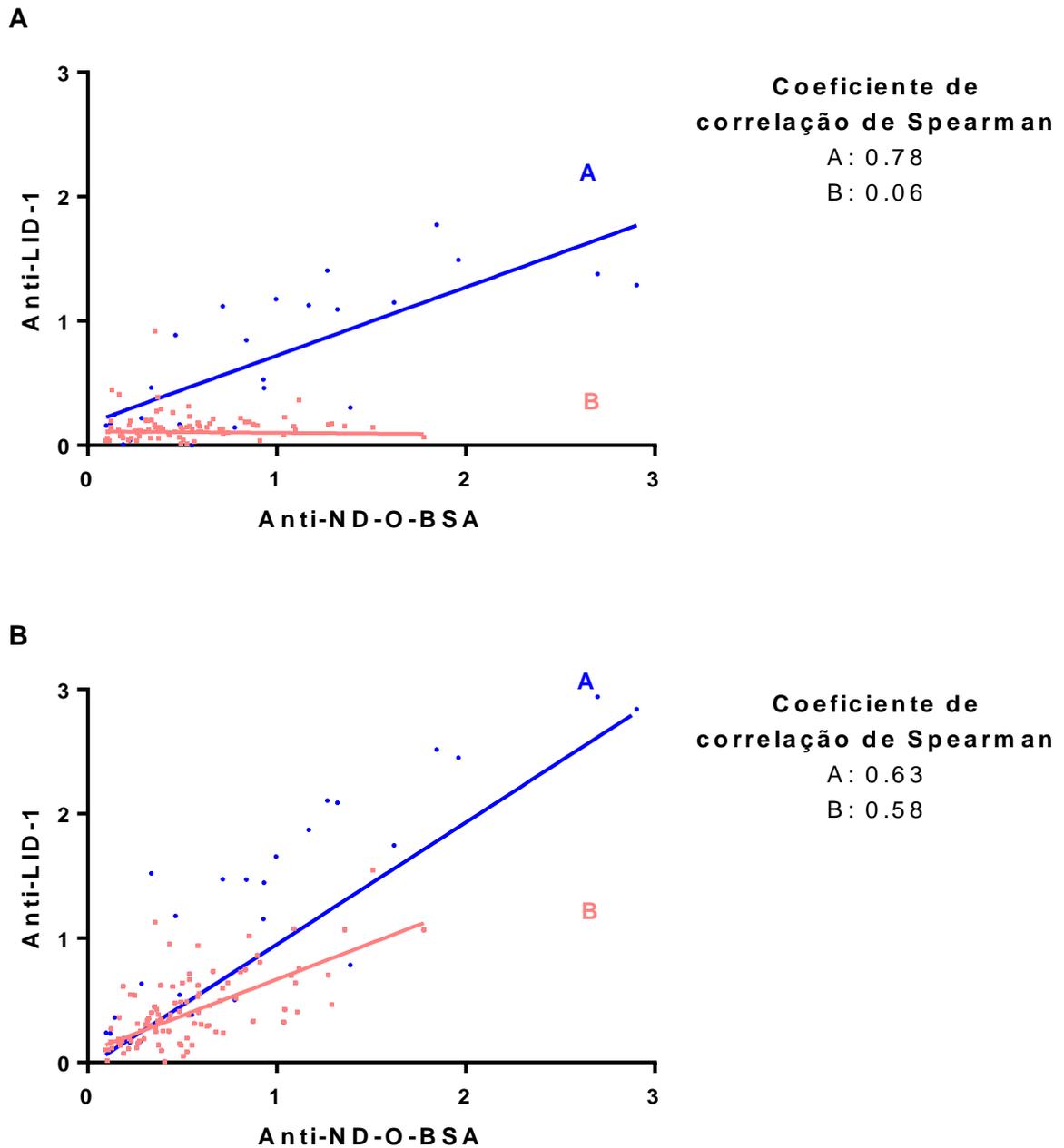
Tabela 3. Análises de validação diagnóstica frente aos pacientes com sintomas clínicos tardios e iniciais.

		ND-O-BSA	LID-1	NDO-LID	ND-O-BSA + LID-1	ND-O-BSA + NDO-LID	LID-1 + NDO-LID
URE	Sensibilidade	76%	64%	76%	73%	78%	73%
	Especificidade	71%	100%	78%	100%	76%	100%
	Acurácia	73%	88%	77%	89%	77%	90%
Mosqueiro	Sensibilidade	75%	6%	34%	14%	58%	3%
	Especificidade	31%	95%	78%	90%	59%	97%
	Acurácia	36%	85%	73%	59%	83%	88%

A soropositividade para mais de um anticorpo pode contribuir no direcionamento da avaliação clínica de indivíduos com risco aumentado de adoecimento. Nesse sentido, foram feitas 3 associações entre os anticorpos onde foi observado que para os casos com diagnóstico precoce todas as combinações apresentaram uma utilidade limitada, uma vez que as correlações exibiram apenas grau fraco ou moderado. Já para os pacientes com diagnóstico tardio (URE) todas as relações exibiram uma correlação de grau forte, devido a alta produção de anticorpos pelos pacientes MB.

