

TÂNIA MARA PIRES MORAES

**AVALIAÇÃO SOROLÓGICA DOS ANTÍGENOS MICOBACTERIANOS ND-O-
BSA, LID-1 E NDO-LID EM PACIENTES COM HANSENÍASE, CONTATOS
INTRADOMICILIARES E ESTUDANTES DE UM MUNICÍPIO
HIPERENDÊMICO DA AMAZÔNIA BRASILEIRA**

Belém - PA

2014

TÂNIA MARA PIRES MORAES

**AVALIAÇÃO SOROLÓGICA DOS ANTÍGENOS MICOBACTERIANOS ND-O-
BSA, LID-1 E NDO-LID EM PACIENTES COM HANSENÍASE, CONTATOS
INTRADOMICILIARES E ESTUDANTES DE UM MUNICÍPIO
HIPERENDÊMICO DA AMAZÔNIA BRASILEIRA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Neurociências e Biologia Celular.

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. John Stewart Spencer
Colorado State University – CSU, USA

Belém - PA

2014

A Minha querida mãe Maria Genildes (em memória)

A minha querida segunda mãe, Hilda Queiroz

E a minha princesa Maria Clara

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela presença constante em minha vida, por me fazer acreditar que tudo iria dar certo, por colocar sempre cuidadosamente “anjos” no lugar certo e no momento certo.

Ao professor Dr. Claudio Guedes Salgado pela orientação e paciência ao longo desses anos. Os ensinamentos foram essenciais e vou levar para sempre para minha vida profissional e pessoal.

Às seguintes instituições que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho: Universidade Federal do Pará, Unidade de Referência Especializada em Dermatologia Sanitária (URE Marcello Candia – SESPA), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP), Instituto Lauro de Souza Lima (ILSL), *Colorado State University*, Ordem de Malta (MALTALEP), Departamento de Ciência e Tecnologia da Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos do Ministério da Saúde do Brasil (DECIT), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação Amazônia Paraense.

Ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia celular e as secretárias do programa pela paciência e compreensão.

Aos colegas do Laboratório de Dermato-imunologia: Daniella, Heleno, Denis, Patrícia, Suellen e Amanda. Aos colaboradores, Érica, Marcos, André, Silvia, Raimundinho pelo carinho e agradáveis momentos de descontração que vivemos. Agradeço especialmente à Giselle, Érica que muito me ajudaram na realização dos ELISA e a Angélica pelo apoio imprescindível nos experimentos, discussões e sugestões acerca deste tema.

Aos alunos de iniciação científica pelo apoio, incentivo e principalmente por tornarem a nossa convivência alegre. Especialmente a Naila, que muitas vezes me auxiliou no laboratório.

Agradeço imensamente ao Dr. John Spencer pelas valiosas contribuições e por mostrar nas suas atitudes que mesmo sendo um excelente pesquisador, a humildade engrandece o ser

humano, pois sempre tratou todas as pessoas do LDI com respeito e carinho. Agradeço ainda por se mostrar tão sensível com a hanseníase em nosso país.

Ao casal Moises Silva e Simone Campelo, primeiramente por terem me recebido carinhosamente no LDI, por terem me apoiado em um momento muito especial da minha vida e pelos momentos agradáveis que vivemos. Obrigada também Moises, pela significativa contribuição com os inúmeros ELISA e todo apoio concedido durante esta trajetória.

Ao professor Dr. Josafá Barreto pelas valiosas orientações, pelas inúmeras leituras e importantíssimas contribuições para este trabalho. Você é um grande exemplo de disciplina, dedicação e determinação.

À minha mãe Maria (em memória) e a meu pai Francisco por me incentivarem sempre a estudar e por terem dedicado toda sua vida ao trabalho para possibilitar que seus filhos tivessem a oportunidade de realizar seus sonhos. Mãezinha, onde você estiver sei que está orgulhosa de mim. Obrigada por tudo. Amo vocês!!!

Aos meus irmãos que tanto amo, Francisco, Ana Lúcia, José Luiz, Waldiney, Eugênio, Benedito e Eliney pelo apoio, incentivo e carinho, mesmo a distância. Agradeço especialmente ao Waldiney por ter me direcionado sempre ao melhor caminho e por me apoiar em todos os momentos da minha vida. Agradeço carinhosamente também a todos os meus sobrinhos pela força e carinho.

Agradeço a minha querida e segunda mãe tia Hilda, por me incentivar, ouvir meus desabafos, me aconselhar, por estar sempre tão presente e me dar apoio e carinho. Agradeço especialmente por ser a mãe da Maria Clara nos momentos que precisei me ausentar.

À minha princesa Maria Clara por me encher de amor, carinho e por entender a minha ausência. Obrigada por ser minha fonte inesgotável de força e esperança. Te amo incondicionalmente, minha flor!!!

Ao Richelmy Oliveira pela compreensão, carinho e dedicação ao longo desta trajetória. Obrigada por compartilhar comigo o amor, a responsabilidade e o cuidado do nosso bem mais precioso.

Às amigas, Daniella, Kariane, Margareth, Larissa, Glaécia, Ingrid, Rosane, Juci, Marina, Luana, Keila pelas contribuições e por mantermos uma amizade sincera e duradoura. Espero nunca me perder de vocês amigas, pois amigos são tesouros com valor inestimável.

À Eliana Yuki, pela oportunidade, compreensão, confiança e carinho. Obrigada por sempre me compreender nos momentos que precise me ausentar. No final de tudo, ficou uma bela amizade.

Agradeço de forma muito especial a minha ex-monitora e aluna Aline Alves que me auxiliou em um momento muito conturbado e sem esperar nada em troca. Obrigada Aline, seu gesto ficará guardado na minha memória e no meu coração.

Agradeço também às pessoas que aceitaram a participar deste estudo, especialmente aquelas que foram diagnosticadas com hanseníase e ainda mais especialmente as crianças. Espero que esta pesquisa ajude de alguma forma a contribuir para o entendimento desta doença que acomete tantas pessoas.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a construção deste trabalho, pois este não é resultado apenas de um esforço individual, mas de significativas contribuições que obtive durante minha trajetória profissional, acadêmica e pessoal de cada uma das pessoas que foram fundamentais a essa construção.

“Quanto mais aumenta nosso conhecimento, mais evidente fica nossa ignorância”.

John F. Kennedy

RESUMO

Apesar dos esforços para sua eliminação como problema de saúde pública, a hanseníase permanece com alta prevalência em alguns países, como o Brasil, sendo o Estado do Pará responsável pelo diagnóstico de aproximadamente 10% dos cerca de 400.000 casos novos do Brasil nos últimos 10 anos. Até o momento, não existe nenhum teste de diagnóstico para detectar a hanseníase nos estágios iniciais, contribuindo assim para a manutenção das altas taxas de incidência da doença. Neste sentido, novos antígenos específicos do *M. leprae* que possibilitem o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico podem facilitar a detecção precoce de casos novos e contribuir para alcançar as metas de controle da hanseníase. Neste estudo, foi realizada avaliação clínica e dermatoneurológica dos participantes para a detecção de casos novos e foram coletadas amostras de sangue para pesquisa de anticorpos em dois momentos diferentes, T1 e T2, em um intervalo de tempo de 2 anos entre os mesmos. Os anticorpos IgM anti-ND-O-BSA e IgG anti-LID-1 foram detectados por ELISA, além de anti-IgM e anti-IgG associados para a pesquisa de anti-NDO-LID em amostras de plasma, também por ELISA ou sangue total pelo teste rápido OrangeLife[®] (OL) de 79 pessoas com hanseníase, 131 contatos e 331 estudantes do município de Breves, Estado do Pará. Nossos resultados mostraram alta incidência de hanseníase de 18,6% e 6,1% em contatos e estudantes respectivamente em T1 e de 19,8% e 9,4% em T2 e neste momento, entre contatos, foram positivos 44,3% para anti-ND-O-BSA, 7,86% para o anti-LID-1 e 37,4% para o anti-NDO-LID e para estudantes foram 49,5% para o anti-ND-O-BSA, 5,1% para o anti-LID-1 e 45% para o anti-NDO-LID. A associação entre os antígenos mostrou uma forte correlação para o ND-O-BSA e NDO-LID. A positividade para o OL em casos novos foi de 44,3% para MB, a maioria BT, em estudantes foi 47,4% e em contatos foi de 36,3%, com baixa concordância com ELISA anti-NDO-LID. No seguimento (T2), o percentual de casos novos foi de 35% e o maior percentual foi identificado entre indivíduos positivos para anti-ND-O-BSA. Os dados mostram alta incidência em contatos e estudantes através de busca ativa e seguimento sorológico, e concluímos que o antígeno ND-O-BSA se mostrou mais sensível no ensaio de ELISA para a identificação de casos novos em populações endêmicas.

Palavras-chave: Hanseníase. Sorologia Anti-ND-O-BSA, anti-LID-1 e anti-NDO-LID.

ABSTRACT

Despite efforts for its elimination as a public health problem, leprosy remains highly prevalence in some countries, including Brazil, specially in the state of Pará, which accounts for approximately 10% of the 400,000 new cases in Brazil during the last 10 years. To date, there is no diagnostic test to detect leprosy in its early stages, thus contributing to the maintenance of high rates of disease incidence. In this sense, the Discovery of new specific antigens of *M. leprae* to enable the development of new diagnostic methods may facilitate early detection of disease prior to the onset of disfigurement and nerve damage and contribute to achieving the goals of leprosy control. In this study, dermatological clinical evaluation of the participants was performed to detect new cases and blood samples were collected for antibody screening at two different timpoints, T1 (2011) and T2 (2013), two years apart. IgM anti-ND-O-BSA and IgG anti-LID-1 titers were detected by ELISA, and anti-IgM and anti-IgG were combined for detection of both in plasma samples by ELISA or also the whole blood by OrangeLife® (OL) rapid test in 79 leprosy patients, 131 household contacts and 331 students from the municipality of Breves, Pará State. Samples collected at T1 showed a high number of new cases detected, with 18.6% of household contacts and 6.1% of students diagnosed, while two years later at T2, there were 19.8% of household contacts and 9.4% of students diagnosed. At T2, 44.3% of contacts were positive for anti-ND-O-BSA, 7.8% for anti-LID-1 and 37.4% for anti-NDO-LID. Among the students 49.5% were positive for anti-ND-O-BSA, 5.1% for anti-LID-1 and 37% for anti-NDO-LID. The association between antigens showed a strong correlation to ND-O-BSA and NDO-LID. Positivity of the OL rapide test was 44.3% for newly diagnosed MB cases (BT majority), in students was 47.4% and 36.3% in household contacts, with poor agreement with ELISA anti-NDO-LID. At follow-up (T2), the percentage of new cases was 35% and the largest number was identified among individuals positive for anti-ND-O-BSA. The data show a high incidence in contacts and students through active search and serologic follow-up, and we concluded that the antigen ND-O-BSA was more sensitive in the ELISA assay for identifying new cases in populations endemic.

Keywords: Leprosy. Serology Anti-ND-O-BSA, anti-LID-1 and anti-NDO-LID.

LISTA DE ABREVIATURAS

BCG	Bacilo Calmette-Guérin – Intradérmica
BSA	Bovine Serum Albumin
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEP-ICS/UFPA	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CNPQ	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DD	Dimorfa-dimorfa
DO	Densidade Óptica
DT	Dimorfa-tuberculóide
DV	Dimorfa-virchowiana
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FAPESPA	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará
HIV	Vírus da imunodeficiência humana/Síndrome da imunodeficiência
HSA	Human serum albumin
I	Indeterminada
IB	Índice baciloscópio
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IM	Índice morfológico
IQR	Interquartile range
LID-1	Leprosy Infectious Disease Research Institute Diagnostic-1
MB	Multibacilar
MS/SVS	Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde

ND	Natural disaccharide
ND-O-BSA	Natural disaccharide-octyl- bovine serum albumin
ND-O-HSA	Natural disaccharide-octyl- human serum albumin
NT	Natural trisaccharide
NT-P-BSA	Natural trisaccharide-propyl- bovine serum albumin
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPD	o-Phenylenediamine dihydrochloride
PB	Paucibacilar
PA	Pará
PBS	Phosphate buffered saline
PGL-I	Phenolic glycolipid I
pH	Potential hydrogen
PNCH	Programa Nacional de Controle da hanseníase
PQT	Poliquimioterapia
SESPA	Secretaria Executiva de Saúde Pública do Estado do Pará
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SVS-MS	Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde
T	Tuberculóide
T1	Primeira avaliação
T2	Segunda avaliação
UFPA	Universidade Federal do Pará
V	Virchowiana
WHO	World Health Organization

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características epidemiológicas dos estudantes, casos de hanseníase entre estudantes, seus contatos intradomiciliares e casos de hanseníase entre os contatos de acordo com gênero, faixa etária e classificação operacional da OMS em T1 e T2.

Tabela 2. Reatividade sorológica dos anticorpos anti-ND-O-BSA, anti-LID-1 e anti-NDO-LID em amostra de plasma de estudantes por ELISA.

Tabela 3. Reatividade sorológica dos anticorpos anti-ND-O-BSA, anti-LID-1 e anti-NDO-LID em amostra de plasma dos contatos dos estudantes diagnosticados com hanseníase por ELISA.

Tabela 4. Comparação entre ELISA e teste rápido para dos anticorpos anti-ND-O-BSA, anti-LID-1 e anti-NDO-LID em estudantes.

Tabela 5. Comparação entre ELISA e teste rápido para os anticorpos anti-ND-O-BSA, anti-LID-1 e anti-NDO-LID em contatos de estudantes.

Tabela 6. Comparação entre ELISA anti-NDO-LID e teste rápido OrangeLife[®] em casos novos entre estudantes e contatos intradomiciliares.

Tabela 7. Casos novos de hanseníase detectados entre indivíduos com sorologia anti-LID-1 positiva ou negativa

Tabela 8. Casos novos de hanseníase detectados entre indivíduos com sorologia anti-NDO-LID positiva ou negativa

Tabela 9. Casos novos de hanseníase detectados entre indivíduos com sorologia anti-NDO-BSA positiva ou negativa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo esquemático das moléculas constituintes da parede celular do *M. leprae*.

Figura 2. Detecção de casos novos de hanseníase no mundo em 2011, por 100.000 habitantes.

Figura 3. Prevalência da hanseníase no mundo no ano 2011, por 10.000 habitantes.

Figura 4. Dez clusters de detecção de casos de hanseníase no Brasil.

Figura 5. Resultado positivo: presença da linha controle e linha teste; resultado negativo: ausência de linha na zona de teste e presença de uma linha na zona de controle.

Figura 6. Títulos de anticorpos anti-ND-O-BSA, anti-LID-1e anti-NDO-LID em amostras de plasma dos estudantes. Cada ponto representa o valor médio da densidade óptica (DO) das amostras de plasma individuais. A linha horizontal vermelha representa a mediana de cada grupo. A linha horizontal descontínua inferior (azul) representa o cut-off ($DO \geq 0,295$) para NDO-BSA e LID-1 e a linha horizontal descontínua superior (preta) representa o cut-off ($DO \geq 0,475$) para o NDO-LID.

Figura 7. Títulos de anticorpos anti-ND-O-BSA, anti-LID-1e anti-NDO-LID nos contatos intradomiciliares. Cada ponto representa o valor médio da densidade óptica (DO) das amostras de plasma individuais. A linha horizontal vermelha representa a mediana de cada grupo. A linha horizontal descontínua inferior (azul) representa o cut-off ($DO \geq 0,295$) para NDO-BSA e LID e a linha horizontal descontínua superior (preta) representa o cut-off ($DO \geq 0,475$) para o NDO-LID.

Figura 8. Títulos de anticorpos anti-ND-O-BSA, anti-LID-1e anti-NDO-LID nos casos novos diagnosticados com hanseníase. Cada ponto representa o valor médio da densidade óptica (DO) das amostras de plasma individuais. A linha horizontal vermelha representa a mediana de cada grupo. A linha horizontal descontínua inferior (azul) representa o cut-off ($DO \geq 0,295$) para NDO-BSA e LID e a linha horizontal descontínua superior (preta) representa o cut-off ($DO \geq 0,475$) para o NDO-LID.

Figura 9. Comparação dos níveis de anticorpos anti-LID-1 em casos novos, contatos intradomiciliares e estudantes. Cada ponto representa o valor médio da densidade óptica (DO) das amostras de plasma individuais. A linha horizontal vermelha representa a mediana de cada grupo e a linha horizontal descontínua (azul) representa o cut-off (DO $\geq 0,295$) para LID-1.

Figura 10. Comparação dos níveis de anticorpos anti-NDO-LID em casos novos, contatos intradomiciliares e estudantes. Cada ponto representa o valor médio da densidade óptica (DO) das amostras de plasma individuais. A linha horizontal vermelha representa a mediana de cada grupo e a linha horizontal descontínua (preta) representa o cut-off (DO $\geq 0,475$) para NDO-LID.

Figura 11. Comparação dos níveis de anticorpos anti-ND-O-BSA em casos novos, contatos intradomiciliares e estudantes. Cada ponto representa o valor médio da densidade óptica (DO) das amostras de plasma individuais. A linha horizontal vermelha representa a mediana de cada grupo e a linha horizontal descontínua (azul) representa o cut-off (DO $\geq 0,295$) para o ND-O-BSA.

Figura 12. Correlação de Spearman entre títulos de anticorpos anti-ND-O-BSA, anti-LID-1 e anti-NDO-LID em casos novos entre estudantes e contatos intradomiciliares. Cada ponto representa a DO obtida para cada antígeno em uma única amostra de soro. A linha contínua representa a correlação dos resultados. (A) anti-ND-O-BSA x LID-1; (B) anti-LID-1 x anti-NDO-LID; (C) ND-O-BSA x NDO-LID

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	16
1.1. Hanseníase	16
1.1.1. Aspectos históricos	16
1.1.2. Características clínicas	17
1.1.3. Etiologia e aspectos morfológicos	19
1.1.4. Epidemiologia	21
1.1.5. Transmissão e patogenicidade	26
1.1.6. Diagnóstico	28
1.1.7. Tratamento	35
1.1.8. Reações hansênicas	36
2. OBJETIVO	38
2.1. Objetivo geral	38
2.2. Objetivos específicos	38
3. MATERIAIS E MÉTODO	39
3.1. Aspectos éticos	39
3.2. Desenho do estudo	39
3.3. Participantes e critérios clínicos	40
3.4. Critérios de inclusão	42
3.5. Critérios de exclusão	42
3.6. Coleta das amostras	43
3.7. Detecção do anticorpo anti-ND-O-BSA, anti-LID-1 e anti-NDO-LID	43
3.8. Teste rápido para detecção de anticorpos anti-NDO-LID	45
3.9. Análise estatística	46
4. RESULTADOS	47
5. DISCUSSÃO	60
6. CONCLUSÕES	69
7. REFERÊNCIAS	70
8. ANEXOS	78
8.1. Parecer do comitê de ética	78
8.2. Termo de consentimento livre e esclarecido	79

1. INTRODUÇÃO

1.1. Hanseníase

1.1.1. Aspectos históricos

Há relatos de que a hanseníase era conhecida há mais de três ou quatro mil anos na Índia, China e Japão, já existia no Egito quatro mil e trezentos anos antes de Cristo, segundo um papiro da época de Ramsés II (BRASIL,1960; TRAUTMAN, 1984) e de acordo com MONOT et al (2009) a doença teve origem na África, há mais de cinco mil anos. A hanseníase foi levada a Europa Oriental através dos exércitos persas e pelos romanos, assim como pelo tráfico de escravos e migração dos povos e posteriormente a doença foi espalhada na Europa pelos sarracenos e pelas cruzadas. Já no ocidente, a doença foi trazida pelos primeiros colonizadores espanhóis e portugueses (BRASIL, 1960).

