



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ – UFC
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

PAULA BRITO E CABRAL

**PERFIL DE MARCADORES SOROLÓGICOS, SALIVARES E MOLECULARES DE
Mycobacterium leprae ENTRE CONTATOS INTRADOMICILIARES DE PACIENTES
COM HANSENÍASE.**

FORTALEZA

2012

PAULA BRITO E CABRAL

PERFIL DE MARCADORES SOROLÓGICOS, SALIVARES E MOLECULARES DE *Mycobacterium leprae* ENTRE CONTATOS INTRADOMICILIARES DE PACIENTES COM HANSENÍASE.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica do Departamento de Patologia e Medicina Legal, da Universidade Federal do Ceará, como requisitos parcial para obtenção do Título de Mestre em Microbiologia Médica.

Orientadora: Professora Dr^a. Aparecida Tiemi Nagao-Dias

FORTALEZA

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

C121p Cabral, Paula Brito e.
Perfil de marcadores sorológicos, salivares e moleculares de *Mycobacterium leprae* entre contatos intradomiciliares de pacientes com hanseníase/ Paula Brito e Cabral. – 2012.
81 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2012.
Orientação: Profa. Dra. Aparecida Tiemi Nagao-Dias

1. *Mycobacterium leprae* 2. Testes Sorológicos 3. Reação em Cadeia da Polimerase I. Título.

CDD 616.9041

PAULA BRITO E CABRAL

**PERFIL DE MARCADORES SOROLÓGICOS, SALIVARES E MOLECULARES DE
Mycobacterium leprae ENTRE CONTATOS INTRADOMICILIARES DE PACIENTES
COM HANSENÍASE.**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Médica do Departamento de Patologia e
Medicina Legal, da Universidade Federal do
Ceará, como requisitos parcial para obtenção
do Título de Mestre em Microbiologia Médica.**

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Aparecida Tiemi Nagao-Dias (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Maria Isabel de Moraes Pinto

Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)

Profa. Dra. Lilia Maria Carneiro Camara

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Silvia Helena Baren Rabenhorst

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Aos meus pais, avó, irmãos e esposo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, cujo amor é o sustento em todos os momentos de minha vida;

À professora Aparecida, por toda a dedicação, confiança, amizade, conselhos, ensinamentos acadêmicos e, principalmente, ensinamentos de vida. Foi maravilhoso tê-la conhecido!

À professora Lilia, pela confiança, enorme compreensão, paciência e apoio durante a realização deste trabalho;

À professora Silvia Helena, por todo o apoio e acolhimento que tive em seu laboratório desde a iniciação científica;

Aos participantes da banca, pelo aceite do convite e pelas contribuições feitas para melhoria deste trabalho;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, por todo o conhecimento obtido;

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Carolinda Vilma Soares de Oliveira (Carol), detentora de uma incrível sensibilidade, simpatia e disposição em ajudar sempre que solicitada;

Aos amigos da pós-graduação, Thially, Kylvia, Débora, Mariana, Hermínio e Elizabeth, pelas angústias e alegrias compartilhadas durante a realização das disciplinas. Em especial, à amiga Thially Gonçalves, agradeço pela companhia e amizade, que são presentes para a vida toda!

Aos amigos e colegas do Laboratório de Imunologia, Luciana, Fabrícia, João Carlos, Evandro, Alba, Tatiane, Milena, Natália, Fernanda, Raphael, Fábio, Aracélia e Kaíla, por todos os bons momentos de convivência. Em especial, agradeço à amizade de Fabrícia e João Carlos, por todo o carinho, conversas e almoços juntos;

Às amigas do Laboratório de Imunologia Médica - LIME, Camila e Eliane, por tornarem o dia a dia muito mais prazeroso, principalmente, na hora do cafezinho. Agradeço mais ainda pelas conversas, risadas e a amizade de vocês;

Aos alunos do Laboratório de Genética Molecular – LABGEM, Isabelle, Valeska, Débora, Francivandi, Markênia, Ana Paula, Érica e todos os demais alunos, por terem sido sempre tão receptivos, por todo o apoio e dúvidas solucionadas e pelas maravilhosas festinhas para as quais eu sempre era convidada;

Ao amigo e farmacêutico Alexandre Casimiro e às funcionárias do Ambulatório de Dermatologia do HUWC, Vera e Gê, pelo apoio na leitura e coloração das lâminas de baciloscopia;

Ao graduando do Curso de Farmácia, Danúcio, agradeço pela ajuda proporcionada na elaboração dos gráficos e pelas dicas inesquecíveis do Excel;

A Norma Linhares, agradeço pela atenção com que sempre me atendia quando eu precisava solicitar trabalhos científicos na Biblioteca da Universidade;

Às Secretarias de Saúde dos Municípios de Crato e Maracanaú, por terem me apoiado na realização deste trabalho. Em especial, agradeço a Tereza Cristina Brito Cabral e Marisângela Dutra de Almeida, Coordenadoras do Programa de Hanseníase dos Municípios de Crato e Maracanaú, e à enfermeira Laís Frota, por terem tornado tudo mais fácil. Ao bioquímico, José Leiva Cabral, por todo o suporte oferecido no processamento das amostras e na confecção das lâminas de baciloscopia;

Ao Professor Luiz Carlos Pinto e a seus alunos da Faculdade de Medicina de Barbalha da Universidade Federal do Ceará, pelo apoio nas visitas domiciliares dos pacientes;

Aos meus pais, Tereza Cristina e José Leiva, melhores amigos e maiores incentivadores dos meus estudos. Minha mãe, pela parceria nas coletas realizadas no interior. Meu pai, por todas as vezes que abdicou dos seus compromissos para me dar apoio na execução dessas coletas. Ao meu irmão Guilherme Cabral, por ter sido, como sempre, tão atencioso e companheiro nas idas aos domicílios dos pacientes. Às minhas tias, Marília e Cristina, agradeço pelas preocupações, incentivos aos estudos, amor e cuidado que sempre tiveram comigo. Ao meu amado esposo e amigo, Pádua Sampaio, por estar ao meu lado em todos os momentos da minha vida. Isso me faz enfrentar qualquer desafio;

Por fim, agradeço a todos os pacientes de hanseníase e familiares, pelo acolhimento em seus lares, pelas conversas e todas as histórias de vida que, de alguma forma, nos faziam sair diferentes após cada visita.

Aproximou-se dele um leproso, suplicando-lhe de joelhos:

“Se queres, podes limpar-me.”

Jesus compadeceu-se dele, estendeu a mão, tocou-o, e lhe disse:

“Quero, sê curado.”

(Mc 1:40-41)

RESUMO

Os contatos de pacientes com hanseníase é um grupo de alto risco de desenvolver a doença, logo a precocidade no diagnóstico é uma importante ferramenta para o controle da enfermidade. Nós investigamos a presença de DNA de *Mycobacterium leprae*, através da Reação em Cadeia Polimerase (PCR), na mucosa nasal e anticorpos anti-PGL1 séricos, IgG/IgM, e salivares, IgA/IgM, por meio do ensaio imunoenzimático ligado à fase sólida (ELISA), em contatos intradomiciliares de pacientes com hanseníase (n=135) e seus casos índices. O estudo foi realizado em duas cidades endêmicas para a doença no Ceará, Crato e Maracanaú. Uma boa correlação entre os isotipos IgA e IgM salivares e IgG sérico foi observada quando comparou-se os contatos intradomiciliares e seus casos índices ($p < 0,01$, $p < 0,005$ e $p < 0,0001$, respectivamente). Entretanto, essa relação não foi observada para IgM sérico anti-PGL1 ($p > 0,05$). Observou-se alta frequência de IgM sérico anti-PGL1 no grupo de contatos negativos para IgG sérico anti-PGL1 (71/121, 58,6%). Dentre os contatos positivos para IgG sérico anti-PGL1, o nível de anticorpos séricos IgM anti-PGL1 também foi alto (10/14, 71,4%). Em relação aos anticorpos salivares, contatos de pacientes com a forma clínica PB mostraram boa correlação entre IgA e IgM ($r = 0.54$, $p < 0.0001$); o mesmo foi verificado em contatos de pacientes com a forma clínica MB ($r = 0.61$, $p < 0.0001$). Foi observado que dos contatos positivos para os anticorpos salivares anti-PGL1, 53,3% obtiveram níveis de anticorpos séricos negativos. Por outro lado, dos contatos que foram negativos para os anticorpos salivares, 71,1% obtiveram níveis de anticorpos séricos positivos. O DNA de *Mycobacterium leprae* foi encontrado em *swabs* nasais de 9 contatos de pacientes portadores da forma clínica MB da hanseníase (10,6%) e em 3 contatos de pacientes portadores da forma clínica PB (6,0%). Nós concluímos que análises quantitativas de anticorpos séricos e salivares anti-PGL1 em contatos de pacientes com hanseníase são necessárias para montar estratégias de levantamento de infecções subclínicas da hanseníase, a fim de prevenir o desenvolvimento da doença.

Palavras-chave: *Mycobacterium leprae*. anticorpos anti-PGL1. Reação em Cadeia Polimerase (PCR).

ABSTRACT

Leprosy household contacts are group at high risk of developing the disease. We investigated the presence *M. leprae* DNA in nasal mucosa and anti-PGL1 serum IgG/IgM and salivary IgA/IgM antibodies from leprosy household contacts (n=135) in two endemic regions, Ceara, Brazil. Good correlation between serum IgM and IgG isotypes was observed both in MB and in PB leprosy household contacts ($r = 0.39$, $p < 0.0001$). However, their levels were much different ($p < 0.0001$). Among the contacts positive for serum IgM, 74 (87%) were found to be negative for serum IgG. In respect to the salivary antibodies, PB leprosy household contacts showed correlation between IgA and IgM ($r = 0.60$, $p < 0.0001$); the same was observed in MB leprosy contacts ($r = 0.77$, $p < 0.0001$). It was observed that in 75.3% of the leprosy household contacts who were positive to serum anti-PGL1, their salivary antibodies were negative. On the other hand, 50% of the leprosy household contact who were negative to serum anti-PGL1 antibodies, their salivary antibodies were positive. *M. leprae* DNA was found in nasal swab in 9 MB household leprosy contacts (10.6%) and in 3 PB leprosy contacts (6.0%). We concluded that quantitative analysis of serum and salivary anti-PGL1 in leprosy contacts is necessary for mounting strategies to survey subclinical leprosy infections in order to prevent development of the disease.

Keywords: *Mycobacterium leprae*. anti-PGL1 antibodies. Polymerase chain reaction (PCR).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição dos coeficientes de detecção de hanseníase, por município, ano de 2009, Ceará	16
Figura 2 - Morfologia do <i>Mycobacterium leprae</i>	17
Figura 3 - Resposta imunológica da hanseníase	21
Figura 4 - Processo de extração de DNA de <i>Mycobacterium leprae</i>	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

B	<i>Boderline</i>
BAAR	Bacilo álcool-ácido resistente
BB	<i>Boderline-Boderline</i>
BL	<i>Boderline-Lepromatoso</i>
BSA	Albumina sérica bovina
BT	<i>Boderline-Tuberculóide</i>
D-BSA	Dissacarídeo albumina sérica bovina
ELISA	Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay
I	Indeterminada
L e LL	Lepromatoso
LAM	Lipoarabinomanana
MB	Multibacilar
ND-O-BSA	Dissacarídeo natural-octil-BSA
ND-P-BSA	Dissacarídeo natural-fenol-BSA
NT-O-BSA	Trissacarídeo natural-octil-BSA
NT-P-BSA	Trissacarídeo natural-fenol-BSA
OMS	Organização Mundial de Saúde
PB	Paucibacilar
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em Cadeia Polimerase
PGL1	Glicolípido fenólico 1
PIB	Produto Interno Bruto
T e TT	Tuberculóide
T-BSA	Trissacarídeo albumina sérica bovina
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
V e VV	Virchowiano

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Epidemiologia	14
1.2	Agente etiológico da hanseníase	17
1.3	Imunopatologia da hanseníase	20
1.4	Diagnóstico clínico-laboratorial da hanseníase	23
1.5	Marcadores sorológicos	23
1.6	Marcadores moleculares	26
2	JUSTIFICATIVA	30
3	OBJETIVOS	32
3.1	Objetivo geral	32
3.2	Objetivos específicos	32
4	MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1	População alvo	34
4.2	Coleta de dados	34
4.2.1	<i>Entrevistas</i>	34
4.2.2	<i>Processamento das amostras</i>	34
4.2.3	<i>Amostras de saliva</i>	35
4.2.4	<i>Amostras de sangue</i>	35
4.2.5	<i>Amostras de mucosa nasal</i>	35
4.3	Análise sorológica	36
4.4	Biologia molecular	37
4.4.1	<i>Extração de DNA</i>	38
4.4.2	<i>Primers selecionados</i>	39
4.4.3	<i>Amplificação do DNA</i>	39
4.4.4	<i>Visualização</i>	39
4.5	Aspectos éticos	39
5	CAPÍTULO 1: Anticorpos salivares IgA/IgM, séricos IgG/IgM anti-PGL1 e DNA de <i>M. leprae</i> em mucosa nasal de indivíduos com contato intradomiciliar com a hanseníase	41
6	CONCLUSÕES	67
	REFERÊNCIAS	69

APÊNDICES	76
Apêndice A – Questionário dos Participantes	76
Apêndice B – Termo de Consentimento Pós-Informação	78
ANEXOS	80
Anexo A - Certificado de Edição do Inglês – AMERICAN	
JOURNAL EXPERTS.....	80

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia

A hanseníase, uma doença infecciosa de evolução crônica que afeta nervos e pele, manifesta-se por lesões cutâneas dolorosas com alteração de sensibilidade térmica, tátil e dolorosa (CUNHA, 2003). Atualmente, a doença representa um grande desafio às precárias políticas de saúde pública em países subdesenvolvidos e em nações em desenvolvimento, visto que as implicações socioeconômicas estão intimamente ligadas ao agravamento dos casos e ao incremento das estatísticas. Sendo assim, a Estratégia Global para Redução da Hanseníase (Plano: 2011-2015) foi implementada pelos programas nacionais de hanseníase nos países onde a doença é considerada endêmica. Esse plano almeja reduzir, ao final de 2015, em mais de 35% o número de casos novos diagnosticados com grau 2 de incapacidade (OMS, 2011). Esse parâmetro é um indicador que representa diagnóstico tardio (SUZUKI et al., 2011) e tem sido considerado importante para ser analisado nos programas de controle da doença.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) coleta regularmente dados sobre a prevalência e detecção de casos novos nas diferentes regiões e países membros. De acordo com os relatórios oficiais apresentados no início de 2011, o número de casos novos detectados foi de 228.474 em 130 países e territórios no ano de 2010 (OMS, 2011). Tais dados mostraram que muitos países que apresentavam alta endemicidade já alcançaram o controle da hanseníase (situação definida como uma taxa de prevalência registrada <10 casos/100.000 habitantes), caso este do Timor-Leste (OMS, 2011). Por outro lado, vários bolsões de alta endemicidade ainda persistem em algumas zonas da Angola, Brasil, República Centro-Africana, República Democrática do Congo, Índia, Madagascar, Moçambique, Nepal e República Unida da Tanzânia (OMS, 2009).