Em virtude dos pacientes de Mosqueiro terem sido diagnosticados precocemente o perfil de secreção dos anticorpos anti-*M.leprae* não exibiu uma correlação forte quando associados tal como nos casos tardios da URE (FIG 6). Da mesma forma, não se mostrou

vantajoso a associação dos anticorpos para a detecção de casos novos em início das manifestações clínicas haja vista que apesar dos parâmetros de especificidade e acurácia terem evidenciado um percentual de precisão satisfatório para os testes, as baixas sensibilidades das associações demonstram que estas somente detectariam uma diminuta parcela de indivíduos doentes (Tabela 2).



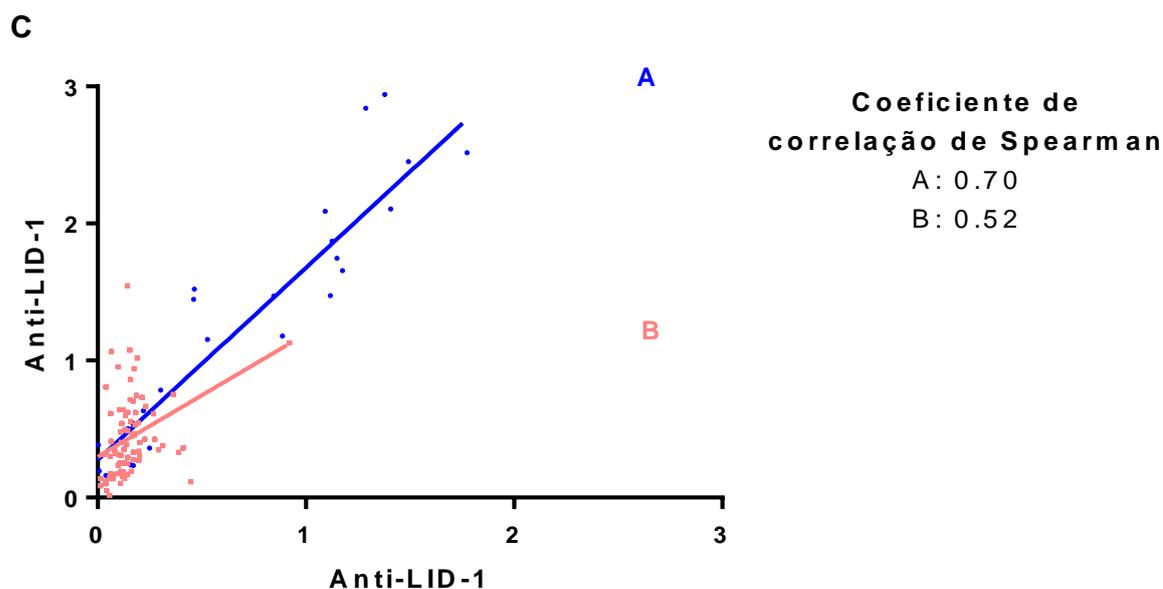


FIG 6. Correlação de Spearman dos biomarcadores sorológicos entre casos diagnosticados em Mosqueiro e na URE.

5 DISCUSSÃO

A estratégia global aprimorada para a redução da hanseníase implantada em 1991, conjuntamente com a distribuição da poliquimioterapia (PQT) pela Organização Mundial de Saúde (OMS), diminuiu drasticamente o número de indivíduos acometidos pela hanseníase, variando de 5 milhões de casos acumulados no mundo em meados de 1980 a pouco menos de 200 mil casos em 2015. Essa redução refletiu nas ações de controle da hanseníase uma vez que 108 países conseguiram atingir a meta estipulada pela OMS de menos de 1 caso para cada 10 000 habitantes. Contudo, além do subdiagnóstico e subnotificação possivelmente presente em diversos países em que a hanseníase já foi eliminada como problema de saúde pública ainda há 13 países considerados pela OMS como altamente endêmicos, os quais, sozinhos, acumulam cerca de 94% de todos os casos de hanseníase ainda existentes no mundo (WHO, 2015).

O Brasil é o segundo país com maior prevalência e incidência de hanseníase no mundo, contudo a hegemonia em relação ao número absoluto de crianças chama a atenção para a manutenção da cadeia de transmissão da doença pelos próximos anos (WHO, 2015). A urgência na detecção de casos novos no início da sintomatologia clínica corroborou para a implantação de campanhas mundiais de eliminação da hanseníase cujo intuito principal era diagnosticar e tratar os casos que permaneciam anteriormente ocultos na sociedade. A capacitação dos profissionais de saúde assim como a mobilização da comunidade através dos meios de

comunicação em massa (televisão, rádio, internet) contribuíram para o aumento na detecção de casos, porém a vigilância clínica através da busca ativa por equipes altamente treinadas tem auxiliado mais diretamente e quantitativamente na identificação de casos com manifestações iniciais da doença (BARRETO et al., 2015; WHO, 2015).

Crianças com hanseníase são indício de doença recente e de transmissão ativa e contínua dentre os indivíduos próximos, especialmente àqueles que compartilham as mesmas condições de vida e ambiente residencial (BARRETO et al., 2014; DOGRA et al., 2014). No Brasil, o Pará foi o estado que evidenciou o maior número absoluto de casos de hanseníase em menores de 15 anos no ano de 2013 (n=455) alertando para a necessidade da avaliação clínica de crianças e seus comunicantes para a identificação dos possíveis focos de transmissão da doença (SINAN).