Traduções da Bíblia do hebraico para o grego, 300 a.C. resultaram em muita confusão e são responsáveis por grande parte do estigma relacionado a doença, que ainda hoje existe. Relatos bíblicos de hanseníase em Levítico empregaram a palavra hebraica *tsaraath*. Este termo foi traduzido para o grego como lepra e tinha um significado religioso, implicando em punição Divina. Por isso, as pessoas com hanseníase eram vistas como impuras e pecadoras, razão pela qual eram excluídas da sociedade e mantidas isoladas das vilas, vilarejos e cidades. Entretanto, admite-se que as descrições bíblicas da hanseníase não se assemelham a doença como a conhecemos nos dias atuais (OPROMOLLA, 2000).

A hanseníase chegou ao Brasil com os primeiros colonizadores portugueses, principalmente açorianos e os escravos africanos que contribuíram bastante para sua disseminação. Entretanto, outros povos posteriormente contribuíram para a sua expansão (BRASIL, 1960). Por muitas décadas as pessoas acometidas pela hanseníase eram isoladas em

abrigos ou colônias de leprosos, afastadas das cidades e isoladas da população e da família (BRASIL, 2006).

Na tentativa de minimizar o estigma, em 1976, com a aprovação do decreto nº 165, de 14 de maio de 1976, que muda o nome de “lepra” para hanseníase, o novo termo foi adotado no Brasil, sendo amplamente empregado em documentos técnico-científicos (BRASIL, 1989). Em 1995 a Lei Federal 9.010, proíbe terminantemente, a utilização do termo “lepra” e seus derivados e o termo hanseníase se tornou oficial (OPROMOLLA *et al*, 2005)

1.1.2. Características Clínicas

A hanseníase é uma doença infectocontagiosa crônica, que afeta preferencialmente os nervos periféricos e a pele, acometendo principalmente olhos, mãos e pés (ARAÚJO, 2003; KATOCH, 2002). O comprometimento dos nervos é a principal característica da doença com elevado potencial para causar incapacidades físicas que podem evoluir para deformidades, reduzindo a capacidade de trabalho e limitando a vida social. Também são responsáveis pelo estigma e preconceito contra a doença, que levam a um importante dano psicológico (BRASIL, 2002; OMS, 2003).

O Ministério da Saúde (2010) define como caso de hanseníase para tratamento, quando um ou mais dos seguintes achados encontram-se presentes: lesão(ões) e ou área(s) da pele com alterações de sensibilidade; acometimento de nervo(s) periférico(s) com ou sem espessamento associado a alterações sensitivas e/ou motoras e/ou autonômicas; baciloscopia positiva do esfregaço dérmico para BAAR.

A hanseníase apresenta formas clínicas variáveis, que dependem da resposta imune do hospedeiro, conferindo espectro característico das lesões, utilizado nas diversas classificações

clínicas da doença (ABULAFIA, 1999). As classificações mais utilizadas são as de Madri, a de Ridley e Jopling de 1966, e a classificação operacional da OMS (GALLO, 2003).

A classificação de Madri (Congresso Internacional, 1953), utilizada na prática clínica, considera dois polos estáveis e opostos (Tuberculóide e Virchowiano e) e dois grupos instáveis (Indeterminado e Dimorfo), que caminhariam para um dos polos, na evolução da doença (ARAÚJO, 2003). Os pacientes são agrupados nas formas paucibacilares (PB), constituída pela forma indeterminada (I) e tuberculóide (T); e nas multibacilares, compreendendo as formas dimorfa (D) e Virchoviana (V) (MARGARIDO & RIVITTI, 2005).

Ridley & Jopling, em 1966 propuseram uma classificação de acordo com a imunidade dos pacientes. De acordo com esta classificação existem dois principais polos da doença, a hanseníase tuberculóide (TT), em que o paciente apresenta maior resposta imune celular e menor índice baciloscópio e o polo da hanseníase lepromatosa ou virchoviana (LL), em que a resposta imune predominante é do tipo humoral e insuficiente para impedir a proliferação do bacilo. São descritas as formas TT (tuberculóide), BT (boderline tuberculóide), BB (boderline boderline), BL (boderline lepromatoso), LL (lepromatoso) e atribuindo uma importância menor à forma indeterminada. No entanto, o interesse epidemiológico por esta última forma, bem como o fato de ser uma expressão precoce da doença e sem definição em seu sentido polar, ainda é considerada uma forma clínica da hanseníase (GOULART, 2002).

A OMS, visando definir o esquema de tratamento classifica operacionalmente os casos em PB, quando apresentam até cinco lesões e com baciloscopia negativa, e em MB quando apresentam mais de cinco lesões ou baciloscopia positiva (WHO, 2009). A baciloscopia de pele (esfregaço intradérmico), sempre que disponível, deve ser utilizada como exame complementar e quando positiva classifica o caso como MB, independente do número de lesões. As formas I, da classificação de Madri, e TT, BT da classificação de Ridley e Jopling estão entre as PB, enquanto que as formas BB, BL e LL são MB (BRASIL, 2010).

Pacientes PB têm uma ou poucas lesões de pele e um índice baciloscópio negativo (IB, uma medida do número de bacilos no esfregaço dérmico, expressa numa escala logarítmica) e demonstram uma imunidade específica mediada por células contra o *M. leprae*, entretanto eles possuem títulos de anticorpos específicos ao *M. leprae* baixos ou ausentes e um infiltrado granulomatoso, observável na histopatologia. Em contraste, pacientes MB têm múltiplas lesões cutâneas e um IB positivo e demonstram elevados títulos de anticorpos contra o *M. leprae*, mas a ausência de imunidade específica mediada por células e uma dermatopatologia desprovido de linfócitos funcionais (DUTHIE *et al.*, 2007).

1.1.3. Etiologia e aspectos morfológicos

O agente causador da hanseníase é o bacilo *Mycobacterium leprae*, também conhecido com bacilo de Hansen, foi descrito em 1873 pelo médico Norueguês Amauer Hansen. É um bacilo álcool-ácido resistente, isto é, cora-se pela fucsina-ácida e não se descora pela lavagem no ácido e álcool. É um bacilo intracelular obrigatório com predileção pela célula de Schwann e pele (ARAÚJO, 2003; GOULART *et al.*, 2002; KATOCH, 2002).

Apresenta forma de bastonete linear ou levemente encurvado, cujo comprimento varia de 1,5 a 8 µm e a largura de 0,2 a 0,4 µm e possui divisão binária lenta, a cada 12 ou 14 dias, o que determina a cronicidade da doença (TALHARI & NEVES, 1997; GOULART, 2002). Os tatus e algumas espécies de primatas não humanos e o homem são considerados reservatórios naturais do bacilo (FOSS, 1999; ARAÚJO, 2003; BHAT, 2012).

Nos esfregaços de pele, linfa e cortes histopatológicos, os bacilos podem ser vistos isolados, em agrupamentos variados ou arranjos especiais denominados globias, peculiar do *M. leprae* e resultam da sólida união de bacilos através da gléia. Possui alta infectividade, baixa patogenicidade e alta virulência, sendo esta última representada pelo seu potencial

incapacitante, responsável pelas deformidades e pelo estigma das pessoas frente à doença (GOULART *et al.*, 2002; MURRAY *et al.*, 2004; REES, 1985)

A parede celular do *M. leprae* é constituída por peptídeoglicanos, compostos por cadeias alternadas de N-acetilglicosamina e N-glicolilmuramato ligados por pontes peptídicas, que são ligados à camada de galactano pelo arabinogalactano. Cadeias de arabinanas são ligadas ao galactano e juntos com os peptídeoglicanos formam uma zona eletrodensa em torno do *M. leprae*. Os ácidos micólicos que compõem a zona eletrotranslucida são ligados à porção terminal da cadeia de arabinana, arranjos intercalando os ácidos micólicos com os monomicolatos de trealose e ácidos micoserósicos com dimicoserósicos ftiocerol, bem como glicolípídeos fenólicos (PGLs) (Figura I) (SCOLLARD *et al.*, 2006).

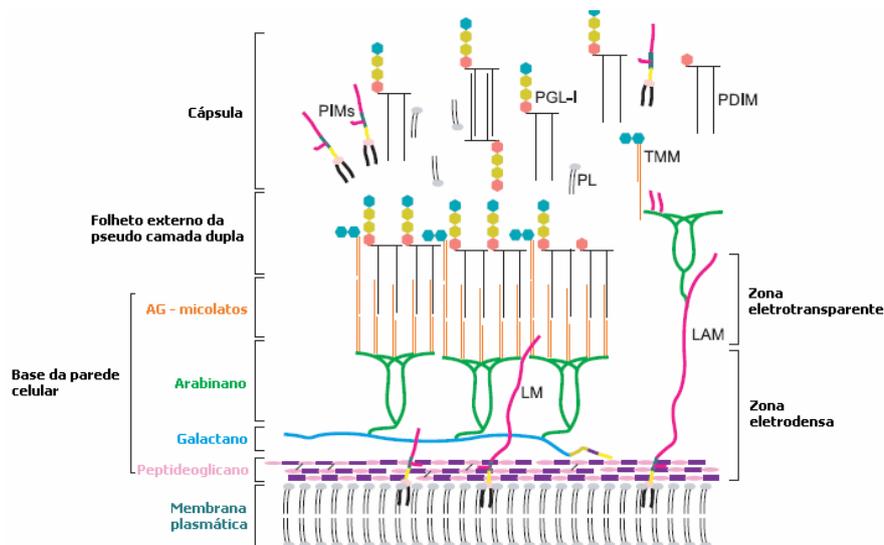


Figura 1. Modelo esquemático das moléculas constituintes da parede celular do *M. leprae*. Fonte: adaptado de Vissa & Brennan (2001).

O lipídio dominante na parede celular que confere especificidade imunológica ao *M. leprae* é o PGL-I, um dos primeiros antígenos específicos do *M. leprae* a ser isolado e caracterizado, constitui cerca de 2% da massa total bacteriana, podendo ser encontrado em

tecidos, no sangue circulante e na urina de doentes multibacilares e pode servir como ferramenta para o sorodiagnóstico da hanseníase (FOSS, 1997; SCOLLARD *et al*, 2006).

O PGL-I é composto de três moléculas de açúcares metilados ligados por uma molécula de fenol ao ftiocerol (grupo fenólico glicosilado). A associação das três moléculas de açúcar distingue o *M. leprae* de outras micobactérias e a imunogenicidade deve-se ao seu componente *3,6-di-O-methyl-β-D-glucosyl* presente na porção terminal do seu trissacarídeo. A porção glicídica do PGL-I foi sintetizada e é geralmente conjugada a proteínas transportadoras inertes, tais como albumina do soro bovino (BSA) ou (HSA) diretamente ou mediante carreadores octil (O) ou fenil (P). Com isso, antígenos semi-sintéticos foram produzidos como ND-O-BSA, ND-O-HSA, NT-P-BSA, além de outros com objetivo de facilitar a produção do antígeno e torná-lo hidrossolúvel, permitindo assim o desenvolvimento de testes sorológicos (SPENCER *et al*, 2011).

1.1.4. Epidemiologia

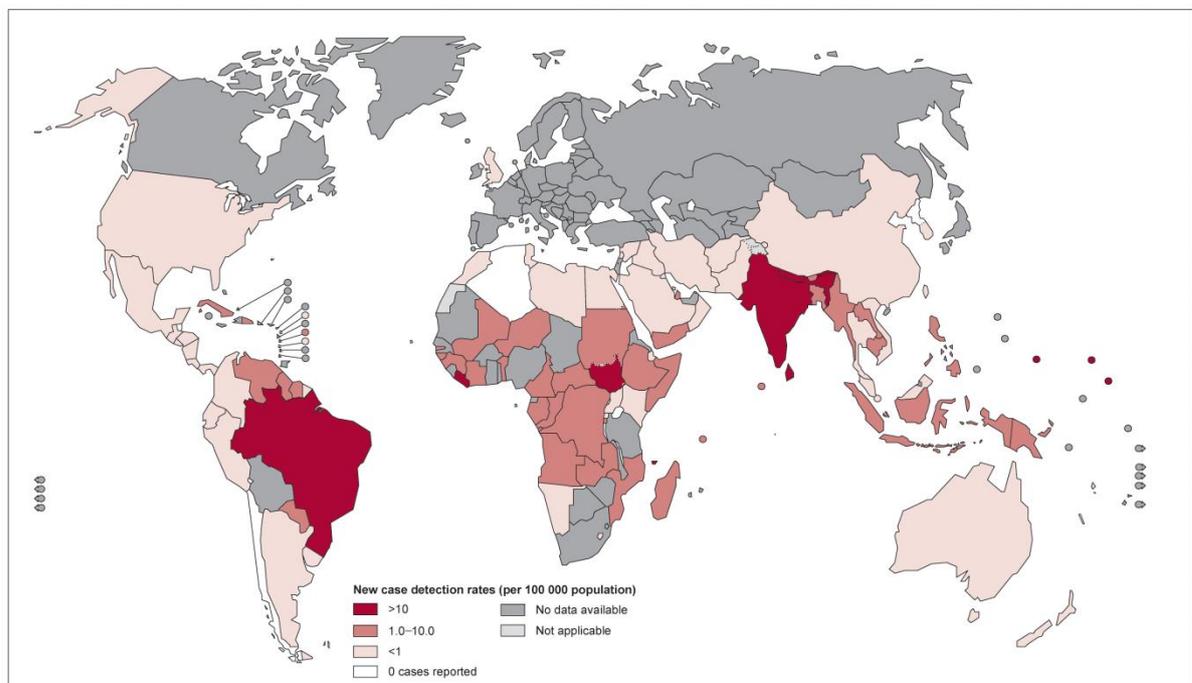
Apesar dos esforços para sua eliminação, a hanseníase permanece como importante problema de saúde pública em países em desenvolvimento, como: Índia, Brasil e Indonésia, configurando-se assim a pobreza como principal fator de risco, particularmente a desnutrição, a alta densidade domiciliar e a falta de saneamento (OMS, 2003; BARRETO, 2012). Esses esforços têm sido direcionados com o objetivo de controlar a doença, prevenir incapacidades e reabilitar física, social e economicamente as pessoas atingidas por essa doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008a, 2008c).

A introdução da poliquimioterapia (PQT) em 1981 resultou em uma mudança drástica na distribuição global da hanseníase, e tem sido responsável por uma significativa diminuição na detecção de novos casos nas últimas décadas. De acordo com a OMS, o registro global vem diminuindo anualmente, entretanto ainda existem áreas de alta endemicidade, sendo que a

Índia, o Brasil e a Indonésia apresentaram o maior número de casos e foram responsáveis por de 80% dos casos novos detectados em 2012 (WHO, 2013; MOURA *et al.*, 2013).

Apesar dos avanços a hanseníase continua a ser endêmica em muitos países que não conseguiram atingir a meta proposta pela OMS para o ano de 2000, que foi a prevalência de um caso para cada 10.000 habitantes. Dessa forma, foram detectados 232.857 casos novos no mundo no ano de 2012 (figura 2) e a prevalência global (figura 3) no primeiro trimestre de 2013 foi de 189,018 (WHO, 2013).

Leprosy new case detection rates, data reported to WHO as of January 2012



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2012. All rights reserved

Data Source: World Health Organization
Map Production: Control of Neglected
Tropical Diseases (NTD)
World Health Organization



Figura 2. Detecção de casos novos de hanseníase no mundo em 2011, por 100.000 habitantes. Fonte: WHO. Disponível: <http://gamapservr.who.int/mapLibrary/>

A meta de eliminação da hanseníase como problema de saúde pública foi definida em Assembleia mundial em 1991, e em 1998 foi reafirmada e estipulada como meta para 2005. A meta de eliminação foi alcançada a nível mundial e houve uma redução relativa de mais de 90% na prevalência, no final do ano 2000 (ISHII, 2003; PANNIKAR, 2009; IGNOTTI, DE PAULA, 2011). No entanto, esta diminuição da prevalência ocorreu em razão da limpeza dos

registros que continham pacientes em uso de antibióticos há muitos anos, associada a diminuição do período de tratamento da hanseníase de 5 para 2 anos, e depois para um ano. Ao mesmo tempo que houve esta redução significativa da prevalência, a taxa de detecção de casos novos apresentou uma leve tendência a diminuição ao longo dos anos.

A estratégia global para 2006 - 2010 foi definida em 2005 pela OMS, baseada na detecção precoce de casos, descentralização do diagnóstico e do tratamento da hanseníase, de forma que o acesso ao tratamento fosse facilitado e mais acessível à população (WHO, 2005). Neste período houve um aumento na cobertura de atendimento e redução da prevalência global dos casos registrados (PANNIKAR, 2009).

Leprosy prevalence rates, data reported to WHO as of January 2012

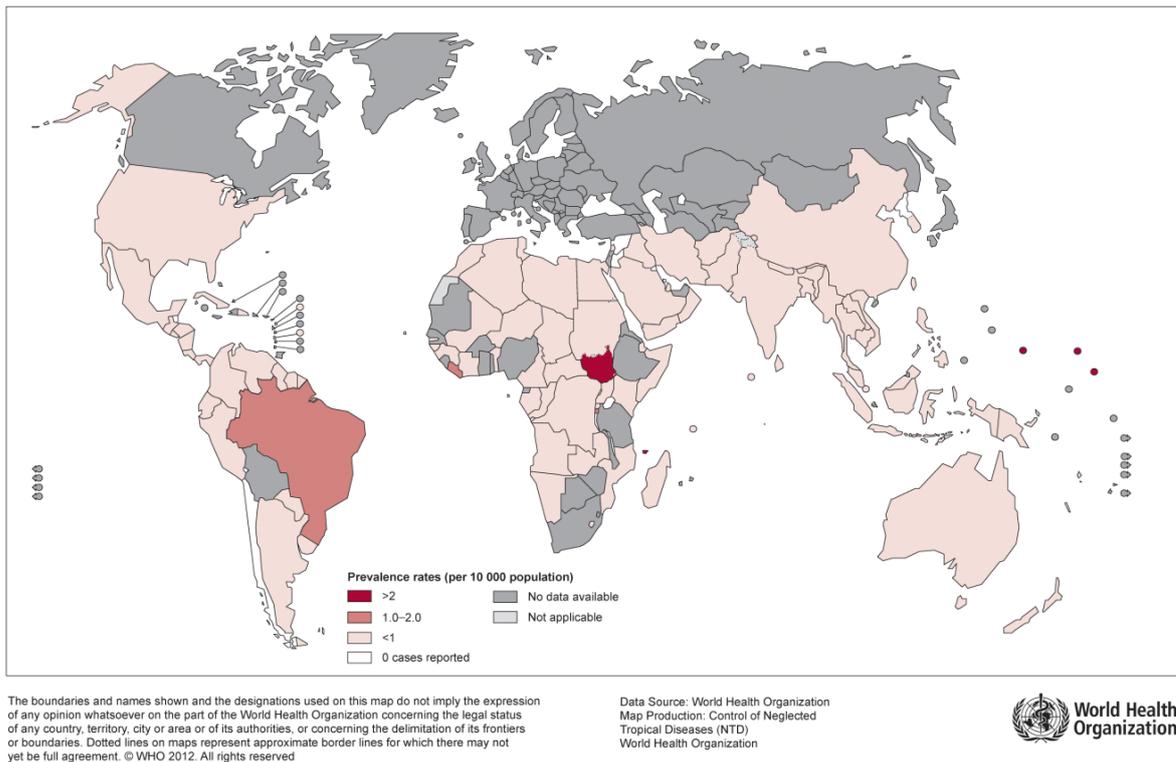


Figura 3. Prevalência da hanseníase no mundo no ano 2011, por 10.000 habitantes. Fonte: WHO. Disponível: <http://gamapservr.who.int/mapLibrary/>

A estratégia global para redução adicional da carga da hanseníase 2011 - 2015, atual estratégia da OMS, mantém como objetivos o diagnóstico precoce e a qualidade na assistência ao paciente de hanseníase.

Em 2012, o Brasil apresentou prevalência de 29.311 e neste mesmo ano foram detectados 33.303 casos novos de hanseníase, correspondendo a um coeficiente de detecção geral de 17,2/100 mil habitantes (BRASIL, 2012a, WHO). Tem sido observado contínuo decréscimo no coeficiente de detecção da hanseníase, apesar da expansão do número de unidades de saúde com pacientes em tratamento (BRASIL, 2012a).