Considerando o Produto Interno Bruto (PIB) ou o domínio tecnológico, alguns desses países ocupam posição de destaque no cenário mundial. É o caso da Índia e do Brasil, por exemplo. Enquanto o primeiro destaca-se no âmbito tecnológico mundial, o segundo, com um PIB estimado em 1.571.957 milhões de dólares (IBGE, 2011), é considerado o país mais expressivo da América do Sul. No entanto, ambos demonstram descaso com a promoção à saúde, uma vez que investem menos de 3,5% de seus PIBs em saúde pública (IBGE, 2011). O Brasil continua ocupando o 2º lugar em incidência de hanseníase, com 34.894 casos novos em

2010, perdendo apenas para a Índia, que apresentou 126.800 novos casos da doença no mesmo ano (OMS, 2011).

Durante quatro séculos, as únicas medidas de combate à hanseníase no território brasileiro foram o isolamento dos doentes em asilos-colônia dispensários e de seus filhos sadios, em outros, preventórios. Essas medidas, conhecidas como o tripé profilático da hanseníase, foram responsáveis pela desintegração familiar, estigmatização social, aterrorização e afugentamento de doentes que passavam a criar focos ocultos (PINTO NETO et al., 2000). Somente a partir de 1920, por meio da primeira Lei Nacional de Profilaxia da Lepra, foi regulamentado que as pessoas da família, os domésticos e todos os que residissem ou permanecessem no domicílio deveriam ser submetidos a exames para verificar se estavam contaminados (PINTO NETO et al., 2000).

Atualmente, a detecção de casos novos no país encontra-se em patamares muito altos no Norte, Centro-Oeste e Nordeste brasileiro, onde concentram-se 55% dos casos (CEARÁ, 2011).

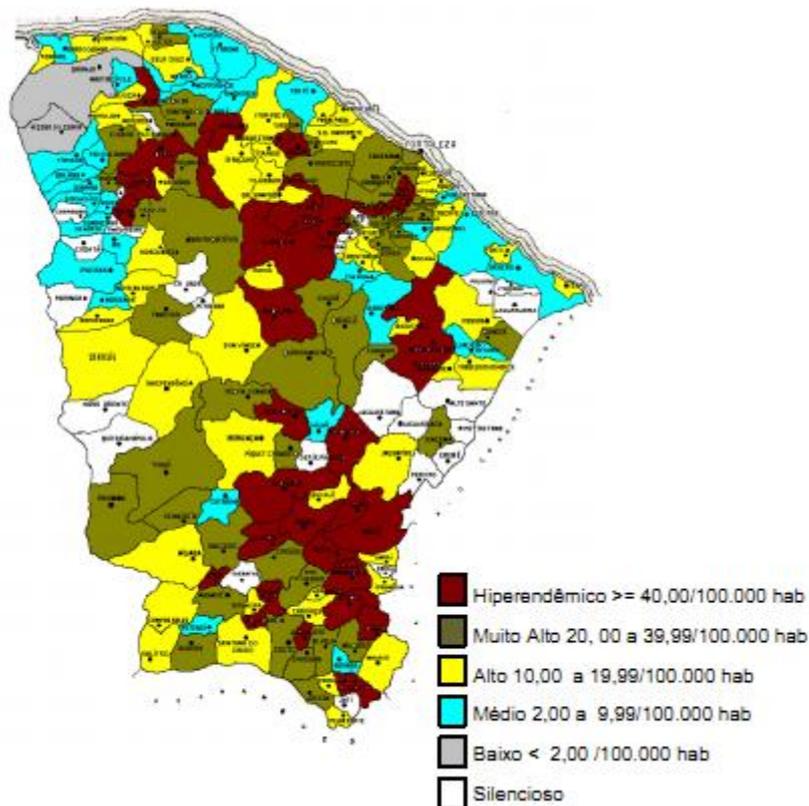
No Ceará, a situação epidemiológica não difere muito das apresentadas anteriormente. Apesar dos esforços realizados pelas Secretarias Municipais de Saúde, a hanseníase representa ainda em um sério problema de saúde pública no Estado. Em 2010, foram notificados 2.149 novos casos, com um coeficiente de detecção em todas as idades de 25,4 por 100.000 habitantes (CEARÁ, 2011). Essa taxa ainda é considerada muito alta, colocando o estado em 13º lugar no *ranking* nacional e em 4º lugar do Nordeste, em número de casos da doença (CEARÁ, 2011).

A hanseníase está acometendo indivíduos adultos entre 20 e 50 anos ou mais, considerando-se que 89,9% dos casos novos encontravam-se nessa faixa etária no ano de 2010 (CEARÁ, 2011). Percebe-se, portanto, a importância da detecção precoce da doença como forma de minimizar as sequelas e incapacidades físicas consequentes de um diagnóstico tardio (CEARÁ, 2011).

O controle da doença constitui-se no diagnóstico precoce de casos, tratamento e cura, além do exame e acompanhamento dos contatos intradomiciliares. A cobertura de exame de contatos foi de 50,1%, no ano de 2011 (CEARÁ, 2012), valor muito aquém daquele preconizado pelo Ministério da Saúde, que é de 75% (CEARÁ, 2012).

A distribuição geográfica da endemia revela incidência da doença na maioria dos municípios do Ceará, mas há uma significativa concentração da doença na região sul (Fig.1), motivo pelo qual a área foi incluída como *cluster*. Define-se *cluster* como uma área onde está concentrado o maior número de casos da doença e o índice de transmissão mais elevado (CEARÁ, 2010).

Figura 1. Distribuição dos coeficientes de detecção de hanseníase, por município, ano de 2009, Ceará.



Fonte: Ceará (2010).

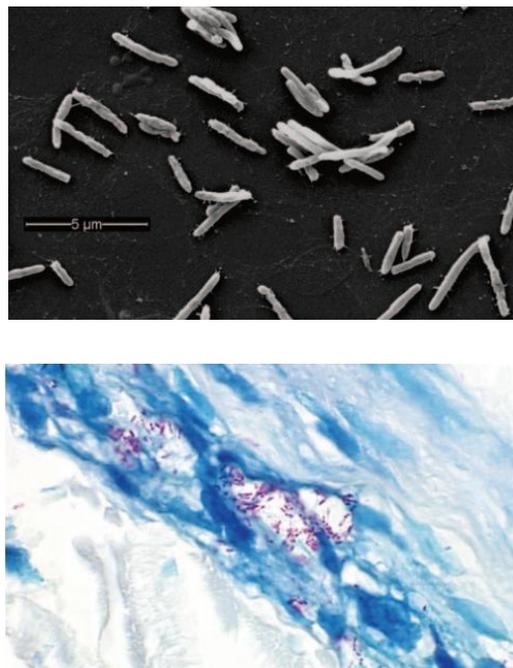
Para evitar a desaceleração dos esforços públicos para o controle da doença é preciso destinar investimentos significativos em saneamento básico, higiene, monitoramento dos pacientes e, sobretudo, comunicação em saúde, educação permanente e mobilização social (CALIL, 2008; BRASIL, 2010). Como prova deste raciocínio, vários países desenvolvidos lograram a erradicação da doença muito antes de existirem medicamentos específicos como a rifampicina, que, desacompanhada das medidas profiláticas, pode

contribuir para com a resistência da bactéria no organismo humano e, conseqüentemente, para o agravamento deste quadro (VIRMOND, 2008).

1.2 Agente etiológico da hanseníase

O bacilo causador da hanseníase, *Mycobacterium leprae*, demonstrado por Hansen (SMITH et al., 2004), foi a primeira bactéria que mostrou estar associada com doenças em humanos. A micobactéria mede de 1 a 8 micras de comprimento por 0,2 a 0,5 micras de largura; cora-se em vermelho pela fucsina e não se descora por ácidos e alcoóis, o que a caracteriza como bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) (GOULART; PENA; CUNHA, 2002) (Figura 2). Em esfregaços de linfa e cortes histológicos, os bacilos podem ser visualizados pela técnica de Ziehl-Nielsen. Assume uma estrutura comum ao gênero *Mycobacterium*, apresentando cápsula, parede celular, membrana e citoplasma (CUNHA, 2003). Além disso, o *M. leprae* é um parasita intracelular obrigatório que não pode ser cultivado *in vitro* (DONOGHUE; HOLTON; SPIGELMAN, 2001; SUZUKI et al., 2011).

Figura 2. Morfologia do *Mycobacterium leprae*.



Fonte: Scollard et al. (2006).

A parede celular do *M. leprae* apresenta, ligado frouxamente em sua superfície, um antígeno denominado glicolípido fenólico1 (PGL1), descrito por Brennan & Barrow, em 1980, como específico do bacilo (BARROS; OLIVEIRA, 2000). A estrutura da molécula é

composta de um esqueleto de fitiocerol, com duas cadeias laterais de ácidos micocerosídicos ligados a uma estrutura trissacarídica por um radical fenólico (HUNTER; FUJIWARA; BRENNAN, 1982), características que explicam sua alta hidrofobicidade (IZUMI et al., 1990). O determinante antigênico do PGL1 é representado pelo resíduo terminal trissacarídeo, o qual se diferencia dos antígenos glicolipídicos das várias espécies de micobactéria. Tal resíduo terminal tem sido preparado por síntese química com compostos mono, di e trissacarídeos, conjugados a uma proteína carreadora (albumina sérica bovina ou BSA). Entre esses, os que resultam em melhor reatividade com soros de doentes são os resíduos di (D-BSA) e trissacarídeo (T-BSA). A partir da síntese dos antígenos semi-sintéticos podem ser produzidos quatro novos antígenos diferentes (ND-O-BSA, NT-O-BSA, ND-P-BSA, NT-P-BSA) (FUJIWARA et al., 1984; MOURA et al., 2008). É importante destacar que o antígeno sintético dissacarídeo apresenta a vantagem de ser solúvel em água e pode ser obtido em grandes quantidades para uso em estudos epidemiológicos (FUJIWARA et al., 1984).

A fonte mais importante de infecção são os doentes multibacilares não-tratados, fato comprovado em trabalhos como o de Paul Fine et al. (1997), que demonstra que comunicantes de doentes com a forma multibacilar da doença apresentam um risco cinco a dez vezes maior de adoecimento que a população em geral. Esses pacientes, portanto, excretam *M. leprae* pela mucosa nasal e pelas lesões cutâneas (SUZUKI et al., 2011; JOB et al., 2008), podendo transmitir os bacilos no período em que a infecção permanece subclínica (RODRIGUES; LOCKWOOD, 2011).

A principal porta de entrada do bacilo são as vias aéreas superiores, sendo a mucosa nasal um reservatório de bacilos em até 55% dos pacientes bacilíferos. Nesses doentes, o *M. leprae* pode permanecer viável nos escarros ressecados por até nove dias (LOMBARDI, 1990). Estudos têm mostrado a presença de *M. leprae* na mucosa nasal em 5 a 8% dos contatos intradomiciliares (JOB et al., 2008), sendo então estes considerados fontes de transmissão da doença (SUZUKI et al., 2011) e indivíduos com maior inclinação ao desenvolvimento de hanseníase (RODRIGUES; LOCKWOOD, 2011). A magnitude desse risco depende da proximidade desse contato com o paciente e também da carga bacilar à qual o indivíduo está exposto. Desta forma, há um risco de adoecimento duas vezes maior em contatos de pacientes com a forma clínica MB do que em contatos de pacientes com a forma clínica PB (RODRIGUES; LOCKWOOD, 2011).

Segundo Job et al. (2008), a pele e a secreção nasal de pacientes com a forma multibacilar da doença não-tratados são capazes de disseminar bacilos para o meio ambiente, os quais podem se depositar na mucosa nasal ou no epitélio de contatos intradomiciliares com potencial chance de se estabelecer uma infecção. Sugeriu-se também que transmissão transplacentária tenha ocorrido em raros casos de hanseníase diagnosticados em crianças com menos de um ano de vida, expostas intra-útero (CUNHA, 2003). Além disso, o que embasa essa suposição é o fato de crianças com idade entre 3 e 24 meses terem apresentado elevação dos níveis de IgA e IgM séricos anti-PGL-1. Outros estudos verificaram a presença de *M. leprae* no leite materno de mães bacilíferas, o que pode sugerir a via gastrointestinal como porta de entrada de bacilos em lactentes (CUNHA, 2003).

Em áreas endêmicas, tem-se discutido muito a respeito da importância da infecção subclínica. Isso vem sendo comprovado através de achados em estudos que utilizam técnicas de biologia molecular para indicar a presença do DNA do *M. leprae* em amostras de secreção nasal de comunicantes domiciliares assintomáticos (WIT et al., 1993). Testes sorológicos para detecção de antígenos PGL1 ou anticorpos contra o mesmo têm mostrado uma boa sensibilidade para detecção de infecção subclínica (BAUMGART et al., 1993; GUPTE, 1996).

O *M. leprae* apresenta uma elevada infectividade e uma baixa patogenicidade, ou seja, o bacilo tem a capacidade de infectar muitos indivíduos, no entanto, poucos adoecem (SUZUKI; AKAMA; KAWASHIMA, 2011). Essa propriedade também é função de características intrínsecas da bactéria, bem como do hospedeiro e do grau de endemicidade do ambiente (SANTOS; CASTRO; FALQUETO, 2008).

Cerca de 90% da população possui uma resistência natural ao bacilo de Hansen e nunca vai contrair a doença. O paciente bacilífero deixa de transmitir bacilos após 15 dias de iniciado o tratamento. No entanto, quando a transmissão da doença acontece, os primeiros sintomas da hanseníase aparecerão após um período de incubação variável de 3 a 5 anos (GOULART; PENA; CUNHA, 2002). O *M. leprae* demora cerca de 12 a 14 dias para realização de uma divisão binária (BARROS; OLIVEIRA, 2000; SUZUKI et al., 2011) devido à propriedade hidrofóbica do PGL1, que acaba sendo uma barreira à difusão dos nutrientes necessários ao desenvolvimento da bactéria (BARROS; OLIVEIRA, 2000). Essa propriedade explica o extenso período de incubação da bactéria e também a incapacidade do

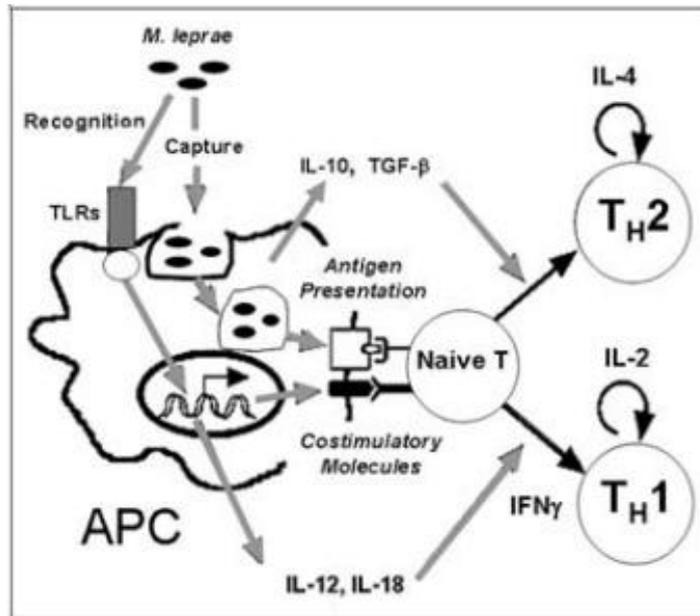
bacilo ser cultivado *in vitro*, fato que dificulta o diagnóstico da doença através dos testes microbiológicos.