A busca ativa em escolares tornou-se mais uma estratégia para a determinação de focos ativos e da eficiência dos programas de eliminação da hanseníase em uma localidade. No presente estudo, 63 escolares (8.9%) foram diagnosticados após a avaliação clínica de apenas 705 indivíduos em 4 diferentes escolas. Além disso, ao se visitar a residência daqueles classificados como casos novos foram detectados mais 41 pessoas (21.6%) com sinais e sintomas condizentes com a hanseníase. A alta endemicidade oculta do distrito de Mosqueiro, comprovada pelo diagnóstico de cerca de 11.6% do total de indivíduos do estudo reforça que os dados registrados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) estão subestimando a real gravidade da doença no local uma vez que a taxa de incidência registrada em 2013 foi de 14.1 casos novos para cada 10 000 habitantes, comparativamente inferior ao observado (SALGADO et al., 2016).

Analisando a série histórica da incidência de Mosqueiro nós observamos que houve uma grande variabilidade no número de casos detectados entre 2001 a 2014 (FIG 5) obtendo-se uma média de 6 casos/ano, com exceção de 2004 em que houve um aumento abrupto e pontual no total de casos novos diagnosticados (n = 48) provavelmente decorrente à primeira campanha publicitária de grande porte e em nível nacional de combate à hanseníase (SINAN). Esse dado reforça a alta endemicidade da doença em Mosqueiro e que o grande quantitativo de

casos diagnosticados pela nossa equipe foram apenas alguns dos diversos focos ativos ocultos existentes no local.

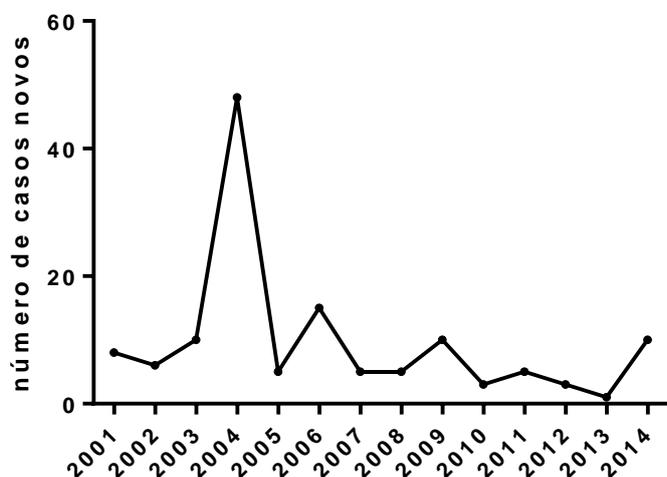


FIG 7 Série histórica de casos novos no distrito de Mosqueiro no período de 2001 a 2014 (Fonte: SINAN).

Trabalhos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa em alguns municípios do estado do Pará evidenciaram um alto percentual de casos entre escolares e seus contatos intradomiciliares que estavam anteriormente sem diagnóstico e permaneciam ocultos à sociedade. Foi observado uma heterogeneidade de acordo com o município avaliado, obtendo-se uma variação no quantitativo de casos novos de 3.4% no Acará a 13.4% em Senador José Porfírio. Quantitativamente em Mosqueiro a situação epidemiológica resultante da busca ativa foi semelhante ao observado pelo nosso grupo nas demais cidades do estado, contudo, os coordenadores regionais de controle a hanseníase não aceitaram o diagnóstico realizado pela nossa equipe e então uma nova equipe de saúde foi encaminhada para uma averiguação dos casos diagnosticados. Do total de 104 casos identificados pela nossa ação de busca ativa apenas 69 foram revisitados e destes apenas 13 foram rediagnosticados como sendo casos de hanseníase, permanecendo os demais 91 casos sem tratamento e, conseqüentemente, com ativa transmissão do *M.leprae* (SALGADO et al., 2016).

Apesar da hanseníase ser uma doença antiga com apresentação clínica bem estabelecidas, o diagnóstico da doença, sobretudo nos estágios iniciais, ainda permanece como um desafio (VISSCHEDIJK et al., 2000). A ausência de testes laboratoriais que identifiquem todas as formas da hanseníase, bem como os indivíduos com infecção subclínica ou latente,

permanece como o maior obstáculo para a quebra da continuidade da transmissão do *M.leprae* (BAHMANYAR et al., 2016; GELUK et al., 2013). Testes imunológicos baseados na detecção de anticorpos têm sido investigados utilizando diferentes antígenos específicos do patógeno, incluindo o ND -O-BSA (DUTHIE et al., 2007, 2011; GELUK et al., 2013; QIONG-HUA et al., 2013; SPENCER et al., 2012; WEN et al., 2014), LID-1 (DUTHIE et al., 2007, 2010; GELUK; DUTHIE; SPENCER, 2011; QIONG-HUA et al., 2013) e NDO-LID (CARDOSO et al., 2013; DUTHIE et al., 2014; FABRI et al., 2015; WEN et al., 2014) que foram os biomarcadores usados no presente estudo.