Ainda em 2012, foram registrados no Brasil 2.246 casos novos de hanseníase em menores de 15 anos e um coeficiente de detecção desse grupo etário de 4,8/100 mil habitantes, em decorrência de circuitos ativos de transmissão localizados nas áreas mais endêmicas. Este indicador retrata a expansão da patologia na população, focos de transmissão ativos e recentes (BRASIL, 2012a).

A distribuição geográfica da hanseníase no Brasil é heterogênea (PENNA, 2009), sendo que as regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste apresentam as maiores taxas de detecção e prevalência, com destaque para a Amazônia Legal. Por outro lado, as menores incidências estão nas regiões Sul e Sudeste que alcançaram a meta proposta pela OMS (BRASIL, 2009a).

Estudos com os dados do SINAN orientaram a criação de um mapa do Brasil identificando dez *clusters* de detecção de casos de hanseníase (figura 4), a partir dos coeficientes de detecção de casos novos no período de 2005 a 2007. Esses *clusters*, que são as regiões com aglomeração de casos e com indícios de transmissão ativa, mostram as áreas em que o contágio é maior, possibilitando o direcionamento mais eficiente das políticas de controle e eliminação da hanseníase (BRASIL, 2008; PENNA *et al*, 2009).

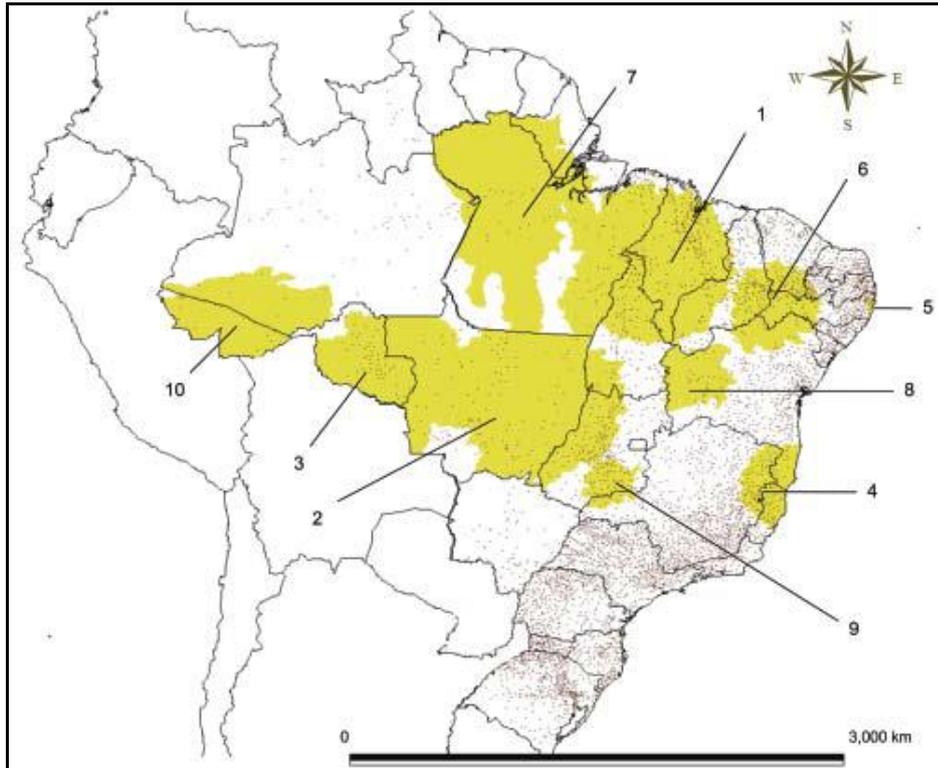


Figura 4. Dez clusters de detecção de casos de hanseníase no Brasil. Fonte: Penna *et al*, 2009.

O Estado do Pará está inserido nos *clusters* 1 e 7, sendo que o *cluster* 1, onde está inserida a região metropolitana de Belém, compreende 60 municípios do Estado e o *cluster* 7, que insere 29 municípios (BRASIL, 2009) e entre eles o município de Breves.

Foram registrados 3.912 casos novos na população geral no Estado do Pará em 2012, ocupando a quinta posição no cenário nacional. Apresentou um coeficiente de detecção de 50/100.000 habitantes, classificado, portanto como hiperendêmico. O coeficiente de detecção em menores de 15 anos foi de 15,3/100.000 habitantes, mais de três vezes a média nacional de 4,8/100.000, sendo o quarto estado com maior número de casos considerado como hiperendêmico nessa faixa etária, (BRASIL, 2012a).

Com objetivo obter um diagnóstico mais precocemente possível e reduzir a cadeia de transmissão, o exame e a vigilância de contatos intradomiciliares são indispensáveis, uma vez que estes representam o principal grupo de risco para desenvolver a doença. De acordo o Ministério da Saúde, contato intradomiciliar é toda e qualquer pessoa que resida ou tenha

residido com o doente de hanseníase nos últimos 5 anos, e estima uma média de quatro contatos domiciliares por paciente.

A investigação consiste no exame dermatoneurológico de todos os contatos intradomiciliares dos casos novos detectados, independentemente da classificação operacional e do repasse de orientações sobre período de incubação, transmissão e sinais e sintomas precoces da hanseníase, além de realizar a vacinação BCG para os contatos sem manifestações da hanseníase no momento da avaliação, independente de serem contatos de casos PB ou MB. Recomenda-se que esta estratégia seja implementada de forma ativa, aumentando a taxa de contatos examinados (BRASIL, 2010).

As medidas de vigilância de contatos estão previstas na estratégia da OMS e são voltadas ao aumento do percentual de exame de contatos, que em 2011 foi considerada regular. Dos 115.442 contatos registrados, apenas 58,9% foram avaliados (BRASIL, 2012a).

1.1.5. Transmissão e Patogenicidade

O mecanismo preciso de transmissão do *M. leprae* é desconhecido (SCOLARD *et al*, 2006), mas admite-se que as vias aéreas superiores constituem a principal porta de entrada e via de eliminação do bacilo e para que ocorra a transmissão do bacilo, é necessário o contato direto e uma exposição contínua e prolongada com o doente não tratado. (TALHARI & NEVES, 1997; BRASIL, 2002, MOURA *et al*, 2003) . Neste sentido, o ambiente domiciliar é apontado como meio facilitador no processo de transmissão, uma vez que o contato entre familiares saudáveis e infectados é prolongado, aumentando de cinco a dez vezes as chances de infecção (CALADO *et al*, 2005).

Outras possibilidades de transmissão também devem ser consideradas como a pele erodida, que eventualmente, pode ser a porta de entrada da infecção. As secreções orgânicas

como o leite, esperma, suor, secreção vaginal, também podem eliminar bacilos, mas não são importantes na disseminação da infecção (ARAÚJO, 2003; GOULART *et al.*, 2002). A água, solo, plantas e diferentes espécies de animais incluindo ameoba, insetos, peixe e tatus também tem sido relatadas como possíveis fontes de transmissão (MATSUOKA, 1999; TRUMAN, 2010).

Acredita-se que indivíduos MB sem tratamento são as principais fontes de infecção e seus contatos intradomiciliares constituem o principal grupo de risco para desenvolver a doença (MOET *et al.*, 2006). Tem sido demonstrado que, além dos contatos intradomiciliares, os vizinhos próximos de um caso de hanseníase e os contatos sociais da escola, trabalho, igreja, etc. também apresentam maior risco de adquirir a doença quando comparados com a população em geral (BARRETO, 2014; MOURA *et al.*, 2013; CALADO *et al.*, 2005).

O *M. leprae* pode permanecer viável por até cinco meses no ambiente e a sua divisão é extremamente lenta. Devido a este lento crescimento, o período de incubação em humanos é longo, com um tempo médio de 3 a 5 anos, embora possa levar décadas, como relatado recentemente em um caso em um chimpanzé que desenvolveu as lesões clínicas da hanseníase 30 anos após a infecção (SUZUKI *et al.*, 2010) . Em virtude do longo e variável período de incubação da doença a compreensão de sua transmissão permanece incompleta (WOROBEC, 2012).

A hanseníase é influenciada por fatores genéticos do hospedeiro, fatores ambientais, como o estado nutricional, vacinação com BCG e taxa de exposição ao *M. leprae* e a resposta imune é de fundamental importância para a defesa do organismo frente à exposição ao bacilo. A hanseníase caracteriza-se por apresentar alta infectividade e baixa patogenicidade, sendo a maioria da população, aproximadamente 80% protegida pelo “fator N de Rotberg” e apenas 10 a 20% das pessoas infectadas irão desenvolver a doença (ROTBURG, 1989; MENDONÇA, 2008). Desta forma, menos de uma em cada vinte pessoas (5%) expostas ao *M. leprae* desenvolvem a doença clínica. A resistência do hospedeiro mediada por células determina se

um indivíduo irá desenvolver a forma paucibacilar (PB, de alta resistência) ou multibacilar (MB, resistência baixa) da doença (BEHELLI & CURBAN, 1998; WOROBEK, 2012).

1.1.6. Diagnóstico

O diagnóstico de hanseníase é essencialmente clínico e epidemiológico, e é realizado por meio da análise da história e das condições de vida do paciente, do exame dermatoneurológico para identificar lesões ou áreas de pele com alteração de sensibilidade e/ou comprometimento de nervos periféricos (sensitivo, motor e/ou autonômico) (BRASIL, 2010).

De acordo com o Ministério da Saúde do Brasil, considera-se um caso de hanseníase a pessoa que apresenta um ou mais dos seguintes sinais cardinais e que necessita de tratamento poliquimioterápico: a) lesão(ões) e/ou área(s) da pele com alteração de sensibilidade; b) acometimento de nervo(s) periférico(s), com ou sem espessamento, associado a alterações sensitivas e/ou motoras e/ou autonômicas; e c) baciloscopia positiva de esfregaço intradérmico (BRASIL, 2010).

No entanto, a escassez de sintomas no início da doença pode retardar o diagnóstico ou contribuir para possíveis erros. O diagnóstico precoce e a introdução do tratamento específico são de extrema importância para reduzir fontes de transmissão e para prevenir doença grave com incapacidade e deficiência física (MARTELLI *et al.*, 2002; GELUK *et al.*, 2011).

Os testes laboratoriais para a hanseníase incluem a baciloscopia, exame de histopatologia de biópsia de pele ou nervo periférico e exames eletrofisiológicos que podem auxiliar no diagnóstico diferencial e na classificação dos casos (GARBINO, 2004).

Atualmente não existe nenhum teste laboratorial sensível e específico para o diagnóstico de todas as formas clínicas da doença ou para prever a progressão para hanseníase entre indivíduos expostos e o diagnóstico permanece essencialmente clínico. Assim, torna-se

fundamental aplicar novas ferramentas laboratoriais que possibilitem detectar a infecção pelo *M. leprae*, identificar a doença na forma inicial, e que sirvam como biomarcadores de evolução clínica e preditores de reação e de dano neural (MARTELLI *et al*, 2002; DUTHIE *et al*, 2007; STEFANI, 2008).

1.1.6.1. Baciloscopia e histopatologia

A baciloscopia se baseia na detecção de bacilos álcool-ácido resistentes, em esfregaços da derme e em biópsias de lesões de pele e permite identificar a carga bacilar do paciente. O resultado é fornecido como índice baciloscópico (IB) e como índice morfológico (IM). O IB representa o número de bacilos encontrado em cada esfregaço dérmico examinado em um campo microscópico e classificado utilizando-se a escala logarítmica de Ridley (RIDLEY, 1958; BATISTA *et al*, 2006).

Entretanto, apesar de ser considerada padrão ouro entre os testes laboratoriais para hanseníase, a baciloscopia não apresenta sensibilidade para todas as formas da doença. Indivíduos multibacilares (alguns BT, BB, BL e LL) apresentam baciloscopia positiva e os paucibacilares (I, TT e alguns BT) são, frequentemente, negativos (BATISTA *et al.*, 2006).

O exame histopatológico de lesão de pele pode auxiliar no diagnóstico diferencial e na classificação dos casos, especialmente quando são evidenciados agressão neural e bacilos. Entretanto, este teste não faz parte da rotina nos serviços de saúde pública e não está incluído nos programas de controle de hanseníase em países endêmicos (MARTELLI *et al*, 2002).

1.1.6.2. Sorologia

O desenvolvimento de métodos laboratoriais de detecção da hanseníase que possam ser utilizados para diagnóstico ou classificação da hanseníase é considerado prioridade em pesquisa (STEFANI, 2008). A maioria dos testes diagnósticos para doenças infecciosas baseia-se em testes sorológicos, sendo assim, diferentes técnicas sorológicas para detecção de anticorpos específicos para diagnóstico ou para um acompanhamento durante o tratamento foram descritas. Nesse sentido, o descobrimento de novas ferramentas que detectem os estágios iniciais ou subclínicos da doença irão auxiliar tanto na redução da transmissão do *M. leprae* como na prevenção das incapacidades físicas (REECE *et al.*, 2006; BARRETO *et al.*, 2011).

O PGL-I é o antígeno mais bem estudado e a sorologia anti-PGL-I representa o teste melhor padronizado e o mais avaliado na hanseníase. Alguns estudos demonstraram que a detecção sorológica de anticorpos anti-PGL-I poderiam ser utilizadas para: 1) auxiliar na classificação dos pacientes, 2) monitoramento dos casos, 3) identificação do risco de recidivas e 4) identificação de contatos intradomiciliares com maior risco de desenvolver a hanseníase (OSKAM *et al.*, 2003; MOURA *et al.*, 2008; SPENCER *et al.*, 2012;). A positividade do teste em contatos está associada com um risco 8,6 vezes maior de a infecção evoluir para a doença, enquanto que em indivíduos que não são contatos intradomiciliares de pacientes o risco é de 4.4 vezes (BRASIL *et al.*, 2003; CALADO *et al.*, 2005; BARRETO *et al.*, 2011).

A sorologia anti PGL-I é altamente específica e a presença de anticorpos séricos se correlaciona com o IB dos pacientes MB (BUHRER-SÉKULA *et al.*, 2000; AGRAWAL *et al.*, 2005). Entretanto, a sorologia anti PGL-I tem limitado valor diagnóstico para hanseníase, além disso, em áreas endêmicas grande parte da população pode estar exposta ao *M. leprae* e assim uma proporção significativa (40%) de indivíduos saudáveis pode ter sorologia anti PGL-I

positiva em virtude da exposição contínua ao *M. leprae* (MOURA *et al*, 2008; BARRETO *et al*, 2012).

Com o intuito de facilitar o acesso à informação sorológica aos profissionais de saúde atuantes em comunidades mais distantes, de forma rápida, simples, economicamente viável e padronizada, alguns testes sorológicos rápidos foram desenvolvidos para a detecção de anticorpos anti-PGL-I.

O teste rápido ML-Dipstick baseia-se na imobilização do antígeno dissacarídeo natural do PGL-I conjugado com a albina do soro bovino (DBSA) em uma fita de nitrocelulose. Este teste imunocromatográfico detecta anticorpos específicos da classe IgM e apresentou 97.2% de concordância com o ELISA anti-PGL-I (Kappa = 0,92) (BUHRER-SÉKULA *et al.*, 1998). De acordo com os autores, o teste poderia contribuir na correta classificação dos pacientes para fins de tratamento com a PQT/OMS (BUHRER-SÉKULA *et al.*, 2000).

Outro exemplo de teste rápido é ML-Flow, que utiliza o antígeno é o NT-P-BSA e também detecta anticorpos da classe IgM e apresentou concordância de 91% (Kappa = 0,77) com o ELISA anti-PGL-I. Segundo os autores, o teste também poderia ser utilizado para auxiliar na classificação do pacientes, além de identificar contatos com alto risco de desenvolver a hanseníase (BUHRER-SÉKULA *et al.*, 2003)..

No entanto, a maioria desses testes é aplicável às formas multibacilares com soropositividade variando de 80 a 100% e com pouca relevância para as formas paucibacilares com soropositividade de 30 a 60% (BUHRER-SÉKULA *et al.*, 1998; OSKAM *et al*, 2003; STEFANI, 2008; SPENCER *et al*, 2011)

Estudos baseados em sequências genômica buscam identificar novas proteínas específicas ou peptídeos do *Mycobacterium leprae*, potencialmente adequados para o sorodiagnóstico da hanseníase. Primeiramente, busca-se identificar antígenos do *Mycobacterium leprae* que possam ser associados ao antígeno PGL-I para aumentar sua especificidade e especialmente sua sensibilidade para hanseníase MB, representando uma

ferramenta de diagnóstico aprimorado para os programas de controle da hanseníase (REECE *et al.*, 2006; DUTHIE *et al.*, 2007, 2008, 2010, 2011; STEFANI, 2008).

Diferentes estudos avaliaram a imunoreatividade a várias proteínas recombinantes do *Mycobacterium leprae* em pacientes com hanseníase e controles. Um painel de proteínas foi testado em soros de pacientes de hanseníase, tuberculose e controles saudáveis que vivem em áreas endêmicas. Dentre estas destacou-se o ML0405 e o ML 2331, em especial em pacientes MB com alto índice baciloscópico, indicando sua possível aplicação diagnóstica (STEFANI, 2008).

A partir desses estudos o Infectious Disease Research Institute (IDRI) que fica localizado em Seattle nos Estados Unidos, construiu e avaliou uma proteína a partir da fusão de ML0405 e ML2331 (designada leprosy IDRI diagnostic 1 (LID-1) e demonstrou que esta construção manteve a imunoreatividade e segundo os autores poderia ser usada para diagnosticar sorologicamente pacientes de hanseníase entre os indivíduos pré-sintomáticos, ou seja, antes que um diagnóstico clínico seja possível (DUTHIE, 2007).

A função dessas proteínas na fisiopatogenia da hanseníase ainda é desconhecida, mas acredita-se que a ML0405 seja um fator de virulência do *M. leprae* e que a ML2331 seja uma proteína de superfície ou secretora presente na parede celular dessa bactéria (REECE *et al.*, 2006; DUTHIE *et al.*, 2007).

Entretanto para melhor avaliar o potencial diagnóstico das novas proteínas do *Mycobacterium leprae* será necessário testá-las em estudos multicêntricos preferencialmente envolvendo vários países, de modo a possibilitar um diagnóstico precoce e objetivo que poderia interromper a transmissão e, em longo prazo, ajudar a reduzir ainda mais o número de novos casos e facilitar o controle da hanseníase (DUTHIE *et al.* 2007). Estudos anteriores sugerem que a adição da proteína LID-1 ao PGL-I poderia melhorar a sensibilidade para detecção de

anticorpos uma vez que alguns pacientes que não apresentam anti-PGL-I têm anticorpos que reconhecem o LID-1. (REECE *et al.*, 2006; DUTHIE *et al.*, 2007, 2008, 2010, 2011).

Recentemente, dois antígenos anteriormente caracterizados foram quimicamente conjugados, o açúcar ND-O (análogo sintético do PGL-I) e a proteína LID-1 após confirmação de que esses dois antígenos tem o potencial para complementarem-se mutuamente, resultando na obtenção de um único antígeno (NDO-LID), procurando-se determinar se esta combinação manteve esta capacidade. O antígeno ND-O é detectado por anticorpos da classe IgM e o LID-1 detectado por anticorpos da classe IgG. De acordo com os autores, pacientes que não tem anticorpos que reconhecem NDO podem ter anticorpos que reconhecem LID-1 e vice-versa (CARDOSO *et al.*, 2013; DUTHIE *et al.*, 2014).

Em seguida, foi desenvolvido um teste rápido NDO-LID (OL[®], OrangeLife, Brasil) fornecido como um kit pronto para uso que incorpora o antígeno NDO-LID. Baseia-se na imobilização deste antígeno em uma membrana porosa de nitrocelulose, permitindo transferência e a detecção específica de anticorpos em soros ou sangue total de pacientes. Uma amostra de sangue ou soro é colocada no receptáculo da amostra ocorrendo a migração da amostra e do reagente de detecção que consiste em partículas móveis de ouro coloidal rotuladas com IgM e IgG anti-humano através da membrana porosa até a zona de teste. Se o anticorpo for específico para a hanseníase, ele se ligará ao antígeno e uma linha vermelha aparecerá na zona de teste. Se anticorpos IgM e /ou IgG específicos ao *M. leprae* não forem detectados, a amostra e o reagente de detecção passarão sobre a zona de teste e nenhuma linha aparecerá (CARDOSO *et al.*, 2013; DUTHIE *et al.*, 2014).