1.3 Imunopatologia da hanseníase

O *Mycobacterium leprae* infecta primeiramente os histiócitos na derme ou as células de Schwann dos nervos periféricos (SUZUKI et al., 2011). O resultado dessa infecção e suas manifestações clínicas variam de acordo com a resposta imunológica do hospedeiro (BACH et al., 1986; GOULART; PENA; CUNHA, 2002). Tal resposta envolve os linfócitos Th1 e suas citocinas IL-2, IFN- γ e TNF- β , responsáveis pela manutenção da resposta imune celular. Da mesma forma, envolve os linfócitos Th2 com outro perfil de citocinas (IL-4, IL-3, IL-5), as quais são supressoras da atividade macrófágica (FOSS, 1997; SUZUKI et al., 2011).

Assim, as diferentes formas clínicas da doença dependem do perfil de resposta imunológica Th1 e/ou Th2 frente à microbactéria (Figura 3). Aquela que apresenta alta resistência à infecção pelo *Mycobacterium leprae*, ou seja, à hanseníase tuberculóide (paucibacilar), acontece quando a resposta imune celular está exacerbada, havendo assim grande destruição dos bacilos. Já a forma clínica de alta suscetibilidade, ou seja, hanseníase virchowiana (multibacilar), caracteriza-se por resposta imune celular deficiente, em que os linfócitos não ativam os macrófagos e estes se tornam incapacitados de lisar o *M. leprae* fagocitado, proporcionando excessiva multiplicação bacilar (BARROS; OLIVEIRA, 2000).

Figura 3. Resposta imunológica da hanseníase.



Fonte: Goulart e Goulart (2009).

Outro fator que predispõe o paciente à forma clínica multibacilar é a alteração do mecanismo oxidativo dos macrófagos, provocado pelo antígeno PGL1 e lipoarabinomanana (LAM) de *M. leprae* (VACHULA; HOLZER; ANDERSEN, 1989; FOSS, 1997). Acredita-se que o PGL1 pode reagir com compostos de radicais livres, sugerindo-se que esse lipídeo pode proteger o bacilo dos efeitos tóxicos de enzimas lisossomais e metabólitos oxidativos produzidos pelos macrófagos durante a infecção (MACIEIRA, 2000). Vachula, Holzer e Andersen (1989) comprovaram esse achado ao remover os lipídios da parede do bacilo. Também foi observado que o antígeno PGL1 inibe a produção de TNF α em culturas de macrófagos de indivíduos normais após a estimulação por lipopolissacarídeo (LPS), evidenciando-se, assim, a importância dessa molécula na supressão da imunidade celular (FOSS, 1997).

Com relação à imunidade inata, componentes importantes nessa resposta são os receptores *Toll-like* (TLR), presentes nas membranas plasmáticas e endossômicas. Tais receptores são sensores que reconhecem padrões moleculares exibidos por patógenos (BÁRTHOLO; BÁRTHOLO, 2009; SUZUKI et al., 2006). O reconhecimento desses padrões moleculares associados a patógenos (PAMPS) por receptores *Toll-like* constituem um dos principais mecanismos pelos quais o hospedeiro reconhece que há um patógeno presente

(BÁRTHOLO; BÁRTHOLO, 2009). A ativação dos TLRs leva à expressão de muitos genes que codificam moléculas as quais atuaram na ativação, diferenciação, proliferação e recrutamento celular, bem como na produção de citocinas pró-inflamatórias (BÁRTHOLO; BÁRTHOLO, 2009).

Os receptores *Toll-like*, em particular, os TLR2 e TLR1, reconhecem os lipídios da parede celular do *M. leprae* e subsequentemente ativam a resposta imune inata do hospedeiro (SUZUKI et al., 2011).

Alguns estudos têm demonstrado que múltiplos componentes do *Mycobacterium leprae* ativam os macrófagos, principalmente através dos TLR2 (FERRAZ et al., 2011). Em contrapartida, outros relatos afirmam que o polimorfismo do TLR2 pode levar a uma redução das respostas dos macrófagos para os peptídios bacterianos, resultando em uma atenuada resposta imunitária no hospedeiro (FERRAZ et al., 2011).

A imunopatogenia da hanseníase está diretamente relacionada ao desenvolvimento das formas clínicas da doença, as quais serão determinadas de acordo com o tipo de ativação linfocitária e o conseqüente perfil de citocinas presentes no microambiente da infecção, as quais levarão a um espectro imunológico, clínico e histológico característico. No polo desse espectro estão as formas tuberculóide (TT) e lepromatosa (LL) ou virchowiana (VV) (PAVANI; TONOLLI; D'AVILA, 2008). A classificação dessas formas clínicas e das formas intermediárias pode seguir os critérios de Madri, Ridley & Jopling e da Organização Mundial da Saúde.

A classificação de Madri (1953) é a mais utilizada na prática clínica (PAVANI; TONOLLI; D'AVILA, 2008). Define as formas clínicas como sendo tuberculóide (T), virchowiana (V), indeterminada (I) e *Borderline* (B) (SOUZA, 1997).

Já a classificação de Ridley & Jopling (1966) visa especialmente os pesquisadores (PAVANI; TONOLLI; D'AVILA, 2008) e subdivide as formas intermediárias em *Borderline-tuberculóide* (BT), *Borderline-borderline* (BB), *Borderline-lepromatosa* (BL), mantendo as formas polares, num total de 5 grupos no espectro imunológico (GOULART; PENA; CUNHA, 2002; PAVANI; TONOLLI; D'AVILA, 2008).

Em 1982, a OMS propôs uma classificação simplificada e operacional, baseada na carga bacilar e no número de lesões de pele e nervos acometidos (SOUZA, 1997). Os pacientes seriam agrupados na classificação paucibacilar (PB), quando acometidos por no

máximo 5 lesões de pele, com baciloscopia negativa; na multibacilar (MB), quando o número de lesões é maior do que 5, ou quando apresentam baciloscopia positiva, independente do número de lesões na pele (BUHRER-SÉKULA et al., 2009).

1.4 Diagnóstico clínico-laboratorial da hanseníase

O diagnóstico da hanseníase baseia-se no exame clínico do paciente, através da identificação dos sinais cardinais da doença, como manchas hipopigmentadas ou avermelhadas, com perda de sensibilidade e nervos periféricos espessados (SUZUKI et al., 2011). Além do exame clínico, a histopatologia e a presença de bacilos álcool-ácido resistentes na linfa e material de biópsia, previamente corados pelos métodos Ziehl-Neelsen ou Fite-Faraco, são métodos que auxiliam no diagnóstico (DONOGHUE; HOLTON; SPIGELMAN, 2001; TORRES et al., 2003). Segundo Torres et al. (2003) o exame histopatológico, dentre os métodos convencionais, é o mais indicado para estabelecer o diagnóstico definitivo da hanseníase.

Devido ao fato dessas técnicas microscópicas exigirem, no mínimo, de 10^4 microrganismos por grama de tecido para uma detecção confiável, muitos estudos investem em novos métodos laboratoriais com maior sensibilidade e especificidade, para a pesquisa do bacilo de Hansen (DONOGHUE; HOLTON; SPIGELMAN, 2001; TORRES et al., 2003; SUZUKI et al., 2011). A baixa sensibilidade das técnicas microscópicas agrava-se, particularmente, nos casos de pacientes que estão sendo monitorados devido a possíveis recaídas após o término do tratamento poliquimioterápico e para os pacientes com a forma tuberculóide ou indeterminada, em que os bacilos álcool-ácido resistentes são raros e o diagnóstico é baseado somente nos sintomas clínicos e no acometimento neural (TORRES et al., 2003).

Isso reforça a necessidade de se investir em técnicas mais sensíveis e específicas que possam detectar a presença do *M. leprae* nessas situações.

1.5 Marcadores sorológicos

Determinação de parâmetros sorológicos inespecíficos, tais como da proteína C reativa, de imunocomplexos circulantes, de frações do sistema complemento em pacientes com hanseníase não contribuem para o diagnóstico da doença, tão pouco, para o

acompanhamento farmacoterapêutico. Já os marcadores sorológicos específicos, como os anticorpos anti-PGL1, podem refletir a carga bacilar dos doentes, como também detectar o estágio de incubação da doença em indivíduos com infecção subclínica (KIRSZTAIN; NISHIDA; SILVA, 1994).

Dessa forma, nos últimos anos, muitos trabalhos publicados têm utilizado testes imunoenzimáticos para detecção de anticorpos anti-PGL1, específicos contra a *M. leprae*. Os estudos mostram que pacientes hansenianos no polo lepromatoso da doença apresentam grandes quantidades de anticorpos séricos anti-PGL1, ao passo que pacientes no polo tuberculóide apresentam baixos níveis (KIRSZTAIN; NISHIDA; SILVA, 1994, CALADO et al., 2005).

As principais indicações dos testes sorológicos seriam o monitoramento do tratamento, a detecção precoce de recidiva da doença, o auxílio na classificação das formas clínicas da doença (OSKAM; SLIM; BUHRER-SÉKULA, 2003; SILVA et al., 2007) e a identificação de pessoas infectadas com risco de desenvolver a hanseníase (DOUGLAS et al., 2004; CARDONA-CASTRO; ALZATE; MONTOYA, 2009).

Calado et al. (2005) afirmam que a detecção de anticorpos séricos anti-PGL1, com o objetivo de identificar pessoas infectadas desprovidas de sinais clínicos, pode ser uma vantagem para a interrupção da transmissão, uma vez que medidas profiláticas poderiam ser tomadas ao se constatar uma infecção subclínica. Rodrigues e Lockwood (2011) sugerem que uma dose única de rifampicina pode prevenir a progressão da doença em pessoas infectadas com hanseníase. Entretanto, os autores alertam sobre o risco de resistência com o advento da monoterapia. Por outro lado, segundo os mesmos autores, um tratamento mais ostensivo com uma ou duas doses de rifampicina 600mg, ofloxacina 400mg e minociclina 100mg, evitaria o risco da resistência, mas seria muito mais dispendioso (RODRIGUES; LOCKWOOD, 2011).

Ficam, portanto, como recomendações atuais da OMS para redução da hanseníase no mundo, a avaliação clínica prestada aos contatos de pacientes com hanseníase e a educação em saúde para esses contatos, alertando-os quanto aos primeiros sinais da doença (RODRIGUES; LOCKWOOD, 2011). Um estudo soro-epidemiológico com contatos de pacientes hansenianos, em área endêmica na Venezuela, mostrou forte associação entre os níveis de anticorpos séricos IgM anti-PGL1 e o risco de contrair a doença (ULRICH et al., 1991). Douglas et al. (2004) reforçam essa idéia ao afirmarem que contatos com resultados

positivos nos testes imunoenzimáticos apresentavam um risco de 7,65 vezes maior de desenvolver hanseníase do que os contatos com testes sorológicos negativos.

A sorologia, segundo Bach et al. (1986), pode servir também para seguimento terapêutico de pacientes com hanseníase, uma vez que os níveis dos anticorpos séricos anti-PGL1 diminuem durante a administração do tratamento específico. Cho et al. (2001) demonstraram que a quantidade de antígenos de PGL1 reduz-se em 90%, após um mês do início do tratamento. Estudo feito por Izumi et al. (1990) demonstrou que os títulos de anticorpos séricos declinaram em paralelo com a melhora clínica em 95% dos pacientes, mostrando a utilidade da sorologia anti-PGL1 no monitoramento da poliquimioterapia.

Izumi et al. (1990) também relataram, em seu estudo, que um paciente diagnosticado com hanseníase, forma clínica dimorfa virchowiana, apresentou elevação nos títulos de anticorpos séricos anti-PGL1 dez meses antes dos sinais clínicos da recidiva aparecerem, indicando que esse aumento dos títulos das imunoglobulinas específicas contra o *M. leprae* pode ser o primeiro sinal de caso de recidiva. Já Schuring et al. (2006) concluíram em seu trabalho que a presença de elevados níveis de anticorpos séricos anti-PGL1 está altamente correlacionado com o estado multibacilar da doença.

Dentre os anticorpos anti-*M.leprae*, o isotipo M (IgM) sérico é o que se encontra em níveis mais elevados, embora a presença de IgG e IgA também possa ser constatada (BARROS; OLIVEIRA, 2000; IZUMI et al.,1990). Kirsztajn et al. (1994) mediram os níveis de IgM, IgG e IgA séricos anti-PGL1 para avaliar a ocorrência de ativação policlonal na hanseníase e concluíram que há uma diversidade de classes e variação de níveis de imunoglobulinas nas várias formas clínicas da hanseníase.

Além desses anticorpos séricos, as mucosas também são responsáveis pela produção de imunoglobulinas locais. Cada sítio tem sua peculiaridade. O trato gastrointestinal, por exemplo, contém IgA e IgM, ao passo que o trato respiratório contém quantidades equivalentes de IgA e IgG e alguma IgM (CERUTTI; CHEN; CHORNY, 2011). Esses anticorpos junto com fatores de proteção não-específicos, como muco e saliva, bloqueiam a adesão microbiana às células epiteliais, sem causar dano tecidual ou reação inflamatória (CERUTTI; CHEN; CHORNY, 2011). A IgA predomina na saliva e nas secreções intestinais, onde é encontrada sob a forma de IgA secretória, sendo sua principal função inibir a aderência bacteriana e neutralizar enzimas, vírus e toxinas (OCHOA, 2002).

As imunoglobulinas secretórias estão presentes por toda a superfície da mucosa, seja em nível de lâmina própria como nas secreções e, juntamente com linfócitos, macrófagos e células dendríticas, encontrados dispersos no tecido (MURPHY; TRAVERS; MURPHY, 2010), são responsáveis por iniciarem a resposta imune local (CESTA, 2006). Quanto aos antígenos, esses podem provir de patógenos, de microrganismos comensais ou, até mesmo, de material ambiental inócuo, o qual origina os antígenos alimentares, por exemplo.