Em relação ao perfil de produção dos anticorpos, verificou-se semelhança entre o anti-ND-O-BSA e o anti-NDO-LID uma vez que ambos induziram resposta imune humoral mais exacerbada nos casos e seus contatos intradomiciliares do que em escolares. Estudos anteriores demonstraram que títulos do anticorpo anti-PGL-I em escolares são semelhantes ao dos indivíduos que convivem diariamente com os pacientes (contato intradomiciliar), indicando que há alta circulação do bacilo na comunidade (BARRETO et al., 2012; OSKAM; SLIM; BÜHRER-SÉKULA, 2003). Diferentemente, no presente estudo nós encontramos um sutil aumento dos anticorpos anti-ND-O-BSA e anti-NDO-LID nos contatos intradomiciliares sem hanseníase comparado aos escolares também sem hanseníase. Esse dado não minimiza a presença do *M.leprae* na população em geral visto que o percentual de soroprevalência do anti-ND-O-BSA entre escolares é bastante elevado.

Da mesma forma, o antígeno ND-O-LID também foi capaz de diferenciar os indivíduos com hanseníase daqueles que não apresentavam manifestações clínicas da doença (escolares sadios), porém com um percentual de soroprevalência inferior ao observado para o ND-O-BSA (Tabela 2). Um estudo realizado por CARDOSO et al., 2013 também demonstrou que o NDO-LID foi capaz de detectar os indivíduos doentes, contudo nenhum indivíduo controle endêmico foi positivo para o teste rápido NDO-LID, enquanto que 21.2% dos escolares sadios do nosso estudo - que também podem ser considerados como controles endêmicos - foram positivos para a sorologia deste antígeno.

O marcador sorológico LID-1 demonstrou semelhança no perfil de produção de anticorpos para todos os grupos avaliados no estudo, decorrente de sua baixa soropositividade. Em um estudo realizado em Cajaneiras/Paraíba cerca de 20% da população em geral induziu resposta imunológica humoral específica para o LID-1, demonstrando uma alta taxa de falsos positivos na comunidade a qual foi referida como um indicador de infecção subclínica e fator

de risco para o desenvolvimento da hanseníase (SOUZA et al., 2014). Apesar da soroprevalência para o LID-1 entre escolares (4%) e contatos intradomiciliares (8.7%) coincidirem com o percentual de casos encontrados através do exame clínico pelo nosso grupo de pesquisa, estudos de seguimento estão sendo realizados para avaliar a real relevância desse marcador como um indicador de risco para a hanseníase.

A baixa capacidade de detecção de anticorpos anti-LID-1 em contatos intradomiciliares, também verificada em trabalhos anteriores, pode estar relacionada com a capacidade da molécula em induzir aumento da reatividade sorológica em indivíduos que irão se tornar casos novos após 6 a 8 meses (AMORIM et al., 2016; DUTHIE et al., 2007; HUNGRIA et al., 2012). Se o aumento da soroprevalência anti-LID-1 de fato estiver relacionado com a evolução para a sintomatologia clínica da doença esta molécula auxiliará no diagnóstico precoce da hanseníase, porém é necessário o acompanhamento de um grande quantitativo de contatos intradomiciliares para a confirmação dessa hipótese.

Apesar de haverem divergências no conceito de infecção subclínica e na relevância da sorologia para a determinação da taxa de infecção e endemia de uma comunidade (FROTA et al., 2010; PENNA et al., 2016), nossos dados reforçam a hipótese de que a quantificação de anticorpos pode ser um indicativo de endemicidade uma vez que mesmo os escolares sadios e que não reportaram convívio com casos de hanseníase apresentavam soropositividade para os marcadores testados (anti-ND-O-BSA: 68.4%; anti-LID-1: 4% e anti-NDO-LID:20.1%), reforçando que a presença de anticorpos anti-*M.leprae* no soro de indivíduos não doentes é apenas um indicativo de que este entrou em contato com o microorganismo, estando este infectado porém sem estar doente. Esta característica de alta infectividade e baixa patogenicidade do *M.leprae* é o que resulta no fato de que apenas 10-20% dos infectados evoluem para a doença (ROTBERG, 1937).

Contatos intradomiciliares, especialmente de pacientes MB, são considerados como sendo os indivíduos com maior risco de desenvolver a hanseníase devido serem, possivelmente, portadores de infecção subclínica (GOULART et al., 2008; SALES et al., 2011). Fatores genéticos e condições de vida semelhantes (alimentação; saneamento; acesso a saúde; hiperconcentração de indivíduos em um mesmo ambiente) conjuntamente com o convívio prolongado com um indivíduo altamente bacilífero são alguns dos fatores que tornam os contatos intradomiciliares cerca de 4 a 10 vezes mais propensos a evoluírem ou serem diagnosticados concomitantemente com o caso índice do que a comunidade em geral e, em

decorrência disto, devem ser os alvos dos programas de saúde que visam eliminar os focos de transmissão do *M.leprae* (CARVALHO et al., 2015; FINE et al., 1997) .