No estudo realizado por Cardoso *et al.* (2013), os autores afirmam que este teste apresentou 90,9% de concordância com o ELISA anti-PGL-I (Kappa = 0,8) superando ligeiramente sua capacidade de identificação de casos, indicando que a adição do LID-1 poderia ser um benefício adicional, e ainda segundo os autores poderia ser útil como um teste

diagnóstico e prognóstico para indivíduos com hanseníase multibacilar. Entretanto, são necessários testes em populações de diferentes áreas endêmicas e mais estudos com a aplicação desta nova ferramenta para suportar essas evidências.

1.1.6.3. Diagnóstico molecular

A descoberta de sequências espécie-específicas no genoma do *Mycobacterium leprae* introduziu os testes baseados em DNA e RNA como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e específica de bacilos para a detecção sensível. Dessa forma a biologia molecular tem sido muito utilizada como ferramenta para a detecção de patógenos, tratamento precoce e prevenção de doenças (MARTELLI, 2002; KATOCH, 2002; STEFANI, 2008).

A técnica mais utilizada na identificação de agentes infecciosos é a reação em cadeia da polimerase (PCR) e permite a detecção de um pequeno número de microrganismos patogênicos em qualquer tecido humano. Baseia-se na amplificação de pequenas regiões genômicas do organismo desejado por meio de iniciadores predeterminados, em condições *in silico* adequadas (RAMAPRASAD *et al.*, 1997; RAFI *et al.*, 1994).

Reação em cadeia da polimerase é talvez o mais sensível e específico teste para confirmar a presença de DNA do *M. leprae* em qualquer amostra de tecido ou fluido. Técnicas baseadas em PCR têm mostrado uma especificidade de 100% e, essencialmente, uma sensibilidade que varia 34-74% dos pacientes com as formas paucibacilares da doença superior a 80% em pacientes com lepromatosa doença. Este teste está disponível apenas em laboratórios especializados e exige despesas consideráveis, bem como experiência, além disso, este teste indica que o bacilo passou pelo organismo, mas não indica que o bacilo está viável ou se multiplicando (AGRAWAL *et al.*, 2005).

1.1.7. Tratamento

O tratamento do paciente com hanseníase objetiva a cura, eliminando a fonte de infecção, interrompendo assim, a cadeia de transmissão, o que é considerado estratégico para o controle da doença.

A terapia medicamentosa integral de um paciente com hanseníase compreende a quimioterapia específica, seu acompanhamento, com vistas a identificar e tratar as possíveis intercorrências e complicações da doença e a prevenção e tratamento das incapacidades físicas. Neste sentido, há necessidade de um esforço organizado da rede básica de saúde, para adoção das estratégias adequadas a todas as pessoas diagnosticadas (BRASIL, 2002).

Para o tratamento específico, o Ministério da Saúde do Brasil adota a poliquimioterapia recomendada pela Organização Mundial de Saúde conhecida como PQT/OMS, e que consiste no uso de três fármacos associados: rifampicina, clofazimina e dapsona. Esta associação evita a resistência medicamentosa do bacilo, que impossibilita a cura da doença, fato frequente quando se utiliza apenas um medicamento (BRASIL, 2001 & BRASIL, 2002).

O Ministério da Saúde adota a classificação de Madri e sugere classificação operacional com os seguintes critérios: PB - casos com até cinco lesões de pele e ou apenas um tronco nervoso comprometido e MB - casos com mais de cinco lesões de pele e ou mais de um tronco nervoso acometido. Ressalta-se que a baciloscopia positiva classifica o caso como multibacilar, independente do número de lesões (ARAÚJO, 2003).

A PQT destrói o bacilo tornando-o inviável, evitando assim, a evolução da doença, prevenindo as incapacidades e deformidades e levando à cura. Soma-se o fato do bacilo morto ser incapaz de infectar outras pessoas, rompendo a cadeia epidemiológica da doença. Assim sendo, no início do tratamento a transmissão da doença é interrompida, e a PQT realizada de forma completa e correta, garante a cura da doença (BRASIL, 2002).

Com o advento da poliquimioterapia específica para o bacilo, obteve-se o controle da resistência bacilar. Porém, sabe-se que sua destruição pode desencadear as reações hansênicas, fruto da resposta imunológica do hospedeiro frente aos produtos bacterianos, tornando-se necessárias condutas terapêuticas e intervenções precisas para o tratamento destas reações, que representam uma doença imune de caráter agudo no decorrer da doença infecciosa crônica (FOSS, 1999).

Desta forma, o tratamento da hanseníase compreende não somente a quimioterapia específica, mas também a supressão da inflamação, o controle dos episódios reacionais, a prevenção das incapacidades e a reabilitação (KATOCH, 2002). Diversos imunossupressores têm sido utilizados para o tratamento das reações hansênicas entre eles a talidomida, metotrexato, ciclosporina, azatioprina, pentoxifilina e corticosteróides (SCOLLARD *et al.*, 2006).

1.1.8. Reações hansênicas

Com a evolução crônica da hanseníase, podem ocorrer episódios agudos denominados reacionais, os quais são frequentemente acompanhados de quadro de neurite que podem resultar em incapacidades, muitas vezes irreversíveis (OPROMOLA, 2000), cuja prevenção está associada ao diagnóstico, através de exame físico e dermatoneurológico, e ao início imediato do tratamento (BRASIL, 2006).

As reações hansênicas podem ser definidas como manifestações clínicas resultantes de alterações no balanço imunológico entre o hospedeiro e o agente infectante, *M. leprae*. Esses episódios afetam principalmente pele e nervos e são a principal causa de incapacidade da função do nervo periférico (GOULART, 2002). Os quadros reacionais, às vezes, antecedem o diagnóstico, podendo ocorrer durante o curso natural da doença, durante o tratamento e mesmo

após o tratamento. Podem ser precipitadas pela quimioterapia, infecções intercorrentes, imunização, gravidez e/ou parto, estresse físico e/ou psicológico entre outros (AGRAWAL *et al.*, 2005)

Essas reações são classificadas em dois tipos, de acordo com Ridley-Jopling em reação tipo 1 ou reação reversa e reação tipo 2 ou eritema nodoso hansênico (JOPLING, 1970).

As reações tipo 1, ocorrem tipicamente em pacientes hansênicos com as formas clínicas TT, BT, BB e BL, que são imunologicamente instáveis e está associada ao aumento da resposta imune celular. São episódios de hipersensibilidade do tipo 1 e se manifestam clinicamente como inflamação de lesões da pele, neurite aguda, sendo esta última frequentemente é rápida e grave, resultando em dano permanente no nervo, levando o paciente ao risco de deformidades (AGRAWAL *et al.*, 2005).

A reação tipo II, acomete principalmente pacientes com as formas clínicas LL e BL, e consiste de um processo inflamatório sistêmico, com uma reação de hipersensibilidade do tipo 3, desencadeado pela deposição de imunocomplexos em determinados órgãos e na pele, e estudos recentes a associaram com outros fenômenos da imunidade celular (KATOCH, 2002; AGRAWAL *et al.*, 2005; SCOLLARD *et al.*, 2006). São caracterizadas pelo aparecimento súbito de nódulos, pápulas e placas eritematosas dolorosas na pele, e pela presença de neurite, edema e artralgia, seguidos pelo aumento doloroso dos linfonodos, fígado e baço, acompanhado de febre, mal estar e leucocitose (OPROMOLLA, 2000).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar os antígenos ND-O-BSA, LID-1 e NDO-LID como possíveis marcadores de infecção pelo *M. leprae* em amostras de plasma e sangue total de pacientes com hanseníase, contatos intradomiciliares e estudantes da rede pública de ensino em um município do Estado do Pará.

2.2. Objetivos específicos

- 2.2.1. Avaliar a situação epidemiológica no município de Breves, através da identificação de casos novos entre os escolares e contatos intradomiciliares de casos-índice.
- 2.2.2. Titular os níveis de anticorpos anti-ND-O-BSA, anti-LID-1 e anti-NDO-LID em amostras de plasma de pacientes com hanseníase, contatos intradomiciliares e estudantes da rede pública de ensino;
- 2.2.3. Comparar os níveis dos anticorpos anti-ND-O-BSA, anti-LID-1 e anti-NDO-LID nos diferentes grupos estudados, avaliando a correlação entre eles;
- 2.2.4. Comparar os resultados do teste rápido OL com os resultados do ELISA NDO-LID em casos de hanseníase, contatos intradomiciliares e estudantes.
- 2.2.5. Analisar uma coorte de 40 indivíduos sem hanseníase, comparando aqueles com sorologia positiva versus sorologia negativa para os antígenos em estudo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Aspectos éticos

O estudo foi realizado em conformidade com os preceitos da Declaração de Helsinque, do Código de Nuremberg e das Normas de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (Res. CNS 466/2012) do Conselho Nacional de Saúde e foi aprovado pelo Conselho de Ética do Instituto de pesquisa em ciências da saúde da Universidade Federal do Pará sob o protocolo n° 197/07 CEP- ICS/UFPA (ANEXO I). Cada indivíduo, candidato ao presente estudo, assinou o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) aceitando participar da pesquisa e teve sua identidade mantida em sigilo.

3.2. Desenho do estudo

O presente estudo foi desenvolvido no âmbito do projeto “Detecção e análise da variação genotípica do *Mycobacterium leprae* de casos-índice e de comunicantes, em regiões endêmicas do Estado do Pará”, para o qual foram selecionados oito municípios do Estado do Pará, classificados como hiperendêmicos de acordo com os parâmetros designados pelo Ministério da Saúde. A seleção destes municípios foi realizada com base em sua localização geográfica, de modo a visitar diferentes regiões do estado e abrangendo áreas dos clusters 1 e 7 de hanseníase identificadas por Penna *et al* (2009) e no boletim do Ministério da Saúde (Brasil, 2009b). O município de Breves localizado no cluster 7, considerado como hiperendêmico de acordo com os parâmetros utilizados pelo Ministério da Saúde do Brasil ($\geq 40/100.000$) foi o município escolhido para a realização deste estudo. Está situado ao sudeste da Ilha de Marajó,

221,61 km de Belém, capital do Estado e de acordo com o último censo em 2010, este município apresentou 92.860 habitantes.

A hanseníase é uma doença de notificação compulsória no Brasil, assim, todos os pacientes têm seus dados clínicos e endereços registrados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação do Ministério da Saúde (SINAN). Foi solicitada à secretaria municipal de saúde do município de Breves, a lista dos pacientes notificados nos últimos cinco anos para a seleção da amostra. De acordo com esta secretaria foram notificados 233 casos novos de hanseníase no período de 2006 a 2010 e a seleção da amostra foi realizada com a técnica de amostragem aleatória sem reposição por meio do *software* BioEstat 5.0 (Sociedade Civil Mamirauá, Amazonas, Brasil).

Devido a elevada proporção (65,5%) de soropositividade anti-PGL-I observada por BARRETO *et al* (2012) entre estudantes da rede pública em Breves retornamos a este município para reavaliar os sujeitos inicialmente incluídos no estudo, além de novos contatos intradomiciliares que foram encontrados nos domicílios no momento da visita.

3.3. Participantes e critérios clínicos

Este estudo foi realizado em dois momentos diferentes. Inicialmente, foram selecionados 31 casos de hanseníase notificados no SINAN no período de 2006 a 2010. Esses casos e seus contatos intradomiciliares foram visitados em seus domicílios em outubro de 2011, no primeiro tempo deste estudo, denominado (T1), e entrevistados sobre suas características demográficas, socioeconômicas e informações clínicas, utilizando um questionário padrão, o qual foi aplicado em cada residência correspondente ao caso de hanseníase selecionado para visita. Também foram escolhidas aleatoriamente e visitadas cinco escolas da rede pública de ensino, nas quais foram ministradas palestras com informações e esclarecimentos sobre

hanseníase e estudantes, com idade entre 6 e 18 anos foram também selecionados para o estudo. Para cada estudante diagnosticado clinicamente com hanseníase, agendava-se uma visita domiciliar, onde seus contatos intradomiciliares eram também clinicamente avaliados e tinham sangue coletado para detecção de anticorpos anti-PGL-I.

No segundo momento, em novembro de 2013 (dois anos após a primeira avaliação, denominado T2) foi realizada uma nova visita ao município pela mesma equipe de saúde e baseado nos resultados clínicos e sorológicos de T1, foi possível reexaminar 40 pessoas que eram clinicamente saudáveis. Além dessas pessoas avaliadas em T1, foram incluídos outros contatos intradomiciliares no momento da nossa segunda visita, mesmo que eles não tivessem sido examinados em T1.

O tamanho da amostra foi determinado pelo número de pessoas que foi possível avaliar em uma semana de trabalho de campo durante cada visita ao município. Mais cinco escolas públicas de ensino fundamental, localizadas em diferentes bairros foram visitadas e novos escolares foram incluídos no estudo. Assim como em T1, cada estudante clinicamente diagnosticado com hanseníase teve seus contatos intradomiciliares também examinado.

Os indivíduos selecionados para o estudo foram avaliados clinicamente em busca de sinais e sintomas da hanseníase por uma equipe de profissionais qualificados e experientes, composta por hansenólogos, dermatologistas, enfermeiras, fisioterapeutas e técnicos de laboratório, que foram até o município e avaliaram esses indivíduos. Quando os novos casos de hanseníase foram diagnosticados com apenas uma mácula hipopigmentada, mas sem detecção de envolvimento dos nervos os mesmos foram classificados como hanseníase indeterminada (MHI), como definido pela classificação de Madri. Na presença de outros sinais, o paciente era classificado como portador de uma das cinco formas clínicas definidas pelo sistema de classificação de Ridley e Jopling como Tuberculóide - Tuberculóide (TT), Borderline Tuberculóide (BT), Borderline - Boderline (BB), Borderline - Lepromatosa (BL) ou

Lepromatosa - Lepromatosa (LL). Os casos de MHI e TT foram classificados como casos PB, enquanto as formas clínicas BT, BB, BL e LL foram classificadas como casos multibacilares MB. Em caso de espessamento do nervo, mas sem a presença de sinais clínicos na pele a hanseníase foi diagnosticada como primariamente neural. Quando apenas um nervo foi afetado o caso foi classificado como PB, dois ou mais nervos espessados, como MB.

3.4. Critérios de inclusão

Foram incluídos no estudo casos de hanseníase diagnosticados entre 2006 e 2010, seus contatos intradomiciliares e estudantes que estavam matriculados nas escolas públicas visitadas, com idade entre 6 e 18 anos. Os professores selecionaram os estudantes aleatoriamente e seus pais receberam informações gerais sobre a hanseníase e os principais objetivos do estudo. Os estudantes que aceitaram a participar do estudo assinaram o TCLE e quando eram menores de 18 anos o TCLE era assinado pelos pais ou responsáveis. Também foram incluídos os contatos intradomiciliares dos estudantes diagnosticados com hanseníase que estavam na residência no momento da visita domiciliar, que aceitaram participar da pesquisa e assinaram o TCLE.

3.5. Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo os estudantes que não compareceram à escola no dia da visita e aqueles que não trouxeram o TCLE assinado quando estes eram menores de 18 anos. Também foram excluídos pacientes que mudaram de residência, aqueles que não foram encontrados no momento da visita domiciliar e aqueles indivíduos que se recusaram a participar da pesquisa.

3.6. Coleta das amostras

As amostras de sangue dos participantes do estudo foram coletadas por profissional qualificado um volume total de 4mL, utilizando tubos contendo EDTA (Acido Etileno Diamino Tetracético) como anticoagulante. Após centrifugação a 3.000 rpm por 3 minutos o plasma foi separado das células sanguíneas e estocado a -20°C para transporte até o laboratório de Dermato-Imunologia da Universidade Federal do Pará, localizado em Marituba, Pará, onde foi acondicionado a -80°C até o momento da realização do teste para identificar a presença de anticorpos anti-ND-O-BSA (IgM), anti-LID-1(IgG) e ant-NDO-LID (IgM e IgG). Para as análises as amostras foram descongeladas e imediatamente testadas. No momento da coleta do sangue, 10 μl de sangue total foram utilizados para a realização do teste rápido OrangeLife[®] para a detecção de anticorpos IgG e IgM.

3.7. Detecção dos anticorpos IgM e IgG para os antígenos anti-ND-O-BSA, LID-1, NDO-LID pelo método de ELISA

A detecção de anticorpos anti-PGL-I no plasma dos indivíduos foi determinada pelo método de ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay), como descrito anteriormente por Barreto *et al* (2011) e contra os antígenos ND-O-BSA, LID-1 e NDO-LID foi realizado também pelo mesmo método conforme descrito a seguir:

As placas (Immulon 4 HBX, N.Y, Rochester, USA) foram inicialmente sensibilizadas com os antígenos, ND-O-BSA, LID-1 ou NDO-LID (gentilmente cedido pelo Dr. Malcom Duthie do Instituto de Pesquisa para Doenças Infecciosas, Seattle, EUA) na concentração de 1 $\mu\text{g/ml}$ em tampão carbonato/bicarbonato de sódio 10mM e estocadas “overnight” a 4°C . O

tampão de sensibilização foi removido e placa lavada usando PBS com BSA 1%. A placa foi lavada mais 4 vezes com PBS com 0,05% de Tween 20.

As placas foram bloqueadas com 300µl de PBS com 0,05% Tween 20 e Albumina Bovina Séria 1% (BSA, Sigma-Aldrich A7906, St. Louis, MO, USA) em cada poço e incubadas por 30 min a temperatura ambiente, e em seguida lavada duas vezes com 200µl de PBS com 0,05% Tween 20. Foi adicionado novamente 300µl da solução de bloqueio e incubadas por mais 30 min a temperatura ambiente. Um microlitro de cada amostra de plasma foi diluído em 300µl na proporção 1:300 e em seguida adicionados 100µl em cada poço previamente determinados. As placas foram devidamente tampadas e incubadas por 2 horas a temperatura ambiente. Cada amostra individual foi analisada em dois poços, cuja média de DO foi diminuída de um poço em branco que não era sensibilizado com os antígenos.

Em seguida, as placas foram lavadas 4 vezes com 200µl com solução de lavagem, deixando a solução da última lavagem na placa por 30 minutos. O anticorpo secundário anti-IgG (Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, PA) diluído em PBS com 0,05% Tween 20 na proporção de 1:20.000 e o anticorpo anti-IgM (Sigma Aldrich A0420, St. Louis, MO, USA) na proporção de 1:10.000 foram adicionados nos respectivos poços.

As placas foram lavadas 6X com 200µl com solução de lavagem, deixando a solução da última lavagem na placa por 30min e lavadas mais 2 vezes com PBS 1X apenas. Após a lavagem foram adicionados 100µl do substrato OPD (Sigma Aldrich) e incubadas por 15 minutos protegidas da luz. Em seguida a reação foi parada com 50µl de solução de ácido sulfúrico 4N e a absorbância lida imediatamente, com o auxílio do leitor de microplaca MRX Revelation 4.25 (Dynex Technologies, Chantilly, VA, USA) em um comprimento de onda de 490nm.

O resultado foi considerado positivo quando a DO foi maior que 0.295nm (cut-off) para o ND-OBSA e LID-1, 0.475nm para o NDO-LID considerando-se a média mais três vezes o

desvio padrão do resultado dos testes de quatorze indivíduos saudáveis de uma mesma área hiperendêmica. O valor da DO final de cada amostra de plasma foi determinado por subtrair o background da DO dos poços dos controles brancos da média das duplicatas de cada indivíduo. Foi utilizado como controle positivo, plasma de um paciente com elevado índice baciloscópico e para o controle negativo foi utilizado plasma de indivíduo residente em área não endêmica para hanseníase.