É importante ressaltar que um dos principais papéis do sistema imune de mucosa é montar a homeostase imunológica local, mantendo o estado de tolerância oral (WERSHIL; GLENN, 2008).

A importância de se analisar anticorpos salivares parte do princípio de que a principal porta de entrada do bacilo no organismo é a mucosa nasal. Isso significa que o primeiro local no qual a resposta imune é estabelecida contra o *M. leprae* é a superfície da mucosa, precedendo a resposta imune sérica (NAGAO-DIAS et al., 2007). Na hanseníase, observou-se que IgA e IgM salivares, apesar de não indicarem proteção contra a doença, podem servir como marcadores de tempo de infecção e de exposição ao bacilo (NAGAO-DIAS et al., 2007). A presença de anticorpos isotipo IgA representa, provavelmente, uma infecção presente ou passada. Já a constatação do isotipo IgM pode significar uma infecção presente (NAGAO-DIAS et al., 2007).

Recentemente, verificamos que estudantes e profissionais de saúde com exposição ocupacional a *M. leprae* apresentavam maior frequência de positividade dos anticorpos salivares quando o período de contato era superior a 3 meses. Além disso foi verificada forte correlação entre níveis de IgA e IgM salivares anti-PGL1 nos mesmos (CABRAL et al., 2009).

Portanto, a aplicação desses testes sorológicos e salivares para detecção de anticorpos anti-PGL1 em contatos de hanseníase nas áreas de alta endemicidade pode ser útil nas medidas de controle da doença.

1.6 Marcadores moleculares

Nas últimas duas décadas, métodos de biologia molecular têm sido empregados como ferramentas na detecção de material genético de patógenos em várias doenças infecciosas, inclusive a hanseníase (BANG et al., 2009; SANTOS et al., 1993).

A sequência genômica do *M. leprae* foi decifrada em 2001 (COLE et al., 2001) e revelou que metade do seu genoma contém genes que codificam proteínas, enquanto a outra metade consiste em pseudogenes e regiões não-codificadas (COLE et al., 2001). As sequências que codificam proteínas podem ser amplificadas através da reação em cadeia de polimerase (PCR) (BANG et al., 2009; ALMEIDA et al., 2004). Tais sequências codificam diferentes antígenos protéicos específicos para o *M. leprae*, com massas moleculares de 36-KDa, 18-KDa ou 65-KDa (TORRES et al., 2003). O gene que codifica o antígeno protéico de 36-kDa, rico em prolina, é chamado gene *pra*, cuja amplificação dá-se através dos *primers* S13 e S62 (WICHITWECHKARN et al., 1995; TORRES et al., 2003).

O produto da amplificação ou *amplicon* do gene *pra* é um fragmento com 531 pares de bases (TORRES et al., 2003), considerado grande, quando comparado com outros *amplicons* específicos para o *M. leprae*. Uma reação em cadeia de polimerase que gera um produto de amplificação longo pode não ter uma sensibilidade tão boa quando comparada com outras reações que originam fragmentos mais curtos pelo fato de fragmentos longos estarem mais susceptíveis a serem danificados e dilacerados durante o manuseio das amostras (DONOGHUE; HOLTON; SPIGELMAN, 2001). Em contrapartida, um fragmento longo pode assegurar que o bacilo esteja viável, uma vez que é mais difícil manter a integridade deste fragmento longo em tecidos de hospedeiros vivos após a morte da bactéria (TORRES et al., 2003). Por essa razão é que, em espécimes arqueológicos que contêm DNA de *M. leprae*, o tamanho máximo de fragmento amplificável é de 200bp (DONOGHUE; HOLTON; SPIGELMAN, 2001).

Ainda que o *Mycobacterium leprae* seja o microrganismo que melhor preserva seu material genético devido à sua espessa parede celular rica em lipídios, os danos causados ao DNA, após uma terapia antimicrobiana ou após a decorrência do tempo, são inevitáveis (DONOGHUE; HOLTON; SPIGELMAN, 2001). Estudos melhor controlados são necessários para determinar uma possível relação entre amplificação de DNA de *M. leprae* e sua viabilidade (TORRES et al., 2003).

Estima-se que, para a detecção de *M. leprae* por métodos não baseados no PCR, isto é, sem amplificação do material genético, sejam necessários no mínimo 10^4 organismos

por grama de tecido para obtenção de resultados confiáveis, situação esta difícil de acontecer em pacientes com a forma indeterminada ou tuberculóide da doença, quando os bacilos álcool-ácido resistentes são geralmente raros (BANG et al., 2009; ALMEIDA et al., 2004). Há, portanto, uma falta de métodos laboratoriais com boa sensibilidade e especificidade para detectar pequeno número de bacilos (WIT et al., 1993).

A maior vantagem do PCR é sua alta sensibilidade e especificidade mesmo na ausência de uma cultura da bactéria, uma vez que o *M. leprae* não é cultivável *in vitro* (GOULART et al., 2007). Essa tecnologia da reação em cadeia de polimerase permite, portanto, a detecção de pequenas quantidades de DNA, muitas vezes, equivalente a 20 micorganismos de *M. leprae* (JADHAV et al., 2001) e até mesmo quantidades de DNA referente a uma única bactéria, segundo Hartskeerl, Wit e Klatser (1989).

Muitos são os espécimes clínicos utilizados na busca de material genético do *Mycobacterium leprae*. Alguns trabalhos reportam material de biópsia, sangue ou linfa de pacientes multibacilares como fontes de DNA (SANTOS et al., 1993). Outros citam, além desses espécimes, pele, bulbos capilares e secreção nasal (ALMEIDA et al., 2004).

Sendo as vias aéreas superiores a principal rota de entrada e saída do *M. leprae* (SMITH et al., 2004; JOB et al., 2008; TORRES et al., 2003; KLATSER et al., 1993), vários estudos têm buscado avaliar a infecção por essa microbactéria através do uso de PCR para amplificação de DNA proveniente de material de mucosa nasal (SMITH et al., 2004; ALMEIDA et al., 2004; WIT et al., 1993; KLATSER et al., 1993; JADHAV et al., 2001; TORRES et al., 2003).

O significado da presença de DNA não está bem elucidado, mas pode representar uma forma subclínica da doença ou presença transitória do *M. leprae* nas mucosas (JADHAV et al., 2001). Estudos, como o de Patrocínio et al. (2005) corroboram essa ideia, ao admitirem que a infecção no corneto nasal inferior é um evento secundário ao desenvolvimento da doença, seguida após a colonização da mucosa nasal pelo bacilo.

Acredita-se, portanto, que essa técnica pode ser usada como uma ferramenta para detecção precoce de novos casos de hanseníase e para prever futuros casos dentre os contatos (BANERJEE et al., 2010).

JUSTIFICATIVA

2 JUSTIFICATIVA

Baseando-se em estudos prévios do nosso grupo de estudo (NAGAO-DIAS et al., 2007; CABRAL et al., 2009), em que verificamos que anticorpos séricos e salivares anti-PGL1 podem ser considerados marcadores de exposição ao *M. leprae* e aliando-se à necessidade de se investir em métodos específicos e sensíveis na detecção do bacilo entre grupos de risco de desenvolver a hanseníase, procuramos associar métodos sorológicos, salivares e de biologia molecular, no intuito de estabelecer a melhor correlação entre eles, para a detecção da infecção subclínica em contatos intradomiciliares de pacientes com hanseníase.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar marcadores séricos e salivares contra *Mycobacterium leprae* e marcadores moleculares em contatos intradomiciliares de pacientes com hanseníase e seus casos índices.

3.2 Objetivos específicos

Determinar os níveis de IgG e IgM anti-PGL1 em amostras de soro dos contatos, associando-os com a classificação operacional do caso índice;

Determinar os níveis de IgA e IgM anti-PGL1 em amostras de saliva dos contatos, associando-os com a classificação operacional do caso índice;

Identificar a presença de *Mycobacterium leprae* em amostras de *swab* nasal dos contatos, associando-os com a classificação operacional do caso índice;

Comparar a presença de *Mycobacterium leprae* em amostras de *swab* nasal dos contatos através da reação em cadeia polimerase (PCR) e da microscopia por meio da coloração de Ziehl-Neelsen;

Correlacionar os marcadores sorológicos e moleculares dos contatos familiares entre si.

METODOLOGIA

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 População alvo

O estudo caracteriza-se por ser do tipo transversal. Foi realizado com 135 contatos intradomiciliares (membros da família ou qualquer indivíduo que residisse na residência do caso índice) de 30 pacientes com hanseníase das cidades de Crato e Maracanaú, as quais estão classificadas como municípios endêmicos para hanseníase do Estado do Ceará. O número de casos novos nos últimos três anos, a contar do ano de início de coleta de cada município, foi de 35 em 2009, 32 em 2010 e 34 em 2011 para Crato, o que totaliza 101 casos novos. Já em Maracanaú esses números foram de 67 em 2006, 57 em 2007 e 73 em 2008, o que soma 197 casos novos (CEARÁ, 2009, 2010, 2011). Os contatos foram previamente avaliados clinicamente por equipe composta de profissionais capacitados para a certificação de que não portavam a doença durante a execução do estudo.

4.2 Coleta de dados

4.2.1 Entrevistas

A seleção dos pacientes e seus contatos e a realização das coletas foram feitas em dois períodos (Maracanaú: janeiro a agosto de 2008; Crato: novembro de 2010 a julho de 2011). Foi aplicado um questionário (Apêndice A) a cada família do caso índice. Foram incluídos nos projetos apenas os casos definidos como hanseníase pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2010). Os critérios de classificação das formas clínicas utilizadas no presente trabalho foram os da Organização Mundial de Saúde (SOUZA, 1997).

4.2.2 Processamento das amostras

Após reunião com os coordenadores locais dos Programas de Controle da Hanseníase, buscou-se avaliar nas fichas de notificação os pacientes e seus contatos. Estes eram contatados para comparecimento aos postos de Saúde. Quando não compareciam, a equipe de coleta, constituída pela pesquisadora e outros colaboradores dirigia-se ao domicílio dos mesmos.

Saliva não estimulada, sangue e material de mucosa nasal eram coletados. As amostras eram acondicionadas em caixas de isopor, refrigeradas com barras de gelo reciclável, e transportadas até o Laboratório de Imunologia, Faculdade de Farmácia, UFC ou, quando isto não era possível, para um outro laboratório, onde o material seria processado e armazenado a -20° C.

4.2.3 Amostras de saliva

A saliva foi coletada sem estímulo após um intervalo de 30 minutos da ingestão de líquidos e 2 horas de alimentação sólida em copo descartável. A coleta foi realizada em um período determinado, pela manhã ou pela tarde. Após a coleta, a saliva era transferida para um tubo *ependorf*, identificado com nome e data da coleta. As amostras foram conservadas a -20° C até o momento da dosagem.

4.2.4 Amostras de sangue

Foi coletado sangue (5ml) de pacientes e contatos em tubos contendo gel separador para obtenção do soro. Após homogeneização, aguardou-se um mínimo de 30 min e as amostras foram centrifugadas a 1500 rpm para separação do soro. Em seguida, as mesmas foram armazenadas a -20° até a realização das dosagens.

4.2.5 Amostras de mucosa nasal

Antes de iniciar o procedimento de colheita do material, o indivíduo era orientado a se sentar e inclinar a cabeça para trás. Após mergulhar o swab estéril em uma solução de salina 0,9% estéril, a haste do swab molhado com salina era introduzida em uma cavidade nasal até haver resistência, sendo feitas quatro rotações. Esse processo era realizado nas duas narinas. Feita a colheita, o swab era imediatamente transferido para um tubo rosqueado contendo a solução de lise (Triton X-100). Após identificação do tubo com o nome do indivíduo e data, a amostra era armazenada a temperatura de -20°C.

A solução de lise foi preparada conforme descrito por Torres et al. (2003), Wit et al. (1991) e Wit et al. (1993). A mesma continha 100mM Tris-HCl, pH 8,5, 3% Triton X-100 e proteinase K na concentração de 1 mg/mL. Antes da adição do Triton e da proteinase K, a solução de Tris-HCL era esterilizada em autoclave por 27 min a 121°C. Após resfriamento da

solução, o restante dos constituintes era adicionado e o tampão de lise, aliquotado (300µL) em tubos rosqueados, e mantidos a -20°C até o uso.

4.3 Análise sorológica

Os testes imunoenzimáticos para dosagem de IgA e IgM salivares anti-PGL1 e de IgG e IgM sérica anti-PGL foram realizados no Laboratório de Imunologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará.

O antígeno glicolipídico fenólico PGL1 purificado de *Mycobacterium leprae* utilizado nos ensaios imunoenzimáticos em fase sólida (ELISA) foi gentilmente doado pelo Dr. John Spencer, de Colorado State University, USA.

Os métodos imunoenzimáticos para dosagem sérica e salivar de anti-PGL1 foram desenvolvidos no laboratório de Imunologia da Faculdade de Farmácia por Nagao-Dias et al. (2007).

Uma concentração de 10 µg/mL de PGL1 foi preparada em álcool etílico absoluto e volumes de 50µl foram colocados em placas de poliestireno (Costar, USA), sendo estas, então, incubadas por 18 a 24h, cobertas com papel de filtro à temperatura ambiente (24° a 26°C).

Para as dosagens dos anticorpos séricos IgG e IgM anti-PGL1, após incubação, realizou-se a etapa de bloqueio, adicionando-se 100 µl de solução de albumina bovina 1% (Sigma, USA) em solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,4), por 2h, à temperatura ambiente em câmara úmida. Após 4 lavagens com PBS-BSA 0,01 %, amostras de soro diluídas a 1:50 em PBS-BSA 0,5% foram adicionadas (50 µl por poço em duplicata) às placas e deixadas por 18 a 24h a 4° C em câmara úmida.

Feita essa etapa, as placas foram submetidas a um novo ciclo de 4 lavagens com PBS-BSA 0,01 %. Em seguida, foi adicionado conjugado anti-IgG ou anti-IgM, marcado com peroxidase (Sigma, USA), diluído a 1:1000, 50 µl por poço, e as placas foram incubadas por 2h à temperatura ambiente em câmara úmida. Após novas lavagens, as placas foram incubadas por 30 min com 100 µl por poço da solução de substrato contendo 0,4 mg ortofenilenodiamina/ ml de tampão citrato-fosfato 0,01 M, pH 5,0. O bloqueio da reação foi

feito a partir da adição de 25 µl de solução de ácido sulfúrico 2,5N. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de placas a 492 nm. Os resultados foram expressos em índices, a partir da relação de absorbância da amostra teste/ amostra controle (*pool* de soro humano normal), previamente descontados os brancos. Para o *cut-off*, foi considerado o valor 1,0. Resultados acima de 1,3 (30% do valor do *cut-off*) foram considerados positivos. Valores abaixo de 1,0 foram considerados negativos, e aqueles entre 1,1 e 1,3 foram considerados indeterminados. Amostras branco eram consideradas como sendo soluções contendo todos os reagentes, exceto o soro.