Os biomarcadores testados evidenciaram que há uma maior produção dos anticorpos anti-ND-O-BSA e anti-NDO-LID nos contatos intradomiciliares sem sintomatologia clínica do que os escolares na mesma condição, reforçando que o convívio prolongado com um doente contribui para o aumento na titulação de anticorpos e para um risco aumentado de adoecer entre estes indivíduos (BARRETO et al., 2011; CARVALHO et al., 2015; DOUGLAS et al., 2004). A sorologia associada ao exame clínico de escolares e contatos intradomiciliares é uma forma eficaz para a detecção dos casos de hanseníase ocultos na comunidade (BARRETO et al., 2012; BEERS; HATTA; KLATSER, 1999; FOWDEN et al., 2016; NORMAN et al., 2004).

Avaliando o perfil de produção dos anticorpos testados entre os casos de hanseníase identificados a partir da ação de busca ativa de Mosqueiro (diagnóstico precoce) e os casos obtidos a partir de demanda espontânea na Unidade de Referência em Dermatologia “Dr. Marcello Candia” - URE (diagnóstico tardio) nós verificamos que houve uma destacada diferenciação sorológica entre os MB precoces em relação aos MB tardios, além disso, não houve distinção entre os PB e MB diagnosticados em campo devido a maioria dos MB serem DT que é uma forma clínica instável com predominância da imunidade celular e, conseqüentemente, com níveis de anticorpos semelhante aos PB. Ambos os dados ratificam que a busca ativa de casos novos contribuiu para a identificação de indivíduos em estágios iniciais da doença, semelhante ao observado em trabalhos anteriores (BARRETO et al., 2012; MOURA et al., 2013).

Uma ferramenta bastante utilizada para avaliar o desempenho de um teste diagnóstico é a curva ROC, visto que determina a associação entre os pacientes com resultado positivo (sensibilidade) e o quantitativo de indivíduos não doentes com resultado indesejadamente positivo (especificidade) (HAJIAN-TILAKI, 2013). Desse modo, foi verificado que os antígenos utilizados no estudo evidenciaram valores de área bastante satisfatórios para um teste diagnóstico quando aplicado aos pacientes com manifestações clínicas tardias, semelhante ao observado na literatura para o NDO-LID (AMORIM et al., 2016; CARDOSO et al., 2013). Entretanto, para os pacientes em estágios iniciais da doença houve um comprometimento da utilização dessas moléculas como ferramenta para a detecção exclusivamente dos indivíduos doentes uma vez que muitos indivíduos sem sintomas clínicos produzem anticorpos contra esses antígenos.

Em relação ao perfil de sensibilidade das moléculas verificou-se que o ND-O-BSA tanto para pacientes com diagnóstico precoce (75%) como tardio (76%) foi bastante satisfatório uma vez que foi capaz de identificar a maioria dos pacientes que estavam com a doença, entretanto devido a alta endemicidade da hanseníase no local e da baixa especificidade da molécula muitos indivíduos sadios também produziram anticorpos contra o antígeno ND-O-BSA, comprometendo portanto sua utilidade como uma ferramenta diagnóstica. Apesar dessa limitação, até o momento a titulação de anticorpos anti-PGL-I tem sido o método sorológico mais adequado para a identificação de indivíduos com maior risco de adoecimento, podendo inclusive auxiliar no monitoramento de microrregiões principalmente quando associado a outros métodos como o georreferenciamento (BARRETO et al., 2011, 2015; OSKAM; SLIM; BÜHRER-SÉKULA, 2003).

Em contrapartida, a molécula NDO-LID exibiu uma baixa capacidade de detecção de casos novos com diagnóstico precoce (34%), todavia, sua especificidade de 78% contribuiu para uma maior acurácia do teste (73%), podendo contribuir para uma maior otimização das equipes de saúde no diagnóstico da hanseníase em campo, visto que devido ao baixo quantitativo de falsos positivos para esse marcador torna-se necessário avaliar clinicamente apenas 6 indivíduos NDO-LID positivo para se detectar um caso novo. Diferentemente do observado para os casos precoces, a sensibilidade desse antígeno para os casos tardios foi relativamente satisfatória (76%) indicando que há uma limitação na titulação do NDO-LID entre os PB e MB da forma clínica DT (31% e 36% respectivamente de soropositividade). Estudos anteriores demonstraram perfis de sensibilidade e especificidade superiores aos nossos dados, revelando uma potencial aplicabilidade do NDO-LID para o diagnóstico precoce da hanseníase, contudo nestes trabalhos foram utilizados apenas pacientes provenientes de centros de atendimento a saúde, os quais captam os casos através de demanda espontânea que é considerada como sendo um diagnóstico tardio (AMORIM et al., 2016; CARDOSO et al., 2013; DUTHIE et al., 2014).