3.8. Teste rápido OrangeLife[®]

O teste rápido (OrangeLife[®], Rio de Janeiro, Brasil) para a detecção de anticorpos anti-NDO-LID foi realizado conforme instruções do fabricante e que consiste em adicionar 10 µl de sangue total e 100 µl de tampão de corrida no poço da amostra. A leitura do resultado foi feita visualmente após 10 minutos e a interpretação dos resultados dos testes foi feito da seguinte forma: um resultado negativo foi indicado pela ausência de uma linha na zona de teste e pela presença de uma linha na zona de controle e um resultado positivo foi indicado pela presença de duas linhas, uma linha definida na zona de teste e outra linha na zona de controle. Uma intensidade de coloração positiva acentuada foi considerada como resultado positivo forte e uma intensidade de coloração positiva mais tênue foi considerada resultado positivo fraco como mostrado na figura 5.



Figura 5. A: Resultado negativo: ausência de linha na zona de teste e presença de uma linha na zona de controle; B: Resultado positivo forte: presença da linha controle e linha teste de intensidade forte; c: resultado positivo fraco: presença da linha controle e linha teste de intensidade tênue.

4.9. Análise estatística

Os testes de Mann-Whitney e Qui-quadrado foram aplicados para comparar os títulos de anticorpos (anti-ND-O-BSA, anti-LID-1 e anti-NDO-LID) e a proporção de soropositividade, respectivamente, entre os grupos estudados. O teste de correlação linear de Pearson foi utilizado para verificar a existência e o nível de correlação entre os valores dos antígenos avaliados. Para o coeficiente de correlação de Spearman foi adotada a seguinte interpretação: fraca (0 - 0,3), regular (0,3 - 0,6), forte (0,6 - 0,9), muito forte (0,9 - 1,0) e perfeita (1,0) (CALLEGARI-JACQUES, 2003).

A concordância entre os resultados do ELISA e testes rápido OrangeLife[®] foi determinada pelos valores kappa (κ), que foi calculado utilizando o programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), versão 13.0. A seguinte interpretação de concordância foi utilizada para os valores de kappa: baixa (0 - 0,5), moderada (0,51- 0,75), excelente (0,76- 1,0) seguindo diretrizes estabelecidas (SVANHOLM, 1989).

Os testes estatísticos foram realizados utilizando-se o software Graphpad prism (versão 6.0). Foi aceito um erro de 5% ($p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo) para todos os testes.

4. RESULTADOS

4.1. Indivíduos avaliados em T1 (2011)

No primeiro momento do estudo (T1) foram analisados 621 indivíduos, sendo 31 casos índice. A partir destes, foram avaliados 280 contatos intradomiciliares e 18,6% (52/280) foram diagnosticados como casos novos de hanseníase entre os mesmos. Foram visitadas também cinco escolas públicas do município nas quais 229 estudantes foram examinados, e mais um alto percentual de 6.1% (14/229) de casos novos foram diagnosticados com hanseníase.

Por fim, os domicílios de cada estudante diagnosticado como caso novo também foram visitados a fim de identificar o doente que estaria possivelmente transmitindo a hanseníase. No total foram examinados 81 contatos intradomiciliares desses escolares diagnosticados com hanseníase e novamente outros 14.8% (12/81) casos novos foram detectados.

4.2. Indivíduos avaliados em T2 (2013)

Em T2, foram visitadas mais cinco escolas públicas de ensino fundamental e/ou médio no município de Breves que não haviam sido visitadas em T1, e foram avaliados clinicamente pela nossa equipe de saúde multiprofissional um total de 331 estudantes. Dentre estes, 9,4% (31/331) dos estudantes apresentaram manifestações clínicas da hanseníase e foram, portanto, diagnosticados clinicamente como casos novos. Em seguida, o domicílio de cada estudante diagnosticado como caso novo de hanseníase também foi visitado e então 131 contatos intradomiciliares desses estudantes foram avaliados e mais 19,8% (26/131) indivíduos também foram diagnosticados como casos novos de hanseníase. As características epidemiológicas dos indivíduos avaliados em T1 e T2 de acordo com gênero, faixa etária e classificação operacional da OMS estão descritas na tabela 1.

Tabela 1. Características epidemiológicas dos casos índice, estudantes, casos de hanseníase entre estudantes, seus contatos intradomiciliares e casos de hanseníase entre os contatos de acordo com gênero, faixa etária e classificação operacional da OMS em T1 (2011) e T2 (2013).

	Casos índice				Contato intradomiciliar de casos índice (CICI)				Casos novos entre contatos intradomiciliares				Estudantes				Casos novos entre estudantes				Contatos intradomiciliares de estudantes detectados com hanseníase (CIEDH)				Total			
	2011		2013		2011		2013		2011		2013		2011		2013		2011		2013		2011		2013		2011		2013	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Gênero																												
Masculino	17	54.8	0	0	129	46.1	0	0	34	53.1	11	42.3	77	33.6	164	49.5	4	28.6	12	38.7	42	51.9	54	41.2	303	43.3	242	46.4
Feminino	14	45.2	0	0	151	53.9	0	0	30	46.9	15	57.7	152	66.4	167	50.5	10	71.4	19	61.3	39	48.1	77	58.8	396	56.7	280	53.6
Total	31	100	0	0	280	100	0	0	64	100	26	100	229	100	331	100	14	100	31	100	81	100	131	100	699	100	522	100
Idade																												
< 15 anos	28	90.3	0	0	194	69.3	0	0	19	29.7	9	34.6	198	86.5	300	90.6	12	85.7	27	87.1	40	49.4	89	67.9	491	70.2	428	82.0
> 15 anos	3	9.7	0	0	86	30.7	0	0	45	70.3	17	65.4	31	13.5	31	9.4	2	14.3	4	12.9	41	50.6	42	32.1	208	29.8	94	18.0
Total	31	100	0	0	280	100	0	0	64	100	26	100	229	100	331	100	14	100	31	100	81	100	131	100	699	100	522	100
Classificação OMS																												
PB	16	51.6	0	0	0	0	0	0	21	40.4	5	19.2	0	0	0	0	7	50.0	8	25.8	0	0	0	0	44	45.4	13	22.8
MB	15	48.4	0	0	0	0	0	0	31	59.6	21	80.8	0	0	0	0	7	50.0	23	74.2	0	0	0	0	53	54.6	44	77.2
Total	31	100	0	0	0	0	0	0	52	100	26	100	0	0	0	0	14	100	31	100	0	0	0	0	97	100	57	100

Entre os novos estudantes avaliados em T2 foi observada uma proporção de soropositividade de 5,1% (17/331) para anticorpos anti-LID-1, de 45% (149/331) para anticorpos anti-NDO-LID e o maior percentual 49,5% (164/331) foi observado para anticorpos anti-ND-O-BSA. A tabela 2 apresenta o percentual de soropositividade e soronegatividade entre os estudantes avaliados.

Tabela 2. Sororeatividade dos anticorpos anti-ND-O-BSA, anti-LID-1 e anti-NDO-LID em amostra de plasma de estudantes por ELISA.

	Positivo *		Negativo		Total
	N	(%)	n	(%)	
NDO-BSA	164	49,5	167	50,5	331
LID-1	17	5,1	314	94,9	331
NDO-LID	149	45,0	182	55,0	331

* $p < 0,0001$. Teste qui-quadrado.

A figura 6 ilustra os títulos de anticorpos de todos os novos estudantes avaliados. Os mais elevados títulos de anticorpos foram observados para anticorpos anti-NDO-LID (mediana DO = 0,430; IQR = 0,360), seguido dos níveis de anticorpos anti-ND-O-BSA (mediana da DO = 0,293; IQR = 0,359) e os menores títulos de anticorpos foram detectados para anti-LID-1 (mediana da DO = 0,108; IQR = 0,113).

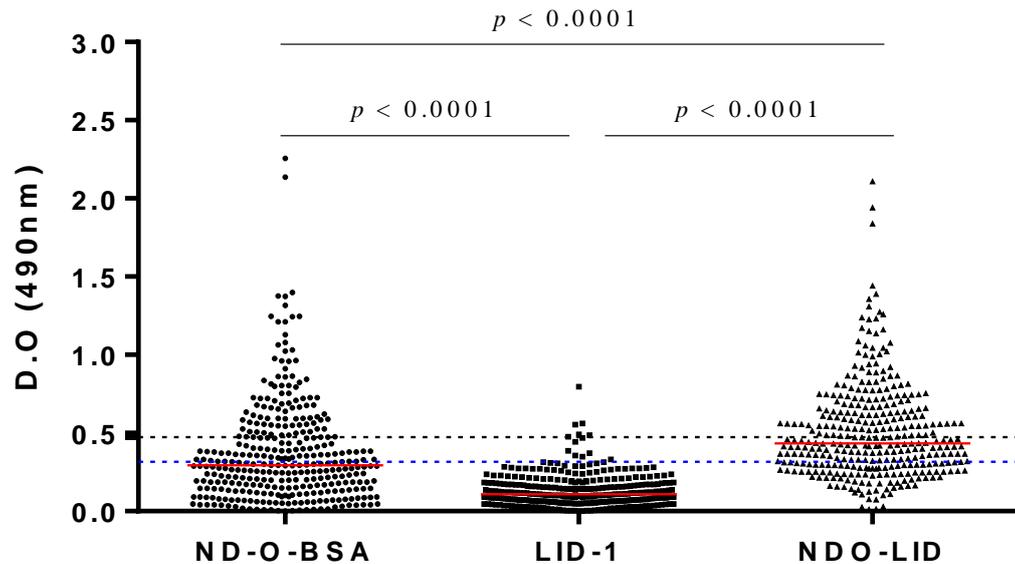


Figura 6. Títulos de anticorpos anti-ND-O-BSA, anti-LID-1 e anti-NDO-LID em amostras de plasma dos estudantes. Cada ponto representa o valor médio da densidade óptica (DO) das amostras de plasma individuais. A linha horizontal vermelha representa a mediana de cada grupo. A linha horizontal descontinua inferior (azul) representa o cut-off ($DO \geq 0,295$) para ND-O-BSA e LID-1 e a linha horizontal descontinua superior (preta) representa o cut-off ($DO \geq 0,475$) para o NDO-LID.

Os contatos intradomiciliares dos estudantes que foram diagnosticados como casos novos apresentaram percentual de soropositividade de 4,6% (6/131) para anticorpos anti-LID-1, de 37,4% (49/131) para anticorpos anti-NDO-LID e o maior percentual de soropositividade de 44,3% (58/131) foi observado para anticorpos anti-ND-O-BSA (tabela 3).

Tabela 3. Sororeatividade dos anticorpos anti-ND-O-BSA, anti-LID-1 e anti-NDO-LID em amostra de plasma dos contatos dos estudantes diagnosticados com hanseníase por ELISA.

	Positivo *		Negativo		Total
	N	(%)	n	(%)	
ND-O-BSA	58	44,3	73	55,7	131
LID-1	6	4,6	125	95,4	131
NDO-LID	49	37,4	82	62,6	131

* $p < 0,0001$. Teste qui-quadrado.

A figura 7 ilustra os níveis de anticorpos dos contatos intradomiciliares dos estudantes casos novos. Os títulos de anticorpos mais altos também foram observados para anticorpos anti-

NDO-LID (mediana da DO = 0,408 (IQR = 0,313), seguido dos anticorpos ND-O-BSA (mediana da DO = 0,267 (IQR = 0,328) e LID-1 (mediana da DO= 0,133; IQR = 0,102), respectivamente.

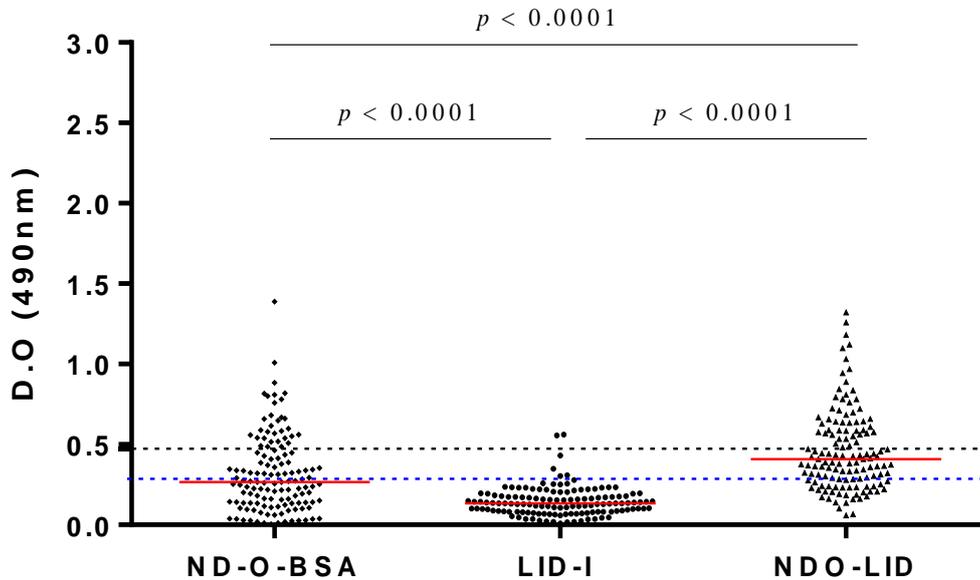


Figura 7. Títulos de anticorpos anti-ND-O-BSA, anti-LID-1 e anti-NDO-LID nos contatos intradomiciliares dos estudantes diagnosticados com hanseníase. Cada ponto representa o valor médio da densidade óptica (DO) das amostras de plasma individuais. A linha horizontal contínua representa a mediana de cada grupo. A linha horizontal descontinua inferior (azul) representa o cut-off ($DO \geq 0,295$) para ND-O-BSA e LID-1 e a linha horizontal descontinua superior (preta) representa o cut-off ($DO \geq 0,475$) para o NDO-LID.

Em relação aos casos novos diagnosticados entre os estudantes e os contatos intradomiciliares a proporção de soropositividade entre os mesmos foi de apenas 3,5% (2/57) anti-LID-1, de 40,4% (23/57) para anticorpos anti-NDO-LID e a maior proporção de soropositividade 45,6% (26/57) foi para anti-ND-O-BSA. Os níveis dos anticorpos anti-NDO-LID foram novamente mais elevados, seguido do anti-ND-O-BSA e anti-LID-1 (Figura 8). Esses casos novos foram classificados em 11 PB (8I e 3T) e 46 MB (24BT, 19BB, 2LL e 1 primariamente neural). O percentual de positividade entre os PB foi de 0,0% para o LID-1, 54,5% para o NDO-LID e a maior taxa de positividade foi de 72,7% para o ND-O-BSA. Já para

os MB foi de 4,3% (2/46) para o LID-1, 37,0% (17/46) para o anti-NDO-LID e a maior taxa de positividade 39,1% (18/46) foi também observado para o ND-O-BSA entre esse grupo.

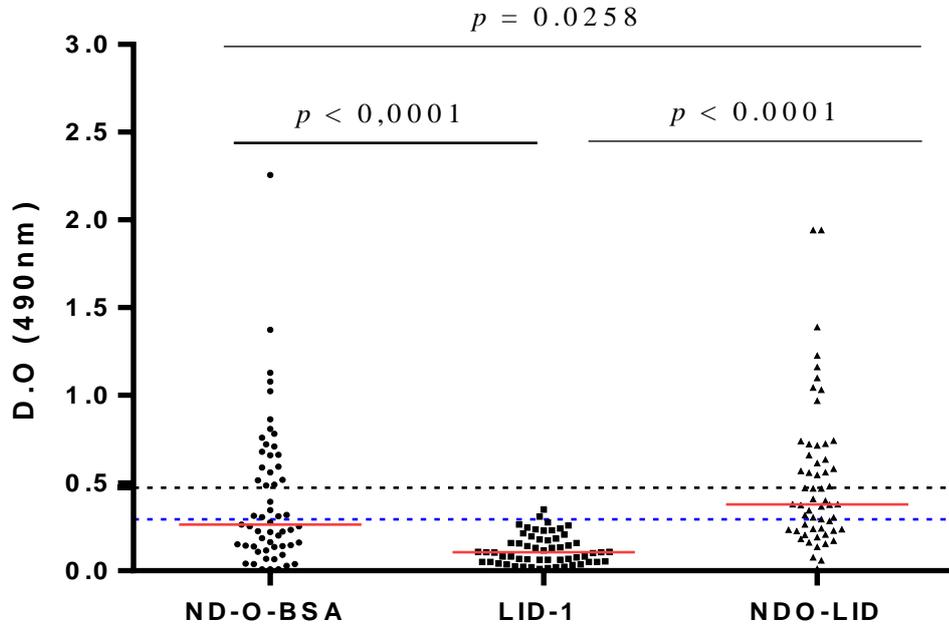


Figura 8. Títulos de anticorpos anti-ND-O-BSA, anti-LID-1e anti-NDO-LID nos casos novos. Cada ponto representa o valor médio da densidade óptica (DO) das amostras de plasma individuais. A linha horizontal vermelha representa a mediana de cada grupo. A linha horizontal descontínua inferior (azul) representa o cut-off ($DO \geq 0,295$) para ND-O-BSA e LID-1 e a linha horizontal descontínua superior (preta) representa o cut-off ($DO \geq 0,475$) para o NDO-LID.

Foram também comparados os níveis de anticorpos anti-ND-O-BSA, anti-LID-1 e anti-NDO-LID nos três diferentes grupos estudados: casos novos, contatos intradomiciliares e estudantes. Para os anticorpos anti-LID-1 os níveis de anticorpos foram baixos e a DO da maioria dos indivíduos, tanto indivíduos sem manifestações clínicas quanto doentes ficou abaixo do limite de detecção (figura 9) e a diferença estatística observada não foi significativa.

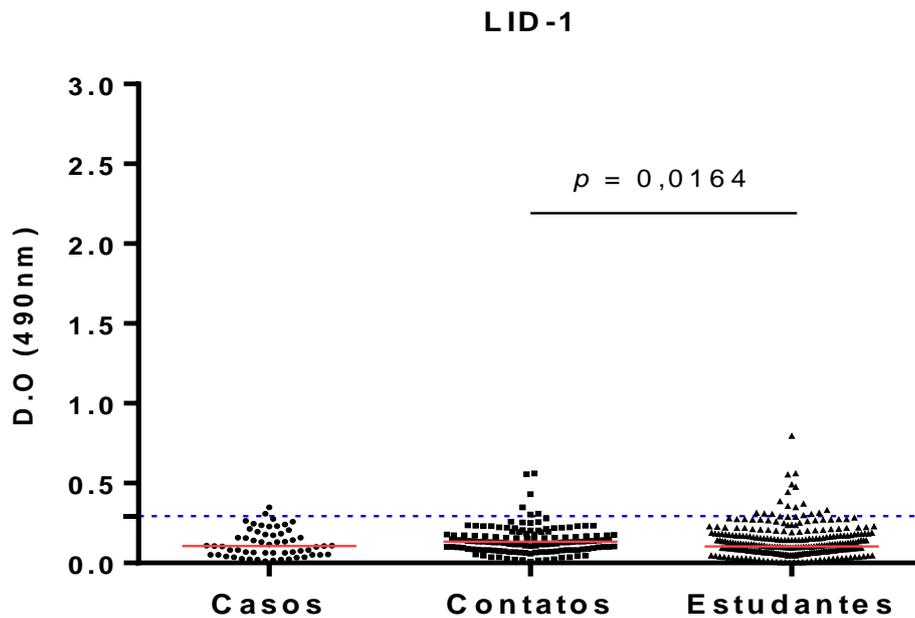


Figura 9. Comparação dos níveis de anticorpos anti-LID-1 em casos novos, contatos intradomiciliares e estudantes. Cada ponto representa o valor médio da densidade óptica (DO) das amostras de plasma individuais. A linha horizontal vermelha representa a mediana de cada grupo e a linha horizontal descontinua (azul) representa o cut-off ($DO \geq 0,295$) para o LID-1.