Quanto à dosagem de IgA e IgM salivar, as placas foram adsorvidas com o antígeno conforme procedimento acima e após bloqueio por 2h, dessa vez utilizando solução de Tris-BSA 1%, as amostras de saliva previamente centrifugadas durante 15 min a 1500 rpm, foram adicionadas às placas diluídas a 1:50 em TRIS-BSA 0,5% (50 µl por poço em duplicata) e incubadas por 18 a 24h, em câmara úmida a 4°C.

Após 4 lavagens com Tris-BSA 0,01%, foi adicionado conjugado anti-IgA ou anti-IgM marcados com fosfatase alcalina (Sigma, USA) na diluição 1:1000 em TRIS-BSA 0,5% e incubado por 2h à temperatura ambiente em câmara úmida. Novas lavagens foram realizadas, e, em seguida, as placas foram incubadas com uma solução de substrato contendo nitrofenilfosfato 1mg/ml de dietanolamina a 10% e MgCl₂ 0,5mM, pH 9,8. A reação foi acompanhada até desenvolvimento de cor, cuja leitura foi realizada em espectrofotômetro de placas a 405 nm. Os resultados foram expressos a partir das medidas de absorbância da amostra teste (descontada a absorbância do branco). O *cut-off* foi considerado como sendo o percentil 97 dos controles normais. Resultados acima de 30% do valor do *cut-off* foram considerados positivos. Calculado o valor, os resultados considerados positivos foram aqueles equivalentes ou superiores a 0,5. Amostras branco foram consideradas como sendo soluções contendo todos os reagentes, exceto a saliva.

Todas as amostras positivas para os testes sorológicos séricos e salivares foram submetidas a um novo teste confirmatório realizado em quadruplicata.

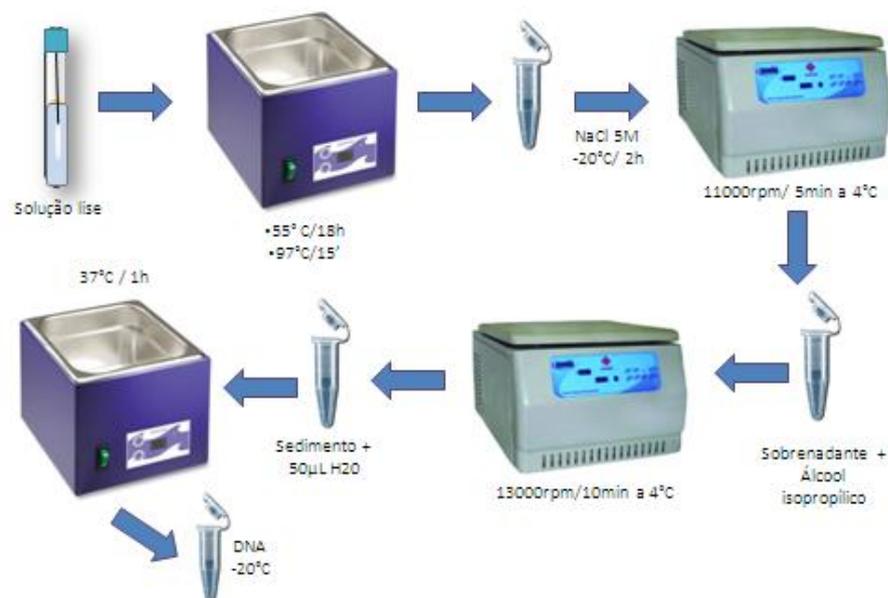
4.4 Biologia molecular

As etapas de extração e amplificação do DNA e visualização do produto amplificado foram realizadas no LABGEM - Departamento de Patologia da UFC, sob supervisão da Profa. Dra. Silvia Barem Rabenhorst.

4.4.1 Extração de DNA

Os tubos contendo a solução de lise e os *swabs* foram incubados a 55°C por 18h e, em seguida, a 97°C por 15 minutos. Após a retirada dos *swabs*, o material foi transferido para tubos de *ependorf* previamente identificados. Foram adicionados 360µL de solução NaCl 5M para cada 800µL de solução de lise e deixados por 2h a -20°C. Após centrifugação dos tubos a 11000 rpm por 5 min a 4°C, os sobrenadantes foram transferidos para outros tubos *ependorf* e igualmente identificados. Em seguida, foram adicionados 2/3 do volume da amostra de álcool isopropílico (gelado). Uma etapa de congelamento (24h, -20°C) e descongelamento (*freezing/thawing*) aconteceu logo depois. Após uma nova centrifugação, a 13000 rpm por 10min a 4°C, o sobrenadante foi descartado e os tubos foram deixados abertos por 16 h em temperatura ambiente a fim de que o álcool evaporasse. Então, 50µL de água destilada e estéril foram adicionados a cada tubo. As suspensões foram, por fim, deixadas em banho-maria por 1h a 37°C e armazenadas a -20°C.

Figura4. Processo de extração de DNA de *Mycobacterium leprae*.



Fonte: Produção própria.

4.4.2 Primers selecionados

Os *primers* utilizados para amplificação do DNA foram selecionados com base na sequência de nucleotídeos do gene que codifica o antígeno 36-kDa do *M. leprae*. Os *primers* específicos para *M. leprae* empregados foram: S13 (5'-CTCCACCTGGACCGGCGAT-3') e S62 (5'-GACTAGCCTGCCAAGTCG-3'), os quais amplificam o fragmento 531pb da sequência do gene *pra* (região rica em prolina) do DNA de *M. leprae* (TORRES et al., 2003).

4.4.3 Amplificação do DNA

O DNA extraído foi adicionado de uma solução contendo 18 µL Tween 20 1%, Master Mix (Promega) e os referidos *primers* selecionados. A amplificação foi realizada com auxílio de um termociclador (Eppendorf, Alemanha) e a programação das etapas de amplificação foi realizada da seguinte forma: 5 minutos iniciais a 94°C seguidos de 38 ciclos (1 min a 94°C, 2 min a 56,5°C, 2 min a 72°C); 7 minutos finais a 72°C, que corresponderam, em ordem de acontecimento, às fases: desnaturação inicial, desnaturação, anelamento, extensão e extensão final.

4.4.4 Visualização

O produto da amplificação foi submetido a uma eletroforese em gel de agarose 2% e corado com brometo de etídio.

4.5 Aspectos éticos

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Ceará em 05/09/2005. Todos os participantes assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice B) após devido esclarecimento a respeito deste trabalho. O projeto teve apoio logístico da Secretaria Municipal de Maracanaú e de Crato relativo ao fornecimento da lista dos casos índices.

CAPÍTULO 1

5 CAPÍTULO 1

Anticorpos salivares IgA/IgM, séricos IgG/IgM anti-PGL1 e DNA de *M. leprae* em mucosa nasal de indivíduos com contato intradomiciliar com a hanseníase.

Anti-PGL1 salivary IgA/IgM, serum IgG/IgM and nasal *M. leprae* DNA in individuals with household contact with leprosy.

Artigo submetido ao periódico International Journal of Infectious Diseases

Fator de Impacto: 1.938 Qualis B2 (2012)

Anti-PGL1 salivary IgA/IgM, serum IgG/IgM and nasal *M. leprae* DNA in individuals with household contact with leprosy.

Paula Brito e Cabral¹, José Evandro Cunha Júnior¹, Alexandre Casimiro de Macedo¹, Thially Braga Gonçalves¹, Tereza Cristina Brito e Cabral², Ana Paula Soares Gondim³, Lilia Maria Carneiro Câmara⁴, Silvia Helena Barem Rabenhorst⁴, Aparecida Tiemi Nagao-Dias¹. ¹Dept. Clinical Analysis and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal do Ceará-UFC, Brazil. ²Municipal Health Secretariat, Crato, Ceara, Brazil. ³Post- Graduation Program in Collective Health, Universidade de Fortaleza, Ceara, Brazil. ⁴Dept. Pathology, Faculty of Medicine, UFC, Brazil.

Correspondence Address:

Paula Brito e Cabral

Rua Capitão Francisco Pedro, 1210

Laboratory of Immunology

Dept. Clinical Analysis and Toxicology

Faculty of Pharmacy

Universidade Federal do Ceará

CEP 60430-370 Fortaleza, Ceara, Brazil

Phone: 55-85-33668270

Fax: 55-85-33668292

E-mail: paulabbcc@yahoo.com.br

ABSTRACT

Objectives. Leprosy household contacts (HHC) represent a group that is at high risk of developing the disease. Our interest was to detect *Mycobacterium leprae* infection in these HHC.

Methods. Acid-fast bacillary staining (AFB) in nasal secretions, serum anti-PGL1 IgG/IgM and salivary IgA/IgM, using enzyme-linked immunosorbent assay, and detection of nasal carriage of *Mycobacterium leprae*, submitted to amplification by polymerase chain reaction (PCR) were tested in leprosy household contacts from paucibacillary (PB) and multibacillary (MB) leprosy patients (n=135) and their index cases (n=30).

Results. Salivary anti-PGL1 IgA and IgM, and serum anti-PGL1 IgG showed good correlation comparing contacts and index cases ($p<0.01$, $p<0.005$ and $p<0.0001$, respectively). This was not observed for serum anti-PGL1 IgM ($p>0.05$). High frequency of anti-PGL1 IgM positivity were found in IgG-negative samples ($p<0.0001$). For IgG-positive samples, IgM antibodies were also positive in most of the samples. *M.leprae* DNA was found in the nasal swabs from 9 out of the 85 MB household leprosy contacts (10.6%) and in 3 out of the 50 PB household leprosy contacts (6.0%).

Conclusions. We suggest that combination of serum IgG/IgM and salivary anti-PGL1 IgA/IgM measurement in leprosy household contacts could identify the groups of greater risk for developing the disease. The detection of nasal *M. leprae* DNA is not essential to follow the leprosy contacts once a high percentage of negative results was found among seropositive individuals.

Keywords: *Mycobacterium leprae*, anti-PGL1, serum antibodies, salivary antibodies, Polymerase chain reaction.

INTRODUCTION

Leprosy remains a public health challenge, with approximately 250 000 new cases being reported each year in the world¹. According to the World Health Organization (WHO), Brazil has the second highest number of cases in the world with 34 894 new cases registered in 2010². In 2011, a total of 2003 cases were reported in the Ceara state, which represents a detection coefficient of 23.7/100 000 inhabitants³.

Strategies for leprosy control include administration of multidrug therapy (MDT) to the patients and vaccination of household contacts with the Bacillus Calmette-Guerin (BCG) vaccine⁴. The WHO also recommends clinical evaluation of leprosy household contacts and health education as part of the disease control strategy¹. Physical examination does not identify the early stages of the disease when clinical manifestations are rarely present^{5,6}. Therefore, it is necessary to employ more sensitive tools in order to investigate *M. leprae* infection among household contacts⁵. Serological and polymerase chain reaction (PCR) tests have been used in seroepidemiological studies^{1,6}.

Phenolic glycolipid (PGL1) is a *M. leprae* specific antigen⁷ and the dominant lipid in the cell wall is responsible for its immunological specificity⁸. The most studied antibody isotype is the serum anti-PGL1 IgM^{9,10,11,12}. Few studies evaluate salivary anti-PGL1 IgA and IgM^{13,14} or serum anti-PGL1 IgG^{15,16,14,17,7}. Our previous work suggested that salivary anti-PGL1 IgA and IgM antibodies might be indicative of infection but not of disease¹⁷. It is known that individuals seropositive to anti-PGL1 antibodies have a 7.5-fold greater risk of acquiring leprosy compared to seronegative contacts¹⁸. A prospective study⁹ demonstrated that two seropositive contacts progressed to clinical, borderline tuberculoid (BT) leprosy within 1 year of follow-up.

Several authors have described methods to detect *M. leprae* based on nucleic acid amplification techniques^{19,20,21,22,23,6} once direct bacterial detection tests have too low sensitivity²⁴.

In the present work, we evaluated serum IgG/IgM and salivary IgA/IgM against PGL1 in addition to the detection of nasal carriage of *Mycobacterium leprae* in leprosy household contacts from paucibacillary and multibacillary leprosy patients.

MATERIALS AND METHODS

Patients and contacts

Thirty leprosy patients (median age 45 years) and 135 household contacts (median age 26 years) living in the cities of Crato and Maracanaú, Ceará state, Brazil, were included in the study. These cities present high prevalence of leprosy³.

Leprosy diagnosis and classification of the index cases were based on clinical assessment and on the detection of acid-fast bacilli in skin slit smears. The leprosy patients were classified as paucibacillary (PB, less than five skin lesions) or as multibacillary (MB, more than 5 skin lesions)²⁵. The study was approved by the Ethics Committee of Universidade Federal do Ceara, and each participant or his/her guardian was asked to sign a written informed consent.

Samples

Five milliliters of venous blood were collected into clot activator tubes containing gel separator. After 30 min, the samples were centrifuged at 1500 x g for 10 min, and the serum was separated and stored at -20° C. Unstimulated saliva was collected 30 minutes after water consumption and two hours after solid food intake. The saliva samples were kept at -20° C. Using sterile swabs moistened in 0.9% saline solution, nasal secretions were collected from both nostrils by gently swabbing the outer nares. Each swab tip was placed into a tube containing 300 µL of lysis solution. The lysis solution was comprised of 100 mM Tris-HCl, pH 8.5, with 3% Triton X-100 and 1 mg/mL proteinase K. The nasal swabs were kept at -20° C.

Serum analysis

Serological analysis for anti-PGL1 antibodies were performed according to the procedure described elsewhere¹⁴.

Ninety-six well flat-bottom microplates (Costar, USA) were coated with 10 mg/L of native PGL-1 in absolute ethyl alcohol (50 µL per well), kindly donated by Dr. John Spencer, Colorado State University, USA. The plates were incubated for 18 h at room temperature. For serum IgG and IgM antibody measurement, the microplates were incubated with 1% bovine serum albumin (BSA, Sigma, USA) in phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) for 2 h at room temperature in a humid chamber. After four washes with PBS-0.01% BSA, serum samples previously diluted 1:50 in PBS-0.5% BSA were added to the plates (50 µL per well, in duplicate). The plates were then incubated overnight at 4°C. After washing, peroxidase-labeled anti-IgG or anti-IgM (Sigma, USA) previously diluted 1:1000 was added to the plates and incubated for 1.5 h at room temperature. After washing, the plates were incubated for 30 min with the substrate solution which contained 0.4 mg

orthophenylenediamine/ml of 0.01 M citrate-phosphate buffer, pH 5.0. The reaction was interrupted by adding 25 μ L of 2.5 N sulfuric acid. The analysis was performed at 492 nm using an ELISA plate reader. An aliquot of pooled normal human serum was used as cut-off sample and tested in all assays. The results were expressed according to the following formula: optical density (OD) mean of the test sample (minus blank) divided by the OD mean of the normal human serum pool (minus blank). The cut-off was considered to be 1.0. Values above 1.3, which were 30% above the cut-off, were considered to be positive (Nagao-Dias et al., 2007). The cut-off sample was obtained from 50 healthy blood seronegative donors to HIV, Chagas, hepatitis B and C, HTLV, syphilis and that did not have leprosy at the time of sample collection.