As análises de validação diagnóstica relacionadas ao LID-1 assinalaram-o como sendo o biomarcador com melhor acurácia (85%), auxiliando portanto em uma melhor diferenciação sorológica entre indivíduos doentes e não doentes (escolares e contatos intradomiciliares sadios). A alta especificidade do LID-1 tanto para a população avaliada na URE quanto em Mosqueiro (100% e 95% respectivamente) sugeriu uma potencial aplicabilidade da molécula para a triagem sorológica, visto que poucos indivíduos sem a doença foram soropositivos. Estudos de seguimento prospectivo estão sendo realizados a fim de mensurar a real relevância

da molécula na identificação de indivíduos assintomáticos com alto risco de adoecimento. A habilidade do LID-1 de ser reconhecido apenas por uma pequena parcela dos indivíduos saudáveis também foi evidenciada em estudos anteriores, exibindo variações de especificidade de 42% na Paraíba à 80% no Rio Grande do Norte, de acordo com a população avaliada (AMORIM et al., 2016; SOUZA et al., 2014).

Contudo, apesar da alta especificidade e acurácia diagnóstica, o LID-1 demonstrou uma baixíssima sensibilidade (5.7%), refletindo em uma capacidade diminuída para a identificação de doentes em estágio inicial da doença, principalmente das formas PB haja vista que 83.3% dos casos soropositivos para o LID-1 eram MB (5 de 6 casos). A dificuldade na identificação de marcadores da imunidade humoral em pacientes PB é comum para a maioria dos antígenos testados (DUTHIE et al., 2007, 2008; SPENCER et al., 2011) em virtude do perfil de resposta imunológica predominante nesta forma clínica ser do tipo celular que acarreta em uma menor produção de anticorpos anti-*M.leprae* específicos (MISCH et al., 2010; NATH; SAINI; VALLURI, 2015). Entretanto, trabalhos anteriores demonstram que a taxa de detecção do anti-LID-1 para pacientes de hanseníase (PB e MB) é superior ao observado em nossos dados (AMORIM et al., 2016; FABRI et al., 2015; SOUZA et al., 2014). Essa discordância é provavelmente decorrente do tipo de paciente utilizado nos estudos, visto que a sensibilidade para os casos tardios utilizado em nosso trabalho foi de 64%, próximo ao percentual verificado na literatura citada acima.

Um teste diagnóstico ideal para a hanseníase deverá abranger indivíduos infectados subclínicamente pelo *M.leprae* e que certamente irão evoluir para as manifestações clínicas da doença, além de indubitavelmente detectar também os indivíduos já sintomáticos para a patologia (BAHMANYAR et al., 2016). Dessa maneira, devido a diversas doenças evidenciarem dificuldades para o estabelecimento de um teste ideal em que se obtenha acurácia, sensibilidade e especificidade de 100% torna-se uma boa alternativa utilizar um teste com alta sensibilidade conjuntamente com um segundo teste que possua uma boa especificidade (LALKHEN; RCA; MCCLUSKEY, 2008; PEELING; SMITH; BOSSUYT, 2008). Nesse sentido, de acordo com nossos dados as moléculas ND-O-BSA e LID-1 exibiram aplicabilidades diferentes, contudo ambas com vantagens na detecção de casos novos.

6 CONCLUSÕES

- A.** A alta soroprevalência de anticorpos anti-ND-O-BSA entre estudantes sugere a existência de focos ativos de hanseníase ainda não localizados. Estes dados coincidem com a alarmante endemia oculta observada na população estudada.
- B.** Pacientes multibacilares diagnosticados tardiamente exibiram títulos de anticorpos anti-ND-O-BSA, anti-LID-1 e anti-NDO-LID destacadamente superior aos pacientes identificados durante o trabalho de busca ativa, reforçando a importância do rastreamento de casos na comunidade para o diagnóstico precoce da hanseníase.
- C.** Nenhum dos biomarcadores avaliados apresentou sensibilidade capaz de identificar todos os casos novos de hanseníase, sejam eles precocemente ou tardiamente diagnosticados.
- D.** O anticorpo anti-LID-1 apresentou uma alta especificidade para hanseníase, sugerindo uma potencial utilidade em atividades de triagem sorológica para a identificação de sujeitos assintomáticos com alto risco de adoecimento. O acompanhamento prospectivo destes sujeitos está sendo realizado neste momento por nosso grupo de pesquisa.
- E.** A elevada acurácia diagnóstica do LID-1 indica uma possível efetividade do marcador sorológico como alvo para a diferenciação entre indivíduos doentes ou que irão adoecer daqueles sem manifestação clínica de hanseníase. Estudos subsequentes estão sendo realizados.

A implementação de um biomarcador como teste sorológico que consiga isoladamente detectar todas as formas clínicas da hanseníase ainda não se tornou possível a partir dos nossos dados, contudo a molécula LID-1 revelou uma potencial utilidade na triagem dos indivíduos com maior risco de desenvolver a doença. Os assintomáticos anti-LID-1 positivos estão sendo acompanhados para a confirmação da relevância diagnóstica do biomarcador.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMORIM, F. M. et al. Identifying Leprosy and Those at Risk of Developing Leprosy by Detection of Antibodies against LID-1 and LID-NDO. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, p. 1–17, 2016.

BAHMANYAR, E. R. et al. Leprosy Diagnostic Test Development As a Prerequisite Towards Elimination : Requirements from the User's Perspective. **PLoS neglected tropical diseases**, p. 1–7, 2016.

BARRETO, J. G. et al. Anti-PGL-I seroepidemiology in leprosy cases: household contacts and school children from a hyperendemic municipality of the Brazilian Amazon. **Leprosy review**, v. 82, n. 4, p. 358–70, dez. 2011.