Com relação aos níveis de anticorpos anti-NDO-LID e ND-O-BSA, a DO da maioria dos indivíduos ficou no limite de detecção como ilustrado na figura 10 e 11, respectivamente. Embora não tenha sido observada diferença estatística significativa entre os diferentes grupos estudados, foi possível identificar um maior número de casos novos com sorologia anti-ND-O-BSA positiva.

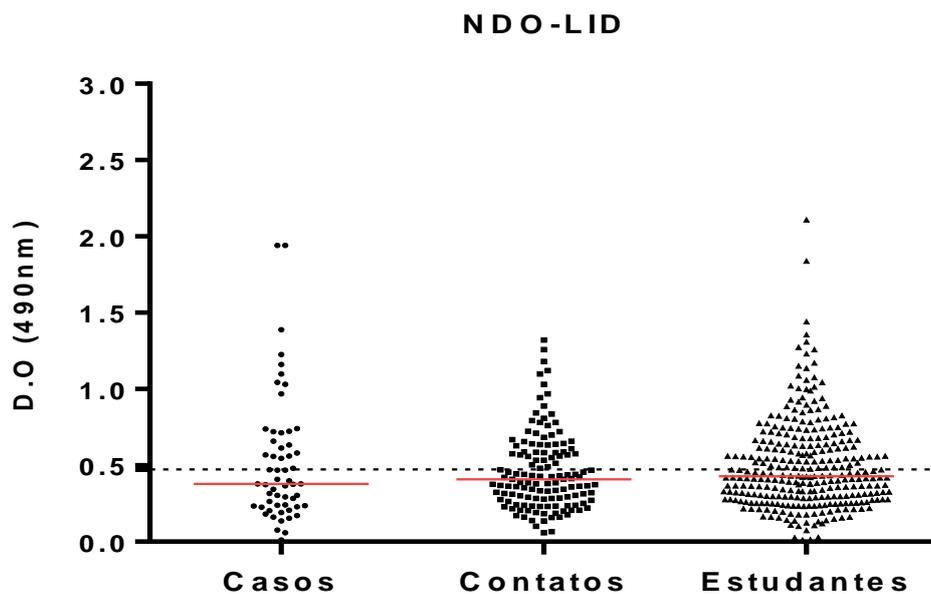


Figura 10. Comparação dos níveis de anticorpos anti-NDO-LID em casos novos, contatos intradomiciliares e estudantes. Cada ponto representa o valor médio da densidade óptica (DO) das amostras de plasma individuais. A linha horizontal vermelha representa a mediana de cada grupo e a linha horizontal descontínua (preta) representa o cut-off ($DO \geq 0,475$) para o NDO-LID.

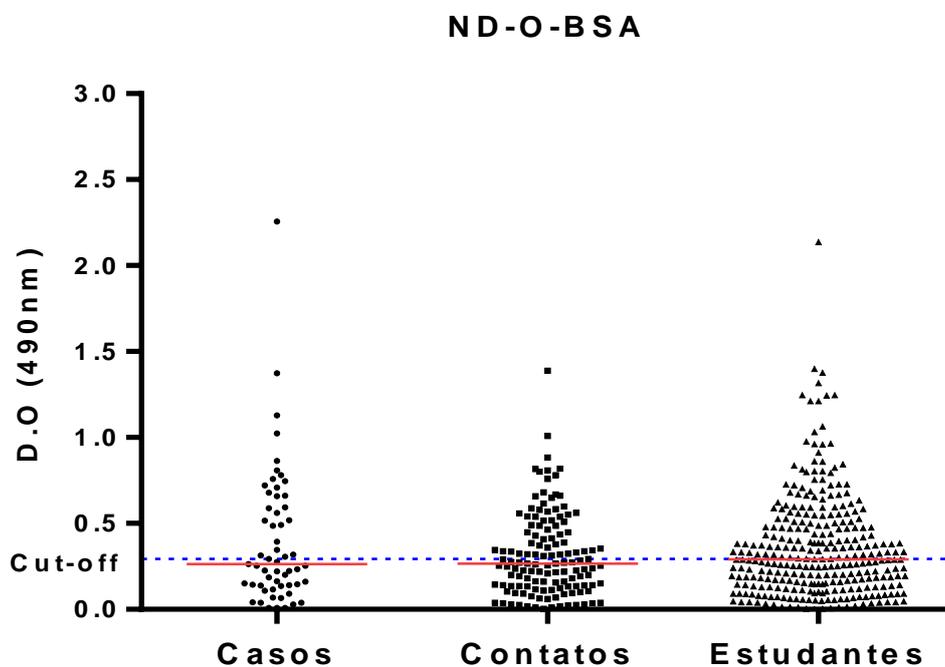


Figura 11. Comparação dos níveis de anticorpos anti-ND-O-BSA em casos novos, contatos intradomiciliares e estudantes. Cada ponto representa o valor médio da densidade óptica (DO) das amostras de plasma individuais. A linha horizontal vermelha representa a mediana de cada grupo e a linha horizontal descontínua (azul) representa o cut-off ($DO \geq 0,295$) para o ND-O-BSA.

A fim de verificar o grau de associação entre os antígenos avaliados, analisamos a correlação dos títulos dos anticorpos contra o ND-O-BSA e LID-1 individualmente e com o antígeno LID-NDO (Figura 12). A associação entre LID-1 versus ND-O-BSA apresentou um coeficiente de correlação igual 0,33 e LID-1 versus NDO-LID foi de 0,42, mostrando que houve uma fraca e regular correlação, respectivamente, entre os antígenos associados. No entanto, na associação entre ND-O-BSA versus NDO-LID o coeficiente de correlação igual 0,72, indicou que houve uma forte correlação na resposta dos anticorpos contra esses antígenos.

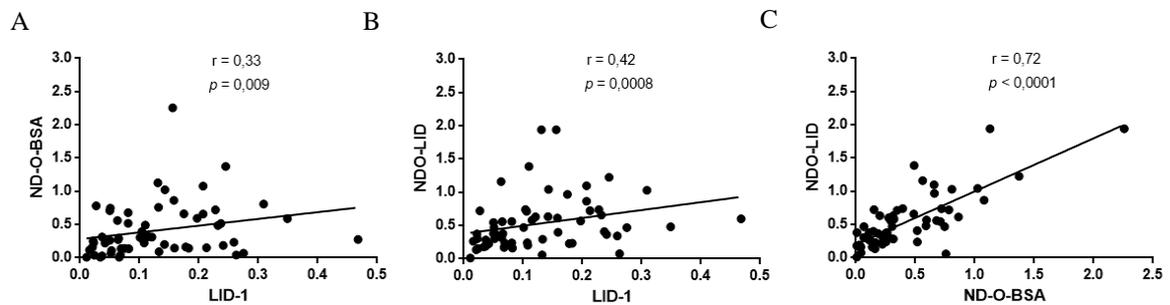


Figura 12. Correlação de Spearman entre títulos de anticorpos em amostras de casos novos de hanseníase entre estudantes e contatos intradomiciliares. Cada ponto representa a D.O obtida para cada antígeno em uma única amostra de soro. A linha contínua representa a correlação dos resultados. (A) anti-ND-O-BSA x LID-1; (B) anti-LID-1 x anti-NDO-LID; (C) ND-O-BSA x NDO-LID.

A sororeatividade de anticorpos contra o antígeno NDO-LID recentemente conjugado foi avaliada por ELISA e pelo teste rápido OrangeLife[®] em amostras de plasma de 247 estudantes sem manifestações clínicas. A soropositividade para o ELISA anti-NDO-LID foi de 43,3% (107/247) e para o teste rápido OrangeLife[®] foi de 47,4% (117/247). A comparação direta das respostas sorológicas do ELISA anti-NDO-LID com os resultados do teste rápido Orange Life[®] (soropositivos e soronegativos) (tabela 4) permitiu observar que houve um baixo grau de concordância de 58,7% (valor de Kappa = 0,16) entre os dois testes analisados e a taxa de discordância observada foi 41,3%.

Tabela 4. Comparação entre ELISA anti-NDO-LID e teste rápido OrangeLife® em estudantes sem manifestações clínicas

Teste rápido	ELISA		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo Forte	11	6	17
Positivo Fraco	50	50	100
Negativo	46	84	130
Total	107	140	247

Entre os contatos intradomiciliares, que representam um importante grupo de estudo, uma vez que se acredita estarem expostos ao *M. leprae* a uma frequência maior que a população em geral, um total de 215 indivíduos foram avaliados e dentre estes, a soropositividade para ELISA anti-NDO-LID foi de 37,7% (81/215) e de 36,3% (78/215) para o teste rápido Orange Life®. Comparando-se os resultados entre o ELISA anti-NDO-LID e o teste rápido (tabela 5) observou-se um baixo grau de concordância de 67,9% (146/215) (valor de Kappa = 0,31) entre os dois testes sorológicos analisados e taxa de discordância foi de 32,1%.

Tabela 5. Comparação entre ELISA anti-NDO-LID e teste rápido OrangeLife® em contatos intadomiciliares sem manifestações clínicas

Teste rápido	ELISA		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo Forte	14	3	17
Positivo Fraco	31	30	61
Negativo	36	101	137
Total	81	134	215

Também foram comparados os resultados dos dois testes analisados entre os casos novos de hanseníase diagnosticados entre os estudantes e seus contatos intradomiciliares. O percentual de positividade para o ELISA anti-NDO-LID foi de 49,4% e para o teste rápido OrangeLife® foi de 41,8%. Dos 79 casos novos, 61 eram MB e 18 PB e a taxa de

positividade para o ELISA anti-NDO-LID entre os MB foi de 44,3% (27/61); (mediana da DO = 0,401, IQR = 0,445). Como esperado a positividade variou nas diferentes formas clínicas MB: 87,5% para pacientes LL (7/8; mediana da DO = 0,699 IQR 0,381), 40% para BB (8/20; mediana da DO = 0,394 IQR 0,363), 37,5% para BT (19/32; mediana da DO = 0,377 IQR 0,481).

Para o teste rápido OrangeLife® a taxa de soropositividade foi 44,3% (27/61) para indivíduos MB. Ao longo do espectro das formas clínicas MB o percentual de positividade foi de 60% para BB (12/20), 37,5% para LL (3/8) e 34,4% para BT (11/32). Já para as formas clínicas PB foi de 33,3% (6/18), sendo todos os indivíduos soropositivos portadores da forma I.

Quando se comparam os resultados do teste rápido com o ELISA anti-NDO-LID (Tabela 6) nos casos novos de hanseníase, observa-se um baixo índice Kappa (valor de Kappa = 0,34), indicando um baixo grau de concordância de 67,1,% (53/79) entre os testes em estudo e taxa de discordância foi de 32,9%.

Tabela 6. Comparação entre ELISA anti-NDO-LID e teste OrangeLife® em casos novos entre estudantes e contatos intradomiciliares

Teste rápido	ELISA		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo Forte	10	1	11
Positivo Fraco	13	9	22
Negativo	16	30	46
Total	39	40	79

4.3. Indivíduos avaliados em T1 e reavaliados em T2 (seguimento clínico e sorológico)

Em nossa primeira visita T1 ao município de Breves selecionamos um grupo de 40 indivíduos inicialmente sem manifestações clínicas de hanseníase baseado na sorologia anti-

ND-O-BSA (12 positivos e 28 negativos), anti-LID-1 (11 positivos e 29 negativos) e anti-NDO-LID (11 positivos e 29 negativos). Ao retornamos ao município em T2, dois anos depois da primeira avaliação, reavaliamos estes indivíduos e 35% (14/40) apresentavam sinais clínicos da doença e foram diagnosticados como casos novos de hanseníase.

Para a sorologia anti-LID-1 foi observado também um percentual de positividade de 25% (10/40) dos indivíduos avaliados. Em relação aos casos novos detectados, 50% (5/10) foram detectados entre os indivíduos soropositivos e 30% (9/30) entre os indivíduos soronegativos (tabela 7).

Tabela 7. Casos novos de hanseníase detectados entre indivíduos com sorologia anti-LID-1 positiva ou negativa

ELISA anti-LID-1 avaliados (T1)	Indivíduos examinados		Casos novos diagnosticados (T2)	
		n		n (%)
Positivo		10		5 (50)
Negativo		30		9 (30)
Total		40		14

$p = 0,2508$. Teste qui-quadrado.

Já para a sorologia anti-NDO-LID, dos 40 indivíduos avaliados também foi observado um percentual de soropositividade de 27,5% (11/40) e dos 14 casos novos detectados 54,5% (6/11) foram detectados entre os indivíduos anti-NDO-LID positivos e 27,6% (8/29) foram detectados entre os indivíduos negativos (tabela 8).

Tabela 8. Casos novos de hanseníase detectados entre indivíduos com sorologia anti-NDO-LID positiva ou negativa

ELISA anti-NDO-LID avaliados (T1)	Indivíduos examinados		Casos novos diagnosticados (T2)	
		n		n
Positivo		11		6 (54,5)
Negativo		29		8 (27,6)
Total		40		14

$p = 0,1104$. Teste qui-quadrado.

A sorologia anti-ND-O-BSA apresentou o percentual de positividade mais elevado 30% (12/40) e dentre os indivíduos positivos um maior número de indivíduos 7 (58,3%) foram diagnosticados. Foi observada diferença estatisticamente significativa de soropositividade entre os indivíduos que desenvolveram e os que não desenvolveram a doença (Tabela 9).

Tabela 9. Casos novos de hanseníase detectados entre indivíduos com sorologia anti-ND-O-BSA positiva ou negativa*

ELISA anti-ND-O-BSA avaliados (T1)	Indivíduos examinados		Casos novos diagnosticados (T2)
	n		n (%)
Positivo	12		7 (58,3)
Negativo	28		7 (25)
Total	40		14

* $p = 0,0428$. Teste qui-quadrado.

5. DISCUSSÃO

A hanseníase permanece como um importante problema de saúde pública em muitos países e o Brasil ocupa o segundo lugar em número de casos registrados em todo mundo. Apesar do sucesso da PQT na redução do número de casos, ainda existe a necessidade de melhores estratégias para o controle e prevenção de incapacidades em pessoas acometidas pela hanseníase.

A estratégia de busca ativa permite a identificação de casos novos precocemente, principalmente as formas clínicas PB ou as formas MB no estágio inicial, nas quais os pacientes ainda não apresentam incapacidades. Além disso, previne a disseminação da infecção e contribui para a quebra da cadeia da infecção, a qual é responsável pelas altas taxas de incidência observada. Utilizando a estratégia de visitar casos-índice e a partir destes examinar seus contatos intradomiciliares, assim como visitar escolas e examinar estudantes detectamos um elevado número de casos novos de hanseníase.

Entre os 280 contatos intradomiciliares avaliados em T1 e 131 em T2, detectamos 18,6% e 19,8% de casos novos de hanseníase, respectivamente, e entre os 229 estudantes avaliados em T1 e 331 avaliados em T2 foram detectados 6,1% e 9,4%, respectivamente. O percentual mais elevado de casos novos detectados em estudantes em T2 se deve ao fato de na segunda visita que realizamos ao município, as escolas previamente selecionadas para serem visitadas estarem localizadas dentro de áreas do município onde se concentram o maior número de casos, corroborando com Barreto *et al*, (2014) que observaram que a seleção de escolas baseada na epidemiologia espacial aumenta a eficiência na detecção do número casos novos.

No Brasil, este elevado número de casos novos de hanseníase diagnosticados pode ser explicado pelo fato de apenas 60% da população brasileira ter acesso ao serviço de atenção primária à saúde, o qual é responsável por diagnosticar a hanseníase, tratar e prevenir incapacidades nesses doentes e examinar seus contatos intradomiciliares. No estado do Pará,

apenas 42% da população tem acesso à estratégia saúde da família (ESF), e no Município de Breves a situação é ainda pior, uma vez que a estimativa da população coberta por esta estratégia é de apenas 20% (MS.dab.saude.gov.br/ histórico_cobertura_sf.php, 2014). Além disso, mesmo em áreas com cobertura pela ESF, em casas de pacientes onde o grupo de pesquisadores compareceu juntamente com profissionais de saúde da área coberta, o número de casos novos diagnosticados foi alto, indicando que parece haver uma dificuldade da equipe local em fazer o diagnóstico precoce, que nem sempre tem sinais clínicos óbvios de hanseníase, como os encontrados em pacientes MB polares clássicos, como os BL e os LL.

Nossos dados corroboram com outros recentes estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa que detectaram também elevados números de casos novos em estudantes (0,4 a 6,1%) e com outros estudos que também observaram alto percentual de casos novos em crianças (SILVA *et al*, 2007; SANTOS *et al*, 2010; LANA *et al*, 2013). Este cenário sugere alta exposição e transmissão precoce ao *M. leprae*, uma vez que a maioria dos casos foi diagnosticada em estudantes que tinham menos de 15 anos de idade. Felizmente, apesar do predomínio das formas MB, nenhum dos novos casos detectados por nosso grupo entre os estudantes apresentou algum grau de incapacidade. Nossos dados reforçam a importância da identificação e tratamento da doença nos estágios iniciais a fim de prevenir a evolução da doença para formas potencialmente incapacitantes, evitando assim a propagação da infecção entre os indivíduos e contribuindo para a quebra da cadeia de transmissão da doença.

Entre os contatos intradomiciliares, nosso grupo de pesquisa também detectou previamente alto percentual de casos novos (2,6 a 9,4%) (BARRETO *et al*, 2011, 2012; Salgado *et al*, 2012) e um resultado semelhante foi observado por Moura *et al* (2013) e Duppre *et al* (2012). Nossos dados confirmam a necessidade do exame e vigilância ativa dos contatos intradomiciliares e indicam também que essas ações devem ser realizadas periodicamente, uma vez que, o período de incubação da doença em humanos é longo, com um tempo médio de 3 a 5

anos, embora possa levar décadas, como relatado recentemente em um caso em um chimpanzé que desenvolveu as lesões clínicas da hanseníase 30 anos após a infecção (SUZUKI *et al*, 2010). Além disso, evidências relatam que os contatos intradomiciliares de pacientes MB sem tratamento apresentam um risco maior de desenvolver a hanseníase, em comparação com a população geral, sendo que entre os contatos soropositivos para anti-PGL-I esse risco é ainda mais elevado (BRASIL *et al*, 2003; DOUGLAS *et al*, 2004; BAKKER *et al*, 2006; MOET *et al*, 2006). Os contatos sociais (pessoas que frequentam o domicílio do caso índice ou aquelas que mantem relação profissional ou de amizade fora do domicílio com este caso) e vizinhos de casos de hanseníase sem tratamento também tem sido relatados com um maior risco de desenvolver a hanseníase (VAN BEERS *et al*, 1999; BAKKER *et al*, 2004; CALADO *et al*, 2005; MOURA *et al*, 2013; BARRETO *et al*, 2014).

De acordo com os registros do SINAN, no período compreendido entre 2006 a 2010 foram diagnosticados no município de Breves 233 casos novos de hanseníase por meio do sistema de saúde local, com a detecção de casos baseada principalmente na demanda espontânea nas unidades básicas de saúde do município. Utilizando a estratégia de busca ativa e exame de escolares para a detecção de casos novos, foi possível detectar 33,5% dos casos detectados em cinco anos pelo sistema de saúde pública, em apenas uma semana de trabalho em campo. É importante ressaltar que nas duas visitas que fizemos ao município em um intervalo de tempo de 2 anos, o número de casos novos detectados foi praticamente o mesmo, o que indica que a saúde pública do município não tem sido capaz de detectar os casos novos ao longo do tempo, e se essa realidade não mudar, o número desses casos continuará elevado durante as campanhas, por muitos anos.

Em relação aos 331 estudantes avaliados também observamos um alto percentual de 49,5% de soropositividade anti-ND-O-BSA. Esses dados também corroboram com outros estudos realizados por nosso grupo que relataram 42% a 66,5% (BARRETO *et al*, 2011;

SALGADO *et al*, 2012), e nossos resultados foram muito mais elevados que outros dados publicados (ABE *et al*, 1990; VAN BEERS *et al*, 1999; BUHRER-SEKULA *et al*, 2008). Em um de nossos estudos foram avaliadas 1.592 crianças selecionadas aleatoriamente de 8 municípios hiperendêmicos no Pará que revelou que 4% foram diagnosticados com hanseníase, estimando-se que pode haver até 80 mil casos de hanseníase não diagnosticados entre os estudantes do Pará.