Salivary analysis

For salivary IgA and IgM measurement, PGL1- coated plates were blocked with 1% BSA-Tris solution for 2 h at room temperature. Saliva samples, previously centrifuged at $2600 \times g$ for 15 min at 4 °C, were diluted 1:50 with 0.5% BSA-Tris, added to the plates (50 μ L per well in duplicate), and incubated for 18 h at 4 °C. After four washes with 0.01% BSA-Tris, alkaline phosphatase-conjugated anti-IgA or anti-IgM (Sigma, USA) was diluted 1:1000 in 0.5% BSA-Tris and added to the plates. The plates were then incubated for 2 h at room temperature. After washing, the plates were incubated with the substrate solution (1 mg/mL p-nitrophenyl phosphate in 10% diethanolamine containing 0.5 mM $MgCl_2$, pH 9.8). After 100 min, absorbance readings were recorded at 405 nm by using an ELISA plate reader. The results were expressed as the optical density (OD) mean of the values (minus the blank). The cut-off was considered to be the 97th percentile of normal controls¹⁴. Results considered to be 30% above the cut-off value were considered to be positive. Blank samples contained all reagents except for saliva or serum.

Molecular M. leprae detection

Detection of *M. leprae* DNA in nasal swab was performed according to the procedures described by Torres et al. [21], De Wit et al. [26] and De Wit et al. [27], with some modifications.

The nasal swabs immersed in lysis buffer were incubated at 55 °C for 18 h followed by incubation for 15 min at 97 °C. After removing the swabs, 135 µL of 5 M NaCl solution were added into each tube and incubated for 2 h at -20 °C. After centrifugation at 8,117 x g for 5 min at 4 °C, DNA contained in the supernatant fraction was precipitated by addition of 2 volumes of ice cold isopropyl alcohol. The solution was kept for 24 h at -20 °C. After a new centrifugation at 8,117 x g for 5 min at 4 °C, the supernatant was discarded and the tubes were left open overnight at room temperature to allow the alcohol to evaporate. Subsequently, 50 µL of sterile distilled water were added to each tube and left in a water bath for 1 h at 37 °C. The DNA samples were stored at -20 °C until further analysis.

DNA primers S13 (5'-CTCCACCTGGACCGGCGAT-3') and S62 (5'-GACTAGCCTGCCAAGTCG-3') were selected based on the nucleotide sequence of the 531-bp fragment (proline-rich region) from a specific gene that encodes the 36-kDa antigen of *M. leprae*²¹.

The PCR technique was performed by adding 5.2 µl sterile water, 2 µl Tween 20, 10 µl Master mix (Promega, USA), 0.4 µl primers, and 2 µl DNA template to each microtube. Subsequently, the samples were subjected to 38 amplification cycles after an initial denaturation step at 94 °C during 5 min. An amplification cycle consisted of 1 min at 94 °C, 2 min at 56.5 °C, and 2 min at 72 °C. A final elongation step of 7 min at 72 °C completed the amplification. Four microliters of the amplicon were subjected to electrophoresis in a 2%

agarose gel. The DNA was visualized under ultraviolet light after staining the gel with ethidium bromide.

Acid fast stain from nasal smears

Smears from nasal mucous were carefully taken using a sterile cotton swab. After, they were spread onto slides and stained using the Ziehl Neelsen stain. The samples were examined for the presence of acid fast bacilli, and a bacillary index (BI) was estimated.

Statistical analysis

The data were analyzed using nonparametric tests once the data did not follow a Gaussian distribution (Kolmogorov-Smirnov test, $p < 0.0001$). The Wilcoxon and Spearman tests were used to compare the isotype titers (serum IgG and IgM or salivary IgA and IgM) between paired groups. The Fisher test was used to calculate the probability of association between the clinical form of the leprosy disease and the frequency of positive or negative antibody/molecular results. The software used for statistical analysis was Prism GraphPad InStat version 3.10.

The level of statistical significance was considered to be 0.05 with a confidence interval of 95%.

RESULTS

Index cases

A total of 30 leprosy patients were included in the study. The classification of the clinical forms of the disease followed the criteria established by the World Health Organization (WHO)²⁵. Among the patients, 17 were classified as multibacillary (MB) patients and 13 as paucibacillary (PB) patients.

Household contacts

A total of 135 leprosy household contacts were included in the study. The median age of the studied population was 26 years old (range from 7 to 81 years old). Fifty out of 135 (37.0%) were contacts of PB leprosy patients, and 85 out of 135 (63.0%) were contacts of MB leprosy patients.

The table 1 presents the positivity of serological and molecular parameters in leprosy contacts. Eighty five out of 135 samples were positive for serum antibodies (62.9%). Forty five samples (33.3%) were positive for salivary antibodies and 12 out of 135 (26.7 %) were positive for *M. leprae* DNA. No statistical significance was found when the frequencies of the serum and salivary antibodies or the *M. leprae* DNA ($p>0.1$, $p>0.1$ and $p=0.5$, respectively) were associated with the PB and MB household contacts.

Index cases

Each leprosy contact was paired with his (her) index case for evaluating statistical correlation. It was not possible to collect samples from some index cases. For this reason, only 97 household contacts and 30 leprosy patients were correlated with each other. The

figure 1 demonstrates the correlation of serum and salivary antibody titers between contacts and index cases. Salivary anti-PGL1 IgA titers showed good correlation comparing contacts and index cases (Spearman test, $r=0.25$, $p<0.01$); similar observation was done for salivary anti-PGL1 IgM ($r=0.34$, $p<0.005$) and serum anti-PGL1 IgG levels ($r=0.39$, $p<0.0001$). The same was not observed for serum anti-PGL1 IgM, which showed a poor correlation, when contacts and index cases were compared with each other ($r=0.14$, $p>0.05$).

Serum antibody isotypes

A statistically significant correlation was found between IgM and IgG isotypes for both the MB (Spearman correlation, $r = 0.39$, $p<0.0001$) and the PB ($r = 0.39$, $p< 0.005$) leprosy household contacts. However, the IgM and IgG levels were very different from one another (Wilcoxon test, $p<0.0001$). Considering serum IgG-negative and IgG-positive samples separately (Figure 2), high frequency of anti-PGL1 IgM positivity (71 out of 121 samples, that is, 58.6%) were found in IgG-negative samples (Wilcoxon test, $p<0.0001$). For IgG-positive samples, IgM antibodies were also positive in most of the samples (10 out of 14 samples, that is 71.4%) and their levels did not differ significantly from the IgG titers (Wilcoxon test, $p >0.1$).

Salivary antibody isotypes

A statistically significant positive correlation between salivary IgA and IgM was found both in PB (Spearman correlation, $r = 0.54$, $p<0.0001$) and MB ($r = 0.61$; $p<0.0001$) leprosy household contacts.

Twenty four out of 45 leprosy household contacts who demonstrated positivity for salivary antibodies (53.3%) were negative for serum antibodies. Conversely, sixty four out of

90 leprosy household contacts who demonstrated negativity for salivary antibodies (71.1%) were positive for serum antibodies (Table 2, Fisher test, $p < 0.01$).

Molecular detection

The method to amplify *M. leprae* was able to detect 733 fg of *M. leprae* DNA, which is equal to 203 bacilli (data not shown). The DNA concentration was estimated based on the size of the *M. leprae* genome, which is 3.27 Mb or 3.6 fg²³.

M. leprae DNA was found in the nasal swabs from 9 out of the 85 MB household leprosy contacts (10.6%) and in 3 out of the 50 PB household leprosy contacts (6.0%). Among the 12 contacts who were positive for *M. leprae* DNA (Table 3), 5 were positive for serum anti-PGL1 IgM, 7 were positive for salivary anti-PGL1 antibodies and one was positive for all of the isotypes, except for salivary anti-PGL1 IgM. This individual was the only one who did not have a BCG scar.

DISCUSSION

Early detection of the disease is a strategy to interrupt *M. leprae* transmission and to prevent the occurrence of physical disabilities, a severe consequence of late diagnosis¹. In endemic areas, sensitive and specific serological tests associated with molecular parameters could be of great use for following contacts at high risk of developing the disease¹¹. In this context, serological and molecular tests have been used^{10,9}.

When a clinical examination of a leprosy contact is performed, suspected cases can be registered. Bazan-Furini et al. [9] detected new leprosy cases in 3.3% of the patient's contacts (co-prevalent cases). Similar results were found by Cardona-Castro et al. [28] and Sales et al. [4] who observed a rate of co-prevalent cases of 5.2%. In our study, we performed clinical evaluation in all contacts of the study to make sure about their health condition and we did not find any co-prevalent case among the contacts.

Many authors refer to anti-PGL1 IgM as the main serological parameter in leprosy^{29,10,30,31}. It is known that the IgM isotype is the cause of the false positive results that are obtained in diagnostic tests. The false positivity occurs in toxoplasmosis³² and other pathologies^{33,34}. Serum anti-PGL1 IgG can be an important parameter to be evaluated because only few contacts present it. Fifty eight percent of the IgG-negative samples showed positivity for IgM. On the other hand, 71.4% of the IgG-positive samples were also positive for IgM. This means that both isotypes should always be measured. We believe that those individuals that are positive for both the isotypes should be followed every year. Additionally, those who present with anti-PGL1 IgM levels with titers above 3.0 should be followed as well. In this order, we doubt about the usefulness of immunochromatography tests once they are not able to quantify antibodies in samples.

In a cross-sectional study that was conducted by our group (unpublished observations), it was verified that serum anti-PGL1 IgG was not present in healthy volunteers who did not have any previous contact with leprosy patients. However, anti-PGL1 IgM was present in half of these individuals. In our previous study, we found that 1 out of 127 participants with varying degrees of exposure to leprosy patients was positive for serum IgG¹⁷.

The search for new markers is necessary to improve the investigation of leprosy household contacts¹⁰. Therefore, it is important to use parameters such as salivary anti-PGL1 IgA and IgM^{13,14,17} for searching *M.leprae* infection and serum anti-PGL1 IgG, besides IgM, to search people at high risk of acquiring leprosy.

The percentage of leprosy contacts with positive titers of salivary anti-PGL1 antibodies was 33.3%, much lower than the frequency (68%) reported by Smith et al. [13]. We could not find any other work related to salivary antibodies among leprosy household contacts.

We verified that 24 out of 45 leprosy contacts (53.3%) who were positive for salivary antibodies did not present serum antibodies. Assuming a diagnosis specificity of approximately 91% for the salivary anti-PGL1 antibody test¹⁷, we can hypothesize that 48% of the individuals were infected but did not develop serum antibodies. This fact probably represents that they are infected with *M. leprae* but they will not necessarily acquire the disease. Conversely, 64 out of 90 leprosy household contacts (71.1%) who were negative for salivary anti-PGL1 presented serum antibodies. It is already known that the maintenance of long-term immunological memory in the mucosal surfaces is a great challenge³⁵. After mucosal colonization, the bacteria can translocate into the systemic circulation, reducing the

bacterial load at nasal surfaces. In this case, it is reasonable to assume that secretory antibodies will decrease, meanwhile serum antibody levels increase.

All household contacts in our study showed negative bacilloscopy of the nasal mucus. When the molecular techniques were performed, 8.9% of the samples showed test positiveness. Other authors have found the following percentages of positivity: 8.5%, 1.6%, 19.35%, 6.83%, 5.4%, respectively by Job et al. [36], Smith et al. [13], Martins et al. [37], Martinez et al. [12] and Cardona-Castro et al. [10].

One person showed both positive molecular and serological parameters, except for salivary anti-PGL1 IgM, and did not show a BCG scar. According to Lobato et al. [11], individuals without a BCG scar are at a higher risk of developing leprosy. We believe that this person should be followed up. Richardus et al. [38] suggested that BCG vaccination does not offer full protection against leprosy. This is reinforced by Sales et al. [4] who demonstrated that 89% of BCG vaccinated leprosy contacts developed the paucibacillary form of the disease, indicating the protective effect of BCG vaccination against the multibacillary form of the disease.

We strongly suggest that combination of serum IgG/IgM and salivary anti-PGL1 IgA/IgM measurement in leprosy household contacts can adequately identify the groups at higher risk of developing the disease^{21,12}. The detection of nasal *M. leprae* DNA is not essential to follow the leprosy contacts because of the high percentage of negative results in the contacts even those with positive serology.

ACKNOWLEDGEMENT

This research was supported by the Ministério da Saúde/DECIT/SESA-Ceará and by the CNPq (process 472.471/2007-4).

REFERENCES

1. Rodrigues LC, Lockwood DNJ. Leprosy now: epidemiology, progress, challenges, and research gaps. *Lancet Infect Dis* 2011; 11: 464-70.
2. World Health Organization, Organization Mondiale de la Santé. *Weekly Epidemiological Record* 2011; 36: 389-400.
3. Ceará. State Department of Health. Informe Epidemiológico Hanseníase – June/2012.
4. Sales AM, Ponce de Leon A, Düppre NC, et al. Leprosy among patient contacts: A multilevel study of risk factors. *Negl Trop Dis* 2011; 5(3): e1013.
5. Cardona-Castro N, Beltrán-Alzate JC, Romero-Montoya M. Clinical, bacteriological and immunological follow-up of household contacts of leprosy patients from a post-elimination área – Antioquia, Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104(6): 935-936.
6. Banerjee S, Sarkar K, Gupta S, et al. Multiplex PCR technique could be an alternative approach for early detection of leprosy among close contacts – a pilot study from India. *Infecto Dis* 2010; 10: 252.
7. Jadhav R, Suneetha L, Kamble R, et al. Analysis of antibody and cytokine markers for leprosy nerve damage and reactions in the INFIR cohort in India. *Plos Negl Trop Dis* 2011; 5(3): e977.
8. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19(2):338-381.
9. Bazan-Furini R, Motta ACF, Simão JCL, et al. Early detection of leprosy by examination of household contacts, determination of serum anti-PGL-1 antibodies and consanguinity. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011; 106(5): 536-540.