BARRETO, J. G. et al. High rates of undiagnosed leprosy and subclinical infection amongst school children in the Amazon Region. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 1999, p. 60–67, 2012.

BARRETO, J. G. et al. Spatial analysis spotlighting early childhood leprosy transmission in a hyperendemic municipality of the Brazilian Amazon region. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 2, p. e2665, fev. 2014.

BARRETO, J. G. et al. Spatial epidemiology and serologic cohorts increase the early detection of leprosy. **BMC infectious diseases**, v. 15, n. 1, p. 527, 2015.

BARROW, W. W.; ULLOM, B. P.; BRENNAN, P. J. Peptidoglycolipid Nature of the Superficial Cell Wall Sheath of Smooth-Colony-Forming Mycobacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 144, n. 2, p. 814–822, 1980.

BEERS, S. VAN; HATTA, M.; KLATSER, P. R. Seroprevalence Rates of Antibodies to Phenolic Glycolipid-I Among School Children as an Indicator of Leprosy Endemicity. **International Journal of Leprosy**, v. 67, n. 3, p. 243–249, 1999.

BHAT, R. M.; PRAKASH, C. Leprosy: an overview of pathophysiology. **Interdisciplinary perspectives on infectious diseases**, v. 2012, p. 181089, jan. 2012.

BRENNAN, P. J.; VISSA, V. D. Genomic evidence for the retention of the essential mycobacterial cell wall in the otherwise defective *Mycobacterium leprae*. **Leprosy Review**, v. 72, n. 4, p. 415–428, 2001.

BÜHRER-SÉKULA, S. et al. Simple and Fast Lateral Flow Test for Classification of Leprosy Patients and Identification of Contacts with High Risk of Developing Leprosy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 5, p. 1991–1995, 2003.

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

CARVALHO, A. P. M. et al. Factors associated with anti-phenolic glycolipid-I seropositivity among the household contacts of leprosy cases. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 219, 2015.

DOGRA, S. et al. Childhood leprosy through the post-leprosy- elimination era : a retrospective analysis of epidemiological and clinical characteristics of disease over eleven years from a tertiary care hospital in North India. **Leprosy Review**, v. 29, p. 296–310, 2014.

DOUGLAS, J. T. et al. Prospective Study of Serological Conversion as a Risk Factor for Development of Leprosy among Household Contacts. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 11, n. 5, p. 897–900, 2004.

DUTHIE, M. S. et al. Use of Protein Antigens for Early Serological Diagnosis of Leprosy. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 11, p. 1400–8, nov. 2007.

DUTHIE, M. S. et al. Selection of antigens and development of prototype tests for point-of-care leprosy diagnosis. **Clinical and vaccine immunology : CVI**, v. 15, n. 10, p. 1590–7, out. 2008.

DUTHIE, M. S. et al. Rational Design and Evaluation of a Multiepitope Chimeric Fusion Protein with the Potential for Leprosy Diagnosis. **Clinical and vaccine immunology**, v. 17, n. 2, p. 298–303, fev. 2010.

DUTHIE, M. S. et al. Insight toward Early Diagnosis of Leprosy through Analysis of the Developing Antibody Responses of Mycobacterium leprae-Infected Armadillos. **Clinical and vaccine immunology**, v. 18, n. 2, p. 254–9, fev. 2011.

DUTHIE, M. S. et al. Rapid Quantitative Serological Test for Detection of Infection with Mycobacterium leprae , the Causative Agent of Leprosy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 613–619, 2014.

FABRI, A. D. C. O. C. et al. Antigen-specific assessment of the immunological status

of various groups in a leprosy endemic region. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 1–9, 2015.

FINE, P. E. M. et al. Household and Dwelling Contact as Risk Factors for Leprosy in Northern Malawi. **American Journal of Epidemiology**, v. 146, n. 1, 1997.

FOWDEN, K. et al. The prevalence of leprosy in school-students and evaluation of school-based screening for leprosy : A Systematic Review. **Leprosy Review**, v. 87, p. 276–293, 2016.

FROTA, C. C. et al. Seropositivity to anti-phenolic glycolipid-I in leprosy cases, contacts and no known contacts of leprosy in an endemic and a non-endemic area in northeast Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 104, p. 490–495, 2010.

GARNIER, T. et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. **Nature**, v. 409, p. 1007–1011, 2001.

GELUK, A. et al. Postgenomic Approach To Identify Novel Mycobacterium leprae Antigens with Potential To Improve Immunodiagnosis of Infection. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 9, p. 5636–5644, 2005.

GELUK, A. et al. New Biomarkers with Relevance to Leprosy Diagnosis Applicable in Areas Hyperendemic for Leprosy. **Journal of immunology**, v. 188, n. 10, p. 4782–4791, 2013.

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

GOULART, I. M. B. et al. Risk and protective factors for leprosy development determined by epidemiological surveillance of household contacts. **Clinical and vaccine immunology : CVI**, v. 15, n. 1, p. 101–5, jan. 2008.