Estudos anteriores demonstraram um alto percentual de contatos intradomiciliares soropositivos para IgM anti-PGL-I, variando de 30 a 60%, o que é considerado muito elevado (BARRETO *et al*, 2011,2012; SALGADO *et al*, 2012) e foram diferente de outros estudos realizados no Brasil como observado por Duppre *et al* (2012) que detectou sorologia anti-PGL-I em apenas 16% dos indivíduos avaliados. No entanto, este percentual elevado tem sido corroborado pelo alto número de casos encontrados em nossos trabalhos de campo e parece corresponder a uma alta titulação de anticorpos nessa população, e vice-versa.

Em nosso estudo, a soropositividade anti-ND-O-BSA de 44,3% detectada, corrobora com outros estudos recentes realizados pelo nosso grupo de pesquisa, nos quais foram detectados percentuais de soropositividade igualmente elevados em contatos intradomiciliares, que variaram de 39% a 45% (BARRETO *et al*, 2011, 2012; SALGADO *et al*, 2012). Nossos resultados foram mais elevados comparado com outros estudos que variaram de 1,9% a 18,4% em contatos intradomiciliares (ROCHE *et al*, 1999; DOUGLAS *et al*, 1992; CHANTEAU *et al*, 1993; CALADO *et al*, 2005; MOURA *et al*, 2008; BAZAN-FURINI *et al*, 2011; DUPPRE *et al*, 2012).

Entre os casos novos diagnosticados em nosso estudo a taxa de positividade foi de 45,6% para a sorologia anti-ND-O-BSA o que pode ser explicado pelo fato de a maioria dos casos novos recém-diagnosticados apresentarem a forma clínica BT, na qual a carga bacteriana é geralmente baixa e apresenta uma resposta humoral não definida. Esta forma clínica da

hanseníase apresenta, portanto, o percentual de soropositividade mais baixo entre as formas MB.

Além de anticorpos anti-ND-O-BSA, os níveis de anticorpos anti-LID-1 e anti-NDO-LID foram também titulados nos mesmos grupos de indivíduos. Observamos uma baixa proporção de positividade para a sorologia anti-LID-1 em casos novos, estudantes e contatos intradomiciliares quando comparado com o anti-ND-O-BSA e anti-NDO-LID. Também observamos que não houve diferença entre estudantes e contatos intradomiciliares sem manifestações clínicas dos indivíduos que estavam doentes, indicando que não foi possível diferenciar indivíduos doentes dos indivíduos sem manifestações clínicas.

Além da baixa positividade da sorologia anti-LID-1, também observamos um coeficiente r que indicou uma fraca e regular correlação quando avaliamos a associação dos títulos dos anticorpos ND-O-BSA versus LID-1 e entre NDO-LID versus LID-1, respectivamente, diferente do que foi observado para ND-O-BSA versus NDO-LID, no qual o coeficiente r indicou uma correlação muito forte entre esses antígenos. Esses dados indicam que a combinação dos antígenos ND-O-BSA e LID-1 parece não aumentar a reatividade do antígeno conjugado comparado com a capacidade de detecção dos antígenos individualmente, e o percentual de positividade atribuído ao conjugado parece estar relacionado ao antígeno ND-O-BSA.

A sorologia anti-NDO-LID apresentou uma proporção de soropositividade em casos novos, semelhante ao anti-ND-O-BSA e uma taxa de positividade elevada em contatos intradomiciliares e em estudantes (aqui representando a população em geral). Nossos achados diferem do grupo que desenvolveu este novo antígeno, que relataram que o mesmo apresentou baixa soropositividade em contatos intradomiciliares e controles endêmicos (CARDOSO et al, 2013; DUTHIE et al, 2014).

Comparamos os resultados da detecção de anticorpos pelo método de ELISA com o teste rápido de fluxo lateral OrangeLife® recém-desenvolvido que emprega o antígeno conjugado NDO-LID nos três grupos de indivíduos em estudo. O percentual de soropositividade do ELISA anti-NDO-LID e do teste rápido OrangeLife® foi de 44,3% para ambos os testes em pacientes MB, o que pode ser justificado por se tratar de pacientes BT, como dito anteriormente. Também avaliamos o teste rápido em estudantes saudáveis, a fim de observar a sensibilidade do teste em controles endêmicos e em contatos intradomiciliares. Nesses dois últimos grupos, a soropositividade do ELISA anti-NDO-LID foi ligeiramente mais baixa comparada aos casos novos e para o teste rápido OrangeLife® foi mais elevada em estudantes, seguida dos casos novos e contatos intradomiciliares.

Nossos achados diferem do grupo que desenvolveu este novo antígeno, que relataram que o mesmo apresentou baixa soropositividade em contatos intradomiciliares e controles endêmicos tanto por ELISA quanto pelo teste rápido (CARDOSO *et al*, 2013; DUTHIE *et al*, 2014). É importante ressaltar esses autores não foram observaram respostas positivas em controles endêmicos pelo método de ELISA, enquanto em nosso estudo foi apenas ligeiramente inferior ao observado para pacientes já diagnosticados. Esses dados sugerem que o antígeno NDO-LID precisa ser mais bem estudado em contatos intradomiciliares e na população em geral em regiões de alta endemicidade antes de ser utilizado como ferramenta de diagnóstico e como indicador de prognóstico de casos novos de hanseníase como sugerido pelos autores.

De acordo com Cardoso et al (2013) o teste rápido apresentou um alto valor de índice kappa e 90,9% de concordância com o ELISA anti-ND-O-BSA. No entanto, a comparação direta dos resultados tanto em casos novos quanto em contatos intradomiciliares e estudantes indicou um baixo grau de concordância entre os dois métodos utilizados em nosso estudo. É digno de nota que no ELISA realizado pelos autores foi utilizado o antígeno ND-O-BSA na

comparação realizada entre os testes e não o antígeno conjugado que é utilizado no teste rápido, o que pode talvez limitar a comparação entre os testes.

É importante ressaltar que diversos fatores podem ser responsáveis pelas diferenças observadas nos percentuais de positividade nos diferentes grupos de pesquisa. Dentre elas, destacam-se as diferenças de endemicidade regionais, considerando que no Brasil a hanseníase apresenta uma distribuição geográfica heterogênea e o estado do Pará é considerado hiperendêmico, esses percentuais tendem a serem maiores. Além disso, a falta de uma padronização nos protocolos de ELISA entre os diferentes grupos de pesquisa, o tipo de antígeno e os diferentes testes rápidos utilizados também são fatores que contribuem para essas diferenças de positividade e dificultam uma comparação mais fidedigna.

A aplicação de um teste rápido, sensível e específico, principalmente em situações de trabalho em campo, sem dúvida poderia oferecer inúmeras vantagens, tais como auxílio na classificação da doença e rapidez no resultado. Além disso, não requer equipamentos específicos, os reagentes são estáveis à temperatura ambiente e não requer pessoal altamente treinado. No entanto, a aplicação de um teste rápido deve ser exaustivamente estudada, particularmente em diferentes populações endêmicas antes de ser recomendado como teste de diagnóstico.

Em nossa primeira visita ao município de Breves selecionamos um grupo de 40 indivíduos inicialmente saudáveis, baseado na sorologia anti-ND-O-BSA (12 indivíduos positivos e 28 negativos). Ao retornamos ao município e reavaliarmos estes indivíduos, 35% apresentavam sinais clínicos da doença e foram diagnosticados como casos novos de hanseníase.

A fim de avaliar a aplicação dos antígenos anti-ND-O-BSA, anti-LID-1 e anti-NDO-LID no acompanhamento sorológico foi realizada a detecção desses anticorpos tanto em T1 (antes da evolução para caso novo) como em T2 (no momento do diagnóstico). Dentre os 40

indivíduos inicialmente saudáveis avaliados no seguimento, 12 foram positivos para a sorologia anti-ND-O-BSA, 11 para o anti-LID-1 e 11 para o anti-NDO-LID em T1. Já na segunda avaliação, 14 dos 40 indivíduos avaliados inicialmente foram diagnosticados como casos novos, e neste momento dentre os indivíduos anti-LID-1 e anti-NDO-LID positivos em T1, 45,6% e 54,5% respectivamente foram diagnosticados com hanseníase. É possível que a baixa positividade possa ser explicada pelo fato de os casos novos detectados terem sido recém-diagnosticados e a maioria apresentarem as formas clínicas BT, que embora classificadas como MB podem apresentar IB baixo e conseqüentemente um baixo título de anticorpos.

A sorologia anti-ND-O-BSA demonstrou ser mais efetiva entre os antígenos avaliados para auxiliar na detecção de novos casos de hanseníase, cuja capacidade de detecção foi significativamente mais elevada (58,3%) entre os indivíduos positivos. Além disso, ao reavaliarmos estes indivíduos observamos dentre os indivíduos negativos mais 4 indivíduos positivos, sendo que no momento do diagnóstico, 64,3% dos 14 casos novos diagnosticados apresentaram sorologia anti-ND-O-BSA positiva.

A quantificação dos níveis de anticorpos nos permitiu observar que a estratégia de seguimento sorológico aumentou o percentual de positividade para o antígeno ND-O-BSA, indicando que a avaliação sorológica pode recomendar a necessidade de uma avaliação clínica, parecendo ser uma estratégia eficaz para auxiliar no diagnóstico precoce da hanseníase, considerando a elevada incidência de novos casos detectados.

Baseado em nossos dados, acreditamos que a vigilância e a busca ativa e contínua de contatos intradomiciliares e crianças em idade escolar, principalmente de regiões hiperendêmicas, associada à quantificação sorológica periódica de anticorpos específicos ao *M. leprae*, poderiam funcionar como um alerta para uma avaliação clínica completa dessas populações. No entanto, para que seja possível esse diagnóstico é necessário que o clínico do Programa de Saúde da Família seja devidamente treinado para detectar casos de hanseníase

com sintomas claros e, principalmente, nos estágios iniciais e assim contribuir para a redução do número de novos casos e possivelmente para a quebra da cadeia de transmissão, diminuindo assim o número de casos, e a incapacidade física nas pessoas acometidas pela hanseníase.

6. CONCLUSÕES

1. A busca ativa de casos e o exame de escolares por profissionais com experiência em hanseníase resultaram na detecção de um número elevado de casos novos.
2. O alto número de casos novos diagnosticados pode indicar a dificuldade de acesso de pacientes ao sistema de saúde pública, e mesmo quando o acesso é possível, há pouca qualificação profissional para realizar o diagnóstico de hanseníase.
3. Foram detectadas altas taxas de positividade em contatos intradomiciliares e estudantes para anticorpos contra os antígenos ND-O-BSA, que mostrou maior capacidade de identificar um alto número de indivíduos doentes.
4. O percentual de positividade anti-NDO-LID foi ligeiramente menor que o observado para o anti-ND-O-BSA em todos os grupos estudados, não permitindo observar neste estudo um benefício adicional na conjugação do antígeno.
5. A baixa positividade e os baixos títulos de anticorpos anti-LID-1 detectados em casos novos e indivíduos sem manifestações clínicas neste estudo parecem limitar o uso do antígeno LID-1 na identificação de casos novos de hanseníase.
6. O grau de soropositividade do teste rápido Orange Life e do ELISA anti-NDO-LID parece ser limitante como ferramenta de diagnóstico em áreas endêmicas.
7. O seguimento sorológico dos indivíduos com altos títulos de anticorpos anti-ND-O-BSA demonstrou ser mais efetivo para auxiliar na detecção de novos casos de hanseníase.

7. REFERÊNCIAS

- ABULAFIA, J.; VIGNALE, R. A. Leprosy: pathogenesis updated. **International Journal of Dermatology**, v. 38, n.05, p. 321-334, 1999.
- AGRAWAL, A.; PANDIT, L.; DALAL, M.; SHETTY, J. P. Manifestations of Hansen's disease and their management. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, v. 107, p. 445-454, 2005.
- ARAÚJO, M. G. Hanseníase no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 03, p. 373-382, 2003.
- BATISTA, I. M. F. D.; SARTORI, B. C. S.; TRINO, L. M. Guia de conduta para a realização do exame baciloscópico. **Hansen int**, v. 31, n. 2, p. 39-41, 2006.
- BARRETO, J. G.; L, S. G.; LEÃO, M. R. N.; FERREIRA, D. V. G.; LIMA, R. A. A.; SALGADO, C. G. 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.; GUIMARÃES, L. S.; FRADE, M. A. C; ROSA, P. S.; SALGADO, C. G. High rates of undiagnosed leprosy and subclinical infection amongst school children in Amazon Region. **Mem, Inst Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 107, p. 60-67, 2012.
- BARRETO, J. G.; BISANCIO, D.; GUIMARÃES, L. S.; SPENCER, J. S.; VASQUEZ-PROKOPEC, G. M.; KITRON, U.; SALGADO, C. G. Spatial analysis spotlighting early childhood leprosy transmission in a hyperendemic municipality of the brazilian amazon region. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n.2, 2014.
- BAKKER, M.I.; HATTA, M.; KWENANG, A.; FABER, W. R.; VAN BEERS, S. M.; KLATSER, P. R.; OSKAM, L. Population survey to determine risk factors for *Mycobacterium leprae* transmission and infection. **International Journal of Epidemiology**, v. 33, n.6, p.1329-1336, 2004.
- BAKKER, M.; HATTA, M.; KWENANG, A.; VAN MOSSEVELD, P.; FABER, W.; KLATSER, P.; OSKAM, L. Risk factors for developing leprosy--a population-based cohort study in Indonesia. **Lepr Rev**, v. 77, p. 48 - 61, 2006.
- BAZAN-FURINI, R.; MOTTA, A. N. F.; SIMÃO, J.; C.; L.; TARQUÍNIO, D.; C.; MARQUES JR, W.; BARBOSA, H.; N.; FOSSI, N. T. Early detection of leprosy by examination of household contacts, determination of serum anti-PGL-1 antibodies and consanguinity, **Mem, Inst Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 107, 2012.
- BRASIL, M. T. L. R. F.; OLIVEIRA, L. R.; RÍMOLI, N. S.; CAVALLARI, S.; GONÇALVES, S. O.; LESSA, Z. L.; ROTTA, O. Serology Anti PGL-1 and the Risk of Leprosy in a Highly Endemic Area in the State of São Paulo, Brazil: Four-Year Follow-Up. **Rev Bras Epidemiol**, v. 6, p. 262 - 267, 2003.
- BECHELLI, L. M.; CURBAN, G. V. **Compêndio de Dermatologia**. 6 ed. São Paulo: Atheneu, 1998.

BRASIL Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Programas Especiais de Saúde. Divisão Nacional de Dermatologia Sanitária. **Controle da hanseníase**: uma proposta de integração ensino-serviço. Rio de Janeiro: DNDSNUTES, 1989.

BRASIL, Área Técnica de Dermatologia Sanitária. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Manual de Incapacidades**. Brasília: Ministério da Saúde, p. 107, 2001.

BRASIL, Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Guia para o controle da hanseníase**. 3. Ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2002.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Cadernos de atenção básica nº 21 – Vigilância em saúde**: Série A. Normas e manuais técnicos. Brasília: Ed MS, 2007.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Vigilância em Saúde: situação epidemiológica da hanseníase no Brasil**. SVS/DVE/PNCH. Brasília, 2008.

BRASIL, Guia de vigilância epidemiológica. Normas e Manuais Técnicos. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde, 2009.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Hanseníase no Brasil: dados e indicadores selecionados**. Brasília: Ministério da Saúde, 2009a.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Portaria Conjunta nº 126, de 26 de março de 2009**. Brasília: Ministério da Saúde, 2009b.

BRASIL. Portaria 3.125, de 7 de outubro de 2010: aprova as diretrizes para vigilância, atenção e controle da hanseníase. Brasília: Ministério da Saúde; 2010.

BRASIL, Ministério da Saúde. Sistema Nacional de Agravos de Notificação. Distribuição da Hanseníase no Brasil. Disponível em: [HTTP://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idxt=31200](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idxt=31200). Acesso em: 16 mar 2012a.

BRASIL. Indicadores epidemiológicos e operacionais da hanseníase, Brasil, 2001 - 2012. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2013. Available from: http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2013/Jul/16/tab_geral_indicadores_operacionais_epi_2001_2012.pdf.

BRASIL. Dados epidemiológicos da hanseníase por estados e regiões, Brasil, 2012. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2013. Available from: http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2013/Jul/16/tab_indicadores_epid_operacionais_2012.pdf

BRASIL. Ministério da Saúde, Departamento de atenção básica (2013) Histórico de cobertura da saúde da família. Available at: http://dab.saude.gov.br/portaldab/historico_cobertura_sf.php; accessed: 29 agosto de 2014.

- BRENNAN, P. J.; BARROW, W. W. Evidence for species-specific lipid antigens in *Mycobacterium leprae*. **Int J Lepr Other Mycobact. Dis**, v. 48, n4 p. 382-387, 1980.
- BUHRER-SÉKULA, S.; SMITH, H.L.; GUSSENHOVEN, G.C.; VANINGEN, C.W.; KLATSER, P.R. A simple dipstick assay for the detection of antibodies to phenolic glycolipid-I of *Mycobacterium leprae*. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, v. 58, n2, p. 133-136, 1998.
- BUHRER-SÉKULA, S.; SARNO, E.N.; OSKAM, L.; KOOP, S.; WICHERS, I.; NERY, J.A.; VIEIRA, L.M. Use of ML dipstick as a tool to classify leprosy patients. **Int. J. lepr. Others Mycobact. Dis**, v. 68, n4, p. 456-63, 2000.
- BUHRER-SEKULA, S.; SMITS, H. L.; GUSSENHOVEN, G. C.; VAN LEEUWEN, J.; AMADOR, S.; FUJIWARA, T.; KLATSER, P. R.; OSKAM, L. Simple and fast lateral flow test for classification of leprosy patients and identification of contacts with high risk of developing leprosy. **J. Clin. Microbiol**, v. 41, n5, p.1991–1995, 2003.
- BHAT, R. M.; PRAKASH, C. Leprosy: an overview of pathophysiology. **Interdisciplinary perspectives on infectious diseases**, v. 2012, p. 181089, jan. 2012.
- CALADO, K. L.S.; VIEIRA, A. D. G.; DURÃES, S.; SÉKULA, S. B.; OLIVEIRA, M. L.W. D. R.D. Positividade sorológica antiPGL-I em contatos domiciliares e peridomiciliares de hanseníase em área urbana. **An Bras Dermatol**. 80 (Supl 3): S301-6, 2005.
- CALLEGARI-JACQUES, S.; M. Bioestatística: princípios e aplicações. Porto Alegre: Artemed. 365 p. 90, 2003.
- CARDOSO, L. P.; DIAS, R.F.; FREITAS, A. A. F.; HUNGRIA, E. M.; OLIVEIRA, R. M.; COLLOVATI, M.; REED, S. G.; DUTHIE, M. S.; STFEFANI, M. M. A. Development of a quantitative rapid diagnostic test for multibacillary leprosy using smart phone technology. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, p. 497, 2013.
- CHANTEAU, S.; CARTEL, J. L.; ROUX, J. [Leprosy serology: current status and perspectives]. *Acta Leprologica* 8: 65-70, 1992.
- CHO, S. N.; CELLONA, R.V.; VILLAHERMOSA, L.G; FARJADO, T.T.; BALAGON, M.V.F.; ABALOS, R.M.; TAN, E.V.; WALS, G. P.; KIM, J. D.; BRENNAN, P. J. Detection of phenolic glycolipid I of *Mycobacterium leprae* in sera from leprosy patients before and after start of multidrug therapy. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 8, n1, p. 138-142, 2001.
- DOUGLAS, J. T.; STEVEN, L. M.; HIRSCH, D. S.; FUJIWARA, T.; NELSON, K. E.; MADARANG, M. G.; CELLONA, R. V. Evaluation of four semisynthetic mycobacterium leprae antigens with sera from healthy populations in endemic and non-endemic areas. **Lepr Rev**, v. 63, n.3, p. 199 -210, 1992.
- DOUGLAS, J. T.; CELLONA, R. V.; FAJARDO, T. T.; ABALOS, R. M.; BALAGON, M. V.; KLATSER, P. R. Prospective study of serological conversion as a risk factor for development of leprosy among household contacts. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 11, p. 897–900, 2004.
- DOS SANTOS, M. M. L.; AMARAL, S.; HARMEN, S. P.; JOSEPH, H. M.; FERNANDES, J. L.; COUNAHAN, M. L. The prevalence of common skin infections in four districts in Timor-Leste: a cross sectional survey. **BMC Infect Dis**, v. 10, 2010.