10. Cardona-Castro N, Beltrán-Alzate JC, Manrique-Hernández R. Survey to identify *Mycobacterium leprae*-infected household contacts of patients from prevalent regions of leprosy in Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz 2008; 103(4): 332-336.
11. Lobato J, Costa MP, Reis EM, et al. Comparison of three immunological tests for leprosy diagnosis and detection of subclinical infection. Lepr Rev 2011; 82: 389-401.
12. Martinez TS, Figueira MMNR, Costa AV, Gonçalves MA, Goulart LR, Goulart IMB. Oral mucosa as a source of *Mycobacterium leprae* infection and transmission, and implications of bacterial DNA detection and the immunological status. Clin Microbiol Infect 2011; 17: 1653-1658.
13. Smith WCS, Smith CM, Cree IA, et al. An approach to understanding the transmission of *Mycobacterium leprae* using molecular and immunological methods: results from the MILEP2 study. Int Lepr Other Mycobact Dis 2004; 72:269-277.
14. Nagao-Dias AT, Almeida TLP, Oliveira MF, Santos RC, Lima ALP, Brasil M. Salivary anti-PGL IgM and IgA titers and serum antibody IgG titers and avidities in leprosy patients and their correlation with time of infection and antigen exposure. Braz J Infect Dis 2007; 11:215-219.
15. Levis WR, Meeker HC, Schuller-Levis GB, Gillis TP, Marino Jr LJ, Zabriskie J. Serodiagnosis of leprosy: Relationships between antibodies to *Mycobacterium leprae* phenolic glycolipid I and protein antigens. J Clin Microbiol 1986; 24(6):917-921.
16. Izumi S, Fujiwara T, Ikeda M, et al. Novel Gelatin Particle Agglutination Test for Serodiagnosis of Leprosy in the Field. J Clin Microbio 1990; 28(3): 525-529.

17. Cabral PB, Alves RA, Medeiros KBA, Castelo-Branco ES, Alencar CP, Nagao-Dias AT. Use of serum and salivary anti-PGL1 markers as parameters for occupational exposure to *Mycobacterium leprae*. Rev Panam Infectol 2009; 11: 21-26.
18. Douglas JT, Cellona RV, Fajardo TT, Abalos RM, Balagon F, Klatser PR, et al. Prospective Study of Serological Conversion as a Risk Factor for Development of Leprosy among Household Contacts. Clin Diagn Labor Immunol 2004; 11: 897-900.
19. Donoghue HD, Holton J, Spigelman M. PCR primers that can detect low levels of *Mycobacterium leprae* DNA. Med. Microbiol 2001; 50: 177-182.
20. Jadhav RS, Macdonald M, Bjune G, et al. Simplified PCR detection method for nasal *Mycobacterium leprae*. International Journal of Leprosy 2001; 69(4): 299-307.
21. Torres P, Camarena JJ, Gomez JR, et al. Comparison of PCR mediated amplification of DNA and the classical methods for detection of *Mycobacterium leprae* in different types of clinical samples in leprosy patients and contacts. Lepr Rev 2003; 74: 18-30.
22. Goulart IMB, Cardoso AM, Santos MS, et al. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin lesions of leprosy patients by PCR may be affected by amplicon size. Arch Dermatol Res 2007; 299: 267-271.
23. Bang PD, Suzuki K, Phuong LT, et al. Evaluation of polymerase chain reaction-based detection of *Mycobacterium leprae* for the diagnosis of leprosy. J Dermatol 2009; 36(5): 269-276.
24. Almeida EC, Martinez AN, Maniero VC, et al. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA by polymerase chain reaction in the blood and nasal secretion of Brazilian household contacts. Mem Inst Oswaldo Cruz 2004; 99(5): 509-512.

25. Brazil. Ministério da Saúde. Portaria N° 3.125, de 7 de outubro de 2010. Aprova as diretrizes para vigilância, atenção e controle da hanseníase. 2010.
26. De Wit MYL, Faber WR, Krieg SR. Application of a polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae* in skin tissues. *J. Clin. Microbio* 1991; 29(5): 906-910.
27. De Wit MYL, Douglas JT, Mcfadden J, Klatser PR. Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium leprae* in nasal swab specimens. *J. Clin. Microbio* 1993; 31(3): 502-506.
28. Cardona-Castro N, Restrepo-Jaramillo S, Gilde La Ossa M, Brennan P. Infection by *Mycobacterium leprae* of household contacts of lepromatous leprosy patients from a post-elimination leprosy region of Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100: 703-707.
29. Oskam L, Slim E, Bühner-Sékula S, et al. Serology: Recent developments, strengths, limitations and prospects: a state of the art overview. *Lepr Rev* 2003; 74:196-205.
30. Moura RS, Calado KL, Oliveira MLW, Buhner-Sékula S. Leprosy serology using PGL1: a systematic review. *Rev Soc Bras Med Trop* 2008; 41:11-18.
31. Zenha EMR, Ferreira MAN, Foss NT. Use of anti-PGL-1 antibodies to monitor therapy regimes in leprosy patients. *Braz J Med Biol Res* 2009; 42(10):968-972.
32. Liesenfeld O, Press C, Montoya JG, et al. False-positive results in immunoglobulin M (IgM) *Toxoplasma* antibody tests and importance of confirmatory testing: the platelia toxo IgM test. *J. Clin. Microbiol* 1997; 35: 174-178.
33. Reiche EMV, Morimoto HK, Farias GN, Hisatsugu KR, Geller L, Gomes ACLF. Prevalência de tripanossomíase americana, sífilis, toxoplasmose, rubéola, hepatite B, hepatite C, e da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana, avaliada por intermédio de testes

sorológicos, em gestantes atendidas no período de 1996 a 1998 no Hospital Universitário Regional Norte do Paraná (Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil). *Rev Soc Bras Med Trop* 2000; 33(6):519-527.

34. Hunsperger EA, Yoksan S, Buchy P, Nguyen C, Sekaran SD, Enria DA, et al. Evaluation of commercially available anti-dengue virus immunoglobulin M tests. *Emerg Infect Dis* 2009; 15(3):436-40.

35. Soenawan E, Srivastava I, Gupta S, Kan E, Janani R, Kazzaz J, Singh M, Shreedhar V, Vajdy M. Maintenance of long-term immunological memory by low avidity IgM-secreting cells in bone marrow after mucosal immunizations with cholera toxin adjuvant. *Vaccine* 2004; 22: 1553-1563.

36. Job CK, Jayakumar J, Kearney M, Gillis TP. Transmission of Leprosy: A study of skin and nasal secretions of household contacts of leprosy patients using PCR. *Am. J. Trop. Hyg* 2008; 78(3): 518-21.

37. Martins ACC, Miranda A, Oliveira MLWR, Buhner-Sékula S, Martinez A. Nasal mucosa study of leprosy contacts with positive serology for the phenolic glycolipid 1 antigen. *Braz J Otorhinolaryngol* 2010; 76(5): 579-87.

38. Richardus JH & Habbema JDF. The impact of leprosy control on the transmission of *M. leprae*: is elimination being attained?. *Lepr Rev* 2007; 78:330-337.

Table 1: Frequency of positive serum and salivary anti-PGL1 antibody titers, and nasal *M. leprae* DNA, among leprosy household contacts.

Leprosy contacts - Clinical form of the index case	Anti-PGL1 antibodies		<i>M. leprae</i> DNA
	Serum n (%)	Saliva n (%)	Nasal n (%)
Paucibacillar (n=50)	29 (58%)	14 (28%)	3 (6%)
Multibacillar (n=85)	56 (65.8%)	31 (36.5%)	9 (10.6%)
Fisher test (<i>p</i>)	>0.1	>0.1	> 0.5
Total (n=135, 100%)	85 (62.9%)	45 (33.3%)	12 (26.7%)

Table 2. Frequency of positive or negative serum and salivary anti-PGL1 antibody titers in leprosy household contacts.

Salivary antibodies	Serum antibodies		
	Positive n (%)	Negative n (%)	Total n (%)
Positive	21 (46.7%)	24 (53.3%)	45 (100%)
Negative	64 (71.1%)	26 (28.9%)	90 (100%)
Fisher test	<i>p</i> <0.01		

Table 3: Serum and salivary anti-PGL1 titers in multibacillary (MB) and paucibacillary (PB) leprosy household contacts whose nasal swabs were PCR positive for *M. leprae* DNA. Presence or absence of the BCG scar was also observed.

Leprosy household contact	Clinical form of index case	Age (years)	BCG scar	Serum		Saliva	
				IgG	IgM	IgA	IgM
C49.3	MB	19	yes	0.7	3.1	0.64	0.01
C13.1	MB	73	yes	0.1	0.4	0.14	0.05
C13.2	MB	55	yes	0.3	0.7	0.58	0.02
C32.1	MB	26	yes	0.6	2.2	0.18	0.03
C1.3	MB	27	yes	0.3	0.4	0.50	0.02
C1.6	MB	52	yes	0.3	0.8	1.7	3.0
C9.4	MB	30	yes	1.1	1.1	1.1	0.03
C8.4	MB	29	yes	0.3	0.6	0.60	0.04
C53.1	MB	34	yes	0.8	1.7	0.08	0.00
C46.2	PB	13	yes	0.9	3.1	0.10	0.02
C12.4	PB	20	yes	0.3	1.0	0.13	0.05
C6.1	PB	39	no	1.4	2.1	1.1	0.14

Cut-off value was 1.3 and 0.5 for serum and salivary antibodies, respectively.

Figure 1: Correlation of serum IgG/IgM and salivary IgA/IgM against PGL1 between 97 leprosy household contacts and their corresponding index cases.

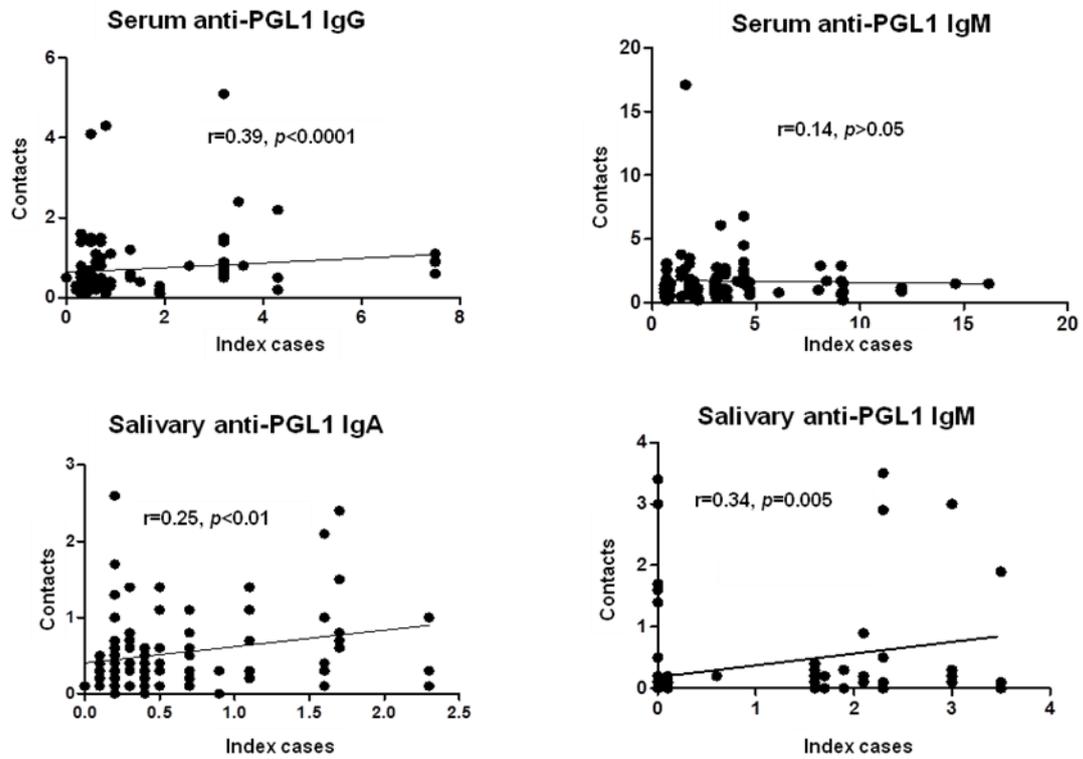
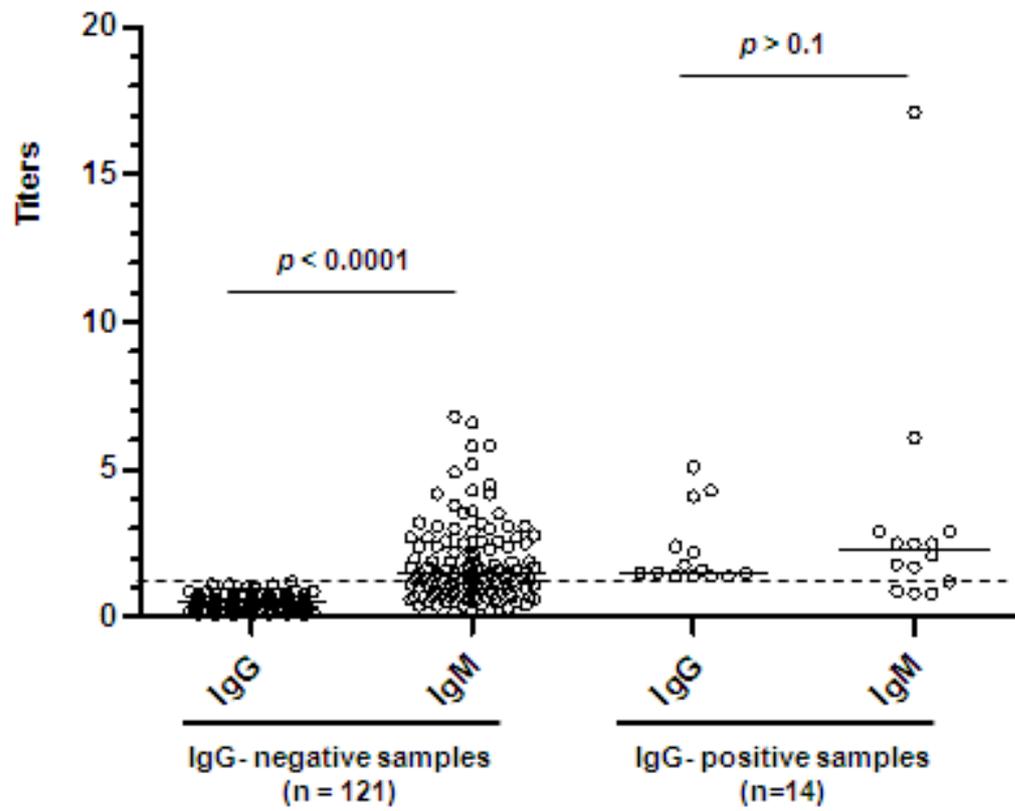


Figure 2: Serum anti-PGL1 IgM and IgG titers in IgG-positive and IgG-negative samples. The dashed line indicates the cut-off value (1.3).