GOULART, I. M. B.; GOULART, L. R. Leprosy: Diagnostic and control challenges for a worldwide disease. **Archives of Dermatological Research**, v. 300, n. 6, p. 269–290, 2008.

HAJIAN-TILAKI, K. Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve Analysis for Medical Diagnostic Test Evaluation. **Caspian Journal International Medicine**, v. 4, n. 2, p. 627–635, 2013.

HART, B. E.; TAPPING, R. I. Genetic Diversity of Toll-Like Receptors and Immunity to *M. leprae* Infection. **Journal of tropical medicine**, v. 2012, p. 415057, jan. 2012.

HUNGRIA, E. M. et al. Seroreactivity to new *Mycobacterium leprae* protein antigens in different leprosy-endemic regions in Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. SUPPL.1, p. 104–111, 2012.

LALKHEN, A. G.; RCA, C.; MCCLUSKEY, A. Clinical tests : sensitivity and specificity. **Continuing Education in Anesthesia, Critical Care and Pain**, v. 8, n. 6, p. 221–223, 2008.

MISCH, E. A et al. Leprosy and the Human Genome. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 74, n. 4, p. 589–620, dez. 2010.

MOURA, M. L. N. et al. Active Surveillance of Hansen's Disease (Leprosy): Importance for Case Finding among Extra-domiciliary Contacts. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 3, p. 1–7, 2013.

NATH, I.; SAINI, C.; VALLURI, V. L. Immunology of leprosy and diagnostic challenges. **Clinics in Dermatology**, v. 33, p. 90–98, 2015.

NORMAN, G. et al. Leprosy case detection using schoolchildren. **Leprosy Review**, v. 75, p. 34–9, 2004.

OSKAM, L.; SLIM, E.; BÜHRER-SÉKULA, S. Serology: recent developments, strengths, limitations and prospects: a state of the art overview. **Leprosy review**, v. 74, p. 196–205, 2003.

PEELING, R. W.; SMITH, P. G.; BOSSUYT, P. M. M. EVALUATING DIAGNOSTICS A guide for diagnostic evaluations. **Nature Publishing Group**, v. 6, n. 11, p. S2–S6, 2008.

PENNA, M. L. F. et al. Anti-PGL-1 Positivity as a Risk Marker for the Development of Leprosy among Contacts of Leprosy Cases : Systematic Review and Meta- analysis. **PLoS neglected tropical diseases**, p. 1–11, 2016.

PINHEIRO, R. et al. *Mycobacterium leprae*–host-cell interactions and genet. **Future Microbiol**, v. 6, n. 2, p. 217–230, 2011a.

PINHEIRO, R. O. et al. *Mycobacterium leprae*–host-cell interactions and genetic determinants in leprosy: an overview. **Future Microbiology**, v. 6, n. 2, p. 217–230, 2011b.

QIONG-HUA, P. et al. Early revelation of leprosy in china by sequential antibody analyses with LID-1 and PGL-I. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2013, 2013.

REECE, S. T. et al. ML0405 and ML2331 Are Antigens of Mycobacterium leprae with Potential for Diagnosis of Leprosy. **Clinical and vaccine immunology**, v. 13, n. 3, p. 333–340, 2006.

RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. Classification of Leprosy According to Immunity: A five-group system. **International Journal of Leprosy**, v. 31, n. 3, p. 21, 1966.

ROTBURG, A. Fiftieth Anniversary of the “N-factor/Hansen-anegetic Fringe” Hypothesis for Hanseniasis. **International Journal of Leprosy**, v. 57, n. 4, p. 7–9, 1937.

SALES, A. M. et al. Leprosy among Patient Contacts: A Multilevel Study of Risk Factors. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 5, n. 3, p. e1013, jan. 2011.

SALGADO, C. G. et al. What do we actually know about leprosy worldwide? **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 7, p. 778, 2016.

SINGH, P.; COLE, S. T. Mycobacterium leprae - genes, pseudogenes and genetic diversity. **Future Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 57–71, 2011.

SOUZA, M. M. et al. Utility of recombinant proteins LID-1 and PADL in screening for Mycobacterium leprae infection and leprosy. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 108, n. June, p. 495–501, 2014.

SPENCER, J. S. et al. Analysis of Antibody Responses to Mycobacterium leprae Phenolic Glycolipid I, Lipoarabinomannan, and Recombinant Proteins to Define Disease Subtype-Specific Antigenic Profiles in Leprosy. **Clinical and vaccine immunology : CVI**, v. 18, n. 2, p. 260–7, fev. 2011.

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

VISSCHEDIJK, J. et al. Review: Mycobacterium leprae - Millennium resistant! Leprosy control on the threshold of a new era. **Tropical Medicine and International Health**, v. 5, n. 6, p. 388–399, 2000.

WEN, Y. et al. Evaluation of Novel Tools to Facilitate the Detection and Characterization of Leprosy Patients in China. **BioMed Research International**, v. 2014,

2014.

WHO. Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire. **World Health Organization**, n. 36, p. 461–476, 2015.

ZENHA, E. M. R. et al. Clinical and immunological evaluation after BCG-id vaccine in leprosy patients in a 5-year follow-up study. **Journal of Inflammation Research**, v. 5, n. 1, p. 125–135, 2012.