DUPPRE, N. C.; CAMACHO, L. A. B.; SALES, A. M, ILLARRAMENDI, X.; NERY, J. A. C.; SAMPAIO, E. P.; SARNO, E. N.; BUHRER-SEKULA, S. Impact of PGL-I Seropositivity on the Protective Effect of BCG Vaccination among Leprosy Contacts: A Cohort Study. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, 2012.

DUTHIE, M. S.; GOTO, W.; IRETON, G.C.; REECE, S.T.; CARDOSO, L.P.V; MARTELLI, C. M. T.; STEFANI, M.M.A.; NAKATANI, M.; DE JESUS, R. C.; NETO, E.M.; BALAGON, M. V. F.; TAN, E.; GELBER, R. H.; MAEDA, Y.; MAKINO, M.; HOFT, D.; REED, S. G. Use of protein antigens for early serological diagnosis of leprosy. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.14, p. 1400-1408, 2007.

DUTHIE, M. S.; IRETON, G. C.; REECE, G. C.; REECE, S. T.; GRASSI, S. L. H.; SOUSA, A. L. M.; MARTELLI, C. M.; BALAGON, M.V.F.; TAN, E.; STEFANI, M.M.; REED, S. G. Antigen-specific T cell responses of leprosy patients. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, p.1659-1665, 2008.

DUTHIE, M. S.; HAY, M. N.; MORALES, C. Z.; CARTER, L.; MOHAMATH, R.; ITO, L.; OYAFUSO, L. K.M.; MANINI, M. I. P.; BALAGON, M. V.; TAN, E. V.; SAUNDERSON, P. R.; REED, S. G.; CARTER, D. Rational Design and Evaluation of a Multiepitope Chimeric Fusion Protein with the Potential for Leprosy Diagnosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.17, n2, p. 298–303, 2010.

DUTHIE, M. S.; HAY, M. N.; RADA, E. M.; CONVIT, J.; ITO, L.; OYAFUSO, L. K. M.; MANINI, M. I. P.; GOULART, I. M. B.; LOBATO, J.; GOULART, L. R.; CARTER, D.; REED, S. G. Specific IgG antibody responses may be used to monitor leprosy treatment efficacy and as recurrence prognostic markers. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, 2011.

DUTHIE, M. S.; SAUNDERSON, P.; REED, S. G. The potential for vaccination in leprosy elimination: new tools for targeted interventions. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.107 (Suppl. I), 2012.

DUTHIE, M. S.; BALAGON, M. F.; MAGHANOY, A.; ORCULLO, F.M.; CANG, M.; DIAS, R.F.; COLLOVATI, M.; REED, S.G. Rapid quantitative serological test for detection of infection with *Mycobacterium leprae*, the causative agent of leprosy. **J Clin Microbiol**, v.52, n2, p. 613-619, 2014.

DUTHIE, M. S.; BALAGON, M. F.; MAGHANOY, A.; ORCULLO, F. M.; CANG, M.; DIAS, F. D.; COLLOVATI, M.; REED, S. G. Rapid Quantitative Serological Test for Detection of Infection with *Mycobacterium leprae*, the Causative Agent of Leprosy. **J Clin Microbiol**, v. 52, n2, p. 613-619, 2014.

DUTHIE, M. S.; RAYCHAUDHURI, R.; TUTTERROW, Y. L.; MISQUITH, A.; BOWMAN, J.; CASEY, A.; BALAGON, M. F.; MAGHANOY, A.; BELTRAN-ALZATE, J. C.; ROMERO-ALZATE, M.; CARDONA-CASTRO, N.; REED, S. R. A rapid ELISA for the diagnosis of MB leprosy based on complementary detection of antibodies against a novel protein-glycolipid conjugate. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 79, n2, p. 233-239, 2014.

FOSS, N.; T. Aspectos imunológicos da hanseníase. *Medicina, Ribeirão Preto*, v. 30, p. 335-339, 1997.

FOSS, N. T. Hanseníase: aspectos clínicos, imunológicos e terapêuticos. **An. Bras. de Dermatologia**, v. 74, n.2, p. 113-119, 1999.

FUJIWARA, T.; HUNTER, S. W.; CHO, S.N.; ASPINALL, G. O.; BRENNAN, P. J. Chemical synthesis and serology of disaccharides and trisaccharides of phenolic glycolipid antigens from the leprosy bacillus and preparation of a disaccharide protein conjugate for serodiagnosis of leprosy. **Infection and Immunity**, v. 43, p. 245-252, 1984.

GALLO, M. E. N.; JÚNIOR, L. A. N. R.; DE ALBUQUERQUE, E. C. A.; NERY, J. A. C.; SALES, A. M. Alocação do paciente hanseniano na poliquimioterapia: correlação da classificação baseada no número de lesões cutâneas com os exames baciloscópicos. **An. Bras Dermatol**, v. 78, n. 4, p. 415- 424, 2003.

GARBINO, J. A.; URA, S.; BELONE, A.F.F.; MARCIANO, L. H. S. C.; FLEURY, R. N. Aspectos clínicos e diagnósticos da hanseníase primariamente neural. **Hansenol Int**, v. 29, n.2, p. 124-129, 2004.

GELUK, A.; DUTHIE, M.; 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. 402–421, 2011.

HUNGRIA, E. M.; OLIVEIRA, R. M.; SOUZA, A. L. O. M.; COSTA, M. B.; SOUZA, V. N. B.; SILVA, E. A.; MORENO, F. R. V.; NOGUEIRA, M. E. S.; COSTA, M. R. S. N.; SILVA, S. M. U. R.; BÜHRER-SÉKULA, S.; REED, S. G.; DUTHIE, M. S.; STEFANI, M. M. A. Seroreactivity to new *Mycobacterium leprae* protein antigens in different leprosy-endemic regions in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 107(Suppl. D): 104-111, 2012.

HUNTER, S. W.; BRENNAN, P. J. A novel phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae* possibly involved in immunogenicity and pathogenicity. **J bacterial**, vol. 147: 726-35, 1981.

ISHII, N. Recent advances in the treatment of leprosy. **Dermatol Online J.**, Davis, v. 9, n.5, p.1-18, 2003.

JOPLING, W. H. Reactions in leprosy. **Lepr Rev**, v. 41, p. 62-63, 1970.

KATOCH, V. M. Advances in the diagnosis and treatment of leprosy. **Expert Rev. Mol Med., Cambridge**, v.2, p.1-14, 2002.

LANA, F. C. F.; FABRI, A.C. O. C.; LOPES, F. N.; CARVALHO, A. P. M.; LANZA, F. M. Fernanda Moura Lanza. Deformities due to Leprosy in Children under Fifteen Years Old as an Indicator of Quality of the Leprosy Control Programme in Brazilian Municipalities. *Journal of Tropical Medicine*, 2013.

MARGARIDO, L. C; RIVITTI, E. A. Hanseníase. In: VERONESI. *Tratado de Infectologia*. 3 ed. 2005.

MATSUOKA, M.; IZUMI, S.; BUDIAWAN, T.; NAKATA, N.; SAEKI, K. *Mycobacterium leprae* DNA in daily using water as a possible source of leprosy infection. **Indian J Lepr**, v. 71, n.1, p. 61-67, 1999.

MARTELLI, C. M. T.; STEFANI, M. M. A.; PENNA, G. O.; ANDRADE, A. L. S. S.; Endemias e epidemias brasileiras, desafios e perspectivas de investigação científica: hanseníase. **Rev. Bras. Epidemiol**, v. 3, 2002.

MENDONÇA, A. M.; MELO, G. E. B. A.; TEIXEIRA, A. L.; COSTA, R. D.; ANTUNES, C. M. Imunologia da hanseníase. **An Bras Dermatol**. v. 83, p. 343-350, 2008.

MONOT, M.; HONORÉ, 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.; BUSO, P.; GATTIKER, A.; ROUGEMONT, J.; BRENNAN, P.; COLE, S. T. Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium lepra*. *Nature Genetics*. v. 41, p. 1282-1289, 2009.

BAKKER, M. I.; HATTA, M.; KWENANG, A.; VAN MOSSEVELD, p.; FABER, W. R.; KLATESR, P. R.; OSKAM, L. Risk factors for developing leprosy--a population-based cohort study in Indonesia. **Lepr Rev**, v. 77, n.1 p. 48–61, 2006

MODLIN, R. L; REA, T. H. Leprosy: new insight into an ancient disease. **Journal of American Academy of Dermatology**, v. 17, n.1, p.1-13, 1987.

MOET, F.; PAHAN, D.; SCHURING, R. P.; OSKAM, L.; RICHARDUS, J. H. Physical distance, genetic relationship, age, and leprosy classification are independent risk factors for leprosy in contacts of patients with leprosy. **J Infect Dis**. v.193, n.3 p. 346-353, 2006.

MOURA, R.S.; CALADO, K.L.; OLIVEIRA, M.L.; BÜHER-SÉKULA, S. Leprosy serology using PGL-I: a systematic review. **Rev Soc Bras Med Trop**. 41(Suplemento II):11-18, 2008.

MOURA, M. L. N.; DUPNIK, K.M.; SAMPAIO, G. A. A.; NOBREGA, P. F. C.; JERONIMO, A. K.; DO NASCIMENTO-FILHO, J. M.; DANTAS, R. L. M.; QUEIROZ, J.W.; BARBOSA, J. D.; DIAS, G.; JERONIMO, S. M. B.; SOUZAS, M. C. F.; NOBRE, M. L. Active Surveillance of Hansen's Disease (Leprosy): Importance for Case Finding among Extra-domiciliary Contacts. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, p. 1-7, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Departamento Nacional de Saúde. Serviço Nacional de Lepra. **Manual de Leprologia**. Rio de Janeiro, p. 171, 1960

OPROMOLLA, D.V.A. Noções de Hansenologia. Bauru: Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato, 2000.

OPROMOLLA, D. V. A.; MARTELLI, A. C. C. A terminologia relativa à hanseníase. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 80, n. 3, p. 293-294, 2005.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE - OMS. A Estratégia do Esforço Final para a Eliminação da Hanseníase como problema de Saúde Pública: Perguntas e Respostas. 2.ed. Genebra: OMS, 2003.

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

PENNA, M. L. F.; OLIVEIRA, M. L.W. R.; PENNA, G. Spatial distribution of leprosy in the Amazon Region of Brazil. **Emerg Infect Dis**, v.15, p. 650-652, 2009.

SCOLLARD, D. M; ADAMS, L. B; GOLLIS, T, P; KRAHENBUUHL, J. L; TRUMAN, R. W; WILLIAMS, D. L. **The Continuing Challenges of Leprosy**, v. 19, p. 338–381, 2006.

SILVA, A. R.; PORTELA, E. G.; MATOS, W. B.; SILVA, C. C.; GONÇALVES, E. DA G. R. 2007. Leprosy in the municipality of Buriticupu, State of Maranhão: active search among the student population. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 40, n. 6, p. 657-660, 2007.

SPENCER, J. S.; BRENNAN, P.J.; The role of Mycobacterium leprae phenolic glycolipid I (PGL-I) in serodiagnosis and in the pathogenesis of leprosy. **Lepr Rev**, v. 82, n. 4, p. 344-357, 2011.

SPENCER, J. S.; DUTHIE, M. S.; GELUK, A.; BALANGON, M. F.; KIM, H. J.; WHEAT, W. H. Identification of serological biomarkers of infection, disease progression and treatment efficacy for leprosy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 107 Suppl 1:79-89, 2012.

SUZUKI, K.; UDONO, T.; FUJISAWA, M.; TANIGAWA, K.; IDANI, G.; ISHII, N. Infection during infancy and long incubation period of leprosy suggested in a case of a chimpanzee used for medical research. **J Clin Microbiol**. 2010 Sep;48(9):3432-4, 2010.

STEFANI, M. M. A.; Desafios na era pós genômica para o desenvolvimento de testes laboratoriais para o diagnóstico da hanseníase. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 89-94, 2008.

SVANHOLM, H.; STARKLINT, H.; GUNDERSEN, H. J.; FABRICIUS, J.; BARLEBO, H.; OLSEN, S. Reproducibility of histomorphologic diagnoses with special reference to the Kappa statistic. *APMIS*, 97:689–698, 1989.

REECE, S. T.; IRETON, G.; MOHAMATH, R.; GUDERIAN, J.; GOTO, W.; GELBER, R.; GROATHOUSE, N.; SPENCER, J.; BRENNAN, P.; REED, S. G. ML0405 and ML2331 Are Antigens of *Mycobacterium leprae* with Potential for Diagnosis of Leprosy. **Clinical and Vaccine Immunology**, v, n. 13, p. 333–340, 2006.

ROTBURG, A. Fiftieth anniversary of the "N-factor/Hansen-nergic fringe" hypothesis for hanseniasis. **Int J Lepr Other Mycobact Dis** 57: 864-866, 1989.

ROCHE, P. W.; FAILBUS, S. S.; BRITTON, W. J.; COLE, R. 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 and Other Mycobact Dis**, v. 67, p. 279-286, 1999.

TALHARI, S.; CRUZ, C. A. V.; CARNEIRO, I. C. R. S. Hanseníase. In: LEÃO, Raimundo Nonato Queiroz de (Coord.). Doenças infecciosas e parasitárias: Enfoque Amazônico. Belém-Pa: Editora Cejup, UEPA, Instituto Evandro Chagas, p. 487-506, 1997.

TRUMAN, R.; FINE, P. E. 'Environmental' sources of Mycobacterium leprae: issues and evidence. **Lepr Rev**. v. 81, n. 2, p. 89-95, 2010.

VAN BEERS, S.; HATTA, M.; KLASTER, P. R. Seroprevalence rates of antibodies to phenolic glycolipid-I among school children as an indicator of leprosy endemicity. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 67, n.3, p. 243 – 249, 1999.

VAN BRAKEL, W.H.; SIHOMBING, B.; DJARI, H.; BEISE, K.; KUSUMAWARDDHANI, L.; YULIANE, R.; KURNIASARI, I.; KASIM, M.; KESUMANINGSIH, K. I.; WILDER-SMITH, A. Disability in people affected by leprosy: the role of impairment, activity, social participation, stigma and discrimination. **Glob Health Action**, v. 5, p. 183-94, 2012.

VISSA, V. D.; BRENNAN, P. J. The genome of *Mycobacterium leprae*: a minimal mycobacterial gene set. **Genome Biology**, v. 2, n. 8, p. reviews1023.1–reviews1023.8, 2001.

WOROBEC, S. M. Current approaches and future directions in the treatment of leprosy. **Research and Reports in Tropical Medicine**, v. 3, p. 79-91, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Enhanced global strategy for further reducing the disease burden due to leprosy: (Plan period: 2011-2015). New Delhi (India): World Health Organization, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global leprosy situation. **Weekly epidemiological record**, v. 82, n. 25, p. 225-32, 2007. Disponível em: <<http://www.who.int/wer/2007/wer8225.pdf>. Acesso em: 10 mar. 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global leprosy situation. **Weekly epidemiological record**. Nº 34, 87, 317 – 328, 24 august 2012. Disponível em: <<http://www.who.int/wer/2012/wer8734.pdf>. Acesso em 10 Abr. 2013.

ANEXOS

ANEXO I – Parecer do comitê de ética em pesquisa em seres humanos




Universidade Federal do Pará

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS DO INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

Carta: 06/08 CEP-ICS/UFPA Belém, 21 de fevereiro de 2008.

Ao:
Prof. Dr. Cláudio Guedes Salgado

Senhor Pesquisador,

Temos a satisfação de informar que seu projeto de pesquisa **“Detecção e análise da variação genotípica do mycobacterium leprae de casos-índice e comunicantes em regiões endêmicas do Estado do Pará”** de Protocolo nº197/07, CEP-ICS/UFPA, foi apreciado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará, na reunião do dia 04 de dezembro de 2007.

Assim, Vossa Senhoria tem o compromisso de entregar o relatório parcial do mesmo até o dia 30 de dezembro de 2008, no CEP-ICS/UFPA, situado no Campus Universitário do Guamá, Campus profissional, no Complexo de sala de aula do ICS – sala 13 (Altos).

Atenciosamente,

M. Sc. Maria da Conceição S. Fernandes
Prof.^a M. Sc. Maria da Conceição S. Fernandes.
Coordenadora do CEP-ICS/UFPA

Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará (CEP-ICS/UFPA) - Complexo de Sala de Aula/ CCS - Sala 13 - Campus Universitário do Guamá, nº 01, Guamá – CEP: 66075-110 - Belém-Pará. Tel./Fax. 3201-8028/3201-7735 E-mail: cepccs@ufpa.br

ANEXO II – Termo de consentimento livre e esclarecido

 LABORATÓRIO DE DERMATO-IMUNOLOGIA
<div style="border: 1px solid black; width: 100px; height: 30px; margin: 0 auto; display: flex; align-items: center; justify-content: center;"> E </div>
<p>TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO</p> <p>UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ - URE «MARCELO CANDIA».</p> <p>A equipe de pesquisadores coordenada pelo Professor Dr. Claudio Guedes Salgado está realizando o estudo «Deteção e análise da variação genotípica do Mycobaterium leprae de casos-índice e de comunicantes, em regiões endêmicas do Estado do Pará», do qual gostaríamos que seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade participasse e, para isso, precisamos de sua autorização.</p> <p>O estudo tem por objetivo identificar características relacionadas às pessoas, aos seus modos de vida, ao meio ambiente e à genética do micróbio que causa a hanseníase, para entender melhor sobre a transmissão da doença, melhorando sua prevenção e tratamento.</p> <p>As crianças e os adolescentes que participarem deste estudo, serão submetidas à coleta de sangue e de secreção nasal, realizada por médicos e profissionais de saúde experientes, sempre com a finalidade de identificar o M.leprae. Suas Casas serão visitadas, para que seja feito um mapeamento dos casos de hanseníase por bairros e ruas.</p> <p>A pesquisa será realizada em ambiente seguro, com material limpo e descartável. A coleta de sangue poderá causar dor e pequena reação no local. E a coleta de secreção nasal será realizada de forma rápida e indolor.</p> <p>A participação nesta pesquisa é voluntária e seu filho participará apenas se você autorizar. Sempre que desejar, será fornecido esclarecimentos sobre cada uma das etapas do estudo. A qualquer momento, o participante poderá recusar-se a continuar no estudo e retirar seu consentimento, sem que isso lhe traga qualquer penalidade ou prejuízo.</p> <p>Esta garantido o cumprimento do que fora informado acima, a gratuidade de todos os procedimentos e o sigilo da identidade dos participantes.</p> <p style="text-align: center;">DECLARAÇÃO DE PAIS OU RESPONSÁVEIS</p> <p>Tendo compreendido perfeitamente tudo o que me for informado, AUTORIZO QUE MEU FILHO(A) _____, PARTICIPE DESTE ESTUDO, SEM QUE PARA ISSO EU TENHA SIDO FORÇADO OU OBRIGADO.</p> <p style="text-align: center;">Assinatura ou impressão dactiloscópica do(a) pai/mãe ou responsável legal.</p> <p style="text-align: center;">Doc.: _____</p> <p>Local _____, Data: ____ / ____ / ____</p> <p style="text-align: center;"><i>Prof. Dr. Claudio Guedes Salgado</i> CRM-PA 5062 Laboratório de Dermato-Imunologia Av. João Paulo II, 113. Marituba, Pará, Brasil. Fone: (91) 3256-9097</p>