6 CONCLUSÕES

- Positividade para os anticorpos séricos IgG e IgM anti-PGL1 em contatos de pacientes com hanseníase pode indicar risco aumentado para o desenvolvimento de hanseníase nesses indivíduos;
- Níveis elevados de IgM sérica anti-PGL1 (valores >3,0) em contatos de pacientes com hanseníase pode também indicar risco aumentado para o desenvolvimento de hanseníase nesses indivíduos ;
- Anticorpos salivares IgA e IgM anti-PGL1 podem ser os primeiros marcadores sorológicos detectáveis em contatos de pacientes com hanseníase;
- A detecção de DNA de *M. leprae* em mucosa nasal de contatos de pacientes com hanseníase não é essencial para considerar esses indivíduos como grupo de risco para desenvolver a doença, uma vez que alta porcentagem de resultados negativos para presença DNA de *M. leprae* foi encontrada entre indivíduos soropositivos.
- Sugerimos que a combinação de testes séricos IgG/IgM e salivares IgA/IgM anti-PGL1 em contatos intradomiciliares de pacientes com hanseníase pode identificar grupos de alto risco de desenvolver a doença.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, E. C.; MARTINEZ, A. N.; MANIERO, V. C.; SALES, A. M.; DUPPRE, N. C.; SARNO, E. N.; SANTOS, A. R.; MORAES, M. O. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA by polymerase chain reaction in the blood and nasal secretion of Brazilian household contacts. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 5, p. 509-512, 2004.
- BACH, M. A.; WALLACH, D.; FLAGUEL, B.; HOFFENBACH, A.; COTTENOT, F. Antibodies to phenolic glycolipid-1 and to whole *Mycobacterium leprae* in leprosy patients: evolution during therapy. **Int. J. Lepr.**, v. 54, n. 2, p. 256-267, 1986.
- BANERJEE, S.; SARKAR, K.; GUPTA, S.; MAHAPATRA, P. S.; GUPTA, S.; GUHA, S.; BANDHOPADHAYAY, D.; GHOSAL, C.; PAINE, S. K.; DUTTA, R. N.; BISWAS, N.; BHATTACHARYA, B. Multiplex PCR technique could be an alternative approach for early detection of leprosy among close contacts – a pilot study from India. **Infect. Dis.**, v. 10, p. 252, 2010.
- BANG, P. D.; SUZUKI, K.; PHUONG, L. T.; CHU, T. M.; ISHII, N.; KHANG, T. H. Evaluation of polymerase chain reaction-based detection of *Mycobacterium leprae* for the diagnosis of leprosy. **J. Dermatol.**, v. 36, n. 5, p. 269-276, 2009.
- BARROS, R. P. C.; OLIVEIRA, M. L.W. del R. Detecção de anticorpos específicos para o antígeno glicolípide fenólico-1 do *M. leprae* (anti PGL-1 IgM): aplicações e limitações. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v. 75, n. 6, p. 745-753, 2000.
- BÁRTHOLO, R. M.; BÁRTHOLO, T. P. Imunidade inata e a importância dos receptores Toll-similar. **Pulmão**, supl. 2, p. S2-S8, 2009.
- BAUMGART, K. W.; BRITTON, W. J.; MULLINS, R. J.; BASTEN, A.; BARNETSON, R. S. Subclinical infection with *Mycobacterium leprae*-a problem for leprosy control strategies. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 87, p. 412-415, 1993.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 3.125, de 7 de outubro de 2010. Aprova as diretrizes para vigilância, atenção e controle da hanseníase. Brasília, DF, 2010.
- BUHRER-SÉKULA, S.; ILLARRAMENDI, X.; TELES, R. B.; PENNA, M. L.; NERY, J. A.; SALES, A. M.; OSKAM, L.; SAMPAIO, E. P.; SARNO, E. N. The additional benefit of the ML Flow test to classify leprosy patients. **Acta Tropica**, v. 111, p. 172-176, 2009.
- CABRAL, P. B.; ALVES, A. R.; MEDEIROS, K. B. A.; CASTELO-BRANCO, E. S.; ALENCAR, C. P.; NAGAO-DIAS, A. T. Emprego de marcadores séricos e salivares anti-PGL-1 como parâmetros de exposição ocupacional ao *Mycobacterium leprae*. **Rev. Panam. Infectol.**, v.11, n. 1, p. 21-26, 2009.
- CALADO, K. L. S.; VIEIRA, A. G.; DURÃES, S.; BÜHRER-SÉKULA, S.; ANTUNES, C. M. F. A. Positividade sorológica anti-PGL1 em contatos domiciliares e peridomiciliares de hanseníase em área urbana. **An. Bras. Dermatol.**, v. 80, n. 3, p. S301-306, 2005.

CALIL, D. A. [Entrevista publicada em 24 de novembro de 2008, na Internet]. Disponível em: < <http://www.tvcanal13.com.br/noticias/brasil-sera-ultimo-pais-do-mundo-a-eliminar-hanseníase-43038.asp>>. Acesso em: 24 abr. 2009.

CARDONA-CASTRO, N.; ALZATE, J. C.B.; MONTOYA, M. R. Clinical, bacteriological and immunological follow-up os household contacts of leprosy patients from a post-elimination área – Antioquia, Colombia. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 6, p. 935-936, 2009.

CEARÁ. Secretaria da Saúde. **Informe Epidemiológico Hanseníase**. Fortaleza, 2009.

CEARÁ. Secretaria da Saúde. **Informe Epidemiológico Hanseníase**. Fortaleza, 2010.

CEARÁ. Secretaria da Saúde. **Informe Epidemiológico Hanseníase**. Fortaleza, 2011.

CERUTTI, A.; CHEN, K.; CHORNY, A. Immunoglobulin Responses at the Mucosal Interface. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 29, p. 273-293, 2011.

CESTA, M. F. Normal Structure, Function and Histology of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue. **Toxicol. Pathol.**, v. 34, p. 599-608, 2006.

CHO, S. N.; CELLONA, R. V.; VILLAHERMOSA, L. G.; FAJARDO, T. T.; BALAGON, M. V.; ABALOS, R. M.; TAN, E. V.; WALSH, G. P.; KIM, J. D.; BRENNAN, P. J. Detection of Phenolic Glycolipid-1 of *Mycobacterium leprae* in Sera from Leprosy Patients before and after Start of Multidrug Therapy. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, p. 138-142, 2001.

COLE, S. T.; EIGLMEIER, K.; PARKHILL, J.; JAMES, K. D.; THOMSON, N. R.; WHEELER, P. R. et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. **Nature**, v. 409, p. 1007-1011, 2001.

CUNHA, F. M. B. **Reação em cadeia da polimerase**. 2003. 141 f. Tese (Doutorado em Medicina Interna) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2003.

DONOGHUE, H. D.; HOLTON, J.; SPIGELMAN, M. PCR primers that can detect low levels of *Mycobacterium leprae* DNA. **Med. Microbiol.**, v. 50, p. 177-182, 2001.

DOUGLAS, J. T.; CELLONA, R. V.; FAJARDO Jr., 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.**, p. 897-900, 2004.

FERRAZ, E. G.; SILVEIRA, B. B. de B.; SARMENTO, V. A.; SANTOS, J. N. Receptores Toll-like: ativação e regulação da resposta imune. **Rev. Gaúcha Odontol.**, Porto Alegre, v.59, n.3, 2011.

FINE, P. E. M.; STERN, J. A.; PONNIGHAUS, J. M.; BLISS, L.; SAUI, J.; CHIHANA, A.; MUNTHALI, M.; WARNDORFF, D. K. Household and dwelling contact as risk factors for leprosy in the Northern Malawi. **Am. J. Epidemiol.**, v. 146, p. 91-102, 1997.

- FOSS, N. T. Aspectos Imunológicos da Hanseníase. **Medicina**, Riberão Preto, v. 30, p. 335-339, 1997.
- 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. **Infect . Immun.**, v. 43, p. 245-252, 1984.
- GOULART, I. M. B.; CARDOSO, A. M.; SANTOS, M. S.; GONÇALVES, M. A.; PEREIRA, J. E.; GOULART, L. R. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin lesions of leprosy patients by PCR may be affected by amplicon size. **Arch. Dermatol. Res.**, v. 299, p. 267-271, 2007.
- GOULART, I. M. B.; PENA, G. O.; CUNHA, G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 35, n. 4, p. 365-375, 2002.
- GOULART, L. R.; GOULART, I. M. B. Leprosy pathogenetic background: a review and lessons from other mycobacterial diseases. **Arch. Dermatol. Res.**, v. 301, p. 123-137, 2009.
- GUPTE, M.D. Research needs related to epidemiology and control: subclinical infection. **Int. J. Lepr.**, v. 64, p. S29-S37, 1996.
- HARTSKEERL, R. A.; WIT, M. Y. L.; KLATSER, P. R. Polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 135, p. 2357-2364, 1989.
- HUNTER, S. W.; FUJIWARA, T.; BRENNAN, P. J. Structure and antigenicity of the major specific antigen of *Mycobacterium leprae*. **J. Biol. Chem.**, v. 257, p. 15072-15078, 1982.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <<http://www.ibge.com.br/home/>>. Acesso em: 10 dez. 2011.
- IZUMI, S.; FUJIWARA, T.; IKEDA, M.; NISHIMURA, Y.; SUGIYAMA, K.; KAWATSU, K. Novel Gelatin Particle Agglutination Test for Serodiagnosis of Leprosy in the Field. **J. Clin. Microbiol.**, v. 28, n. 3, p. 525-529, 1990.
- JADHAV, R. S.; MACDONALD, M.; BJUNE, G.; OSKAM, L. Simplified PCR detection method for nasal *Mycobacterium leprae*. **Int. J. Leprosy**, v. 69, n. 4, p. 299-307, 2001.
- JOB, C. K.; JAYAKUMAR, J.; KEARNEY, M.; GILLIS, T. P. Transmission of Leprosy: A study of skin and nasal secretions of household contacts of leprosy patients using PCR. **Am. J. Trop. Hyg.**, v. 78, n. 3, p. 518-521, 2008.
- KIRSZTAJN, G. M.; NISHIDA, S. K.; SILVA, M. S.; LOMBARDI, C.; AJZEN, H.; PEREIRA, A. B. Specific and nonspecific aspects of humoral immune response in leprosy. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 27, p. 43-54, 1994.
- KLATSER, P. R.; BEERS, S. V.; MADJID, B.; DAY, R.; DE WIT, M. Y. Detection of *Mycobacterium leprae* nasal carriers in populations for which leprosy is endemic. **J. Clin. Microbiol.**, v. 31, n. 11, p. 2947-2951, 1993.

LOMBARDI, C. **Hanseníase: epidemiologia e controle**. São Paulo: Imprensa Oficial do Estado - Editora Arquivo do Estado de São Paulo, 1990.

MACIEIRA, S. Aspectos microbiológicos do *Mycobacterium leprae*. In: OPROMOLLA, D. V. A. **Noções de hansenologia**. Bauru: Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato, 2000. p. 13-18. Disponível em: <http://hansen.bvs.ilsl.br/textoc/livros/OPROMOLLA_DILTOR_nocoos/PDF/aspecto_leprae.pdf>. Acesso em: 15 out. 2012.

MOURA, R. S.; CALADO, K. L.; OLIVEIRA, M. L.W.; BÜHRER-SÉKULA, S. Sorologia da hanseníase utilizando PGL-1: revisão sistemática. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 41, n. 2, p. 11-18, 2008.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; MURPHY, K. **Imunobiologia de Janeway**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

NAGAO-DIAS, A. T.; ALMEIDA, T. L. P.; OLIVEIRA, M. F.; SANTOS, R. C.; LIMA, A. L.; BRASIL, M. Salivary Anti-PGL IgM and IgA Titers and Serum Antibody IgG Titers and Avidities in Leprosy Patients and Their Correlation with Time of Infection and Antigen Exposure. **Braz. J. Infect. Dis.**, v.11, n. 2, p. 215-219, 2007.

OCHOA, M. Z. El sistema inmunológico de las mucosas. **Rev. Cubana Med. Gen. Integr.**, v. 5, 2002.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Disponível em: <<http://www.who.int/lep/en/>>. Acesso em: 15 ago. 2009.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Leprosy update. **Wkly. Epidemiol. Rec.**, ano 86, n. 36, p. 389-400, 2011.

OSKAM, L.; SLIM, E.; BÜHRER-SÉKULA, S. Serology: recent developments, strengths, limitations and prospects: a state of the art overview. **Lepr. Rev.**, v.74, n.3, p.196-205, 2003.

PATROCÍNIO, L. G.; GOULART, I. M. B.; GOULART, L. R.; PATROCÍNIO, J. A.; FERREIRA, F. R.; FLEURY, R. N. Detection of *Mycobacterium leprae* in nasal mucosa biopsies by the polymerase chain reaction. **Immunol. Med. Microbiol.**, v. 44, p. 311-316, 2005.

PAVANI, R. A. B.; TONOLLI, E. R.; D'AVILA, S. C. G. P. Classificação histopatológica e correlação clínica de 50 casos de hanseníase diagnosticados em um hospital-escola, São José do Rio Preto, SP. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 41, n. 2, p. 188-195, 2008.

PINTO NETO, J. M.; VILLA, T. C. S.; OLIVEIRA, M. H. P.; BARBEIRA, C. B. S. O controle dos comunicantes de hanseníase no Brasil: uma revisão da literatura. **Hansen. Int.**, v. 25, n. 2, p. 163-176, 2000.

RODRIGUES, L. C.; LOCKWOOD, D. N. J. Leprosy now: epidemiology, progress, challenges, and research gaps. **Lancet Infect. Dis.**, v. 11, p. 464-470, 2011.

SANTOS, A. R.; MIRANDA, A. B.; SARNO, E. N.; SUFFYS, P. N.; DEGRAVE, W. M. Use of PCR-mediated amplification of *Mycobacterium leprae* DNA in different types of clinical samples for the diagnosis of leprosy. **J. Med. Microbiol.**, v. 39, p. 298-304, 1993.

SANTOS, A. S.; CASTRO, D. S.; FALQUETO, A. Fatores de risco para transmissão da Hanseníase. **Rev. Bras. Enferm.**, Brasília, v. 61, esp., p. 738-743, 2008.

SCHURING, R. P.; MOET, F. J.; PAHAN, D.; RICHARDUS, J. H.; OSKAM, L. Association between anti-PGL1 IgM and clinical and demographic parameters in leprosy. **Lepr. Rev.**, v. 77, p. 343-355, 2006.

SCOLLARD, D. M.; ADAMS, L. B.; GILLIS, T. P.; KRAHENBUHL, J. L.; TRUMAN, R. W.; WILLIAMS, D. L. The continuing challenges of leprosy. **Clin. Microbiol. Rev.**, p. 338-381, 2006.

SILVA, E. A.; LYER, A.; URA, S.; NAAFS, B.; DAS, P. K.; VILANI-MORENO, F. Utility of measuring serum levels of anti-PGL1 antibody, neopterin and C-reactive protein in monitoring leprosy patients during multi-drug treatment reactions. **Trop. Med. Intern. Health**, v. 12, p. 1450-1458, 2007.

SMITH, W. C. S.; SMITH, C. M.; CREE, I. A.; JADHAV, R. S.; MACDONALD, M.; EDWARD, V. K.; OSKAM, L.; VAN BEERS, S.; KLATSER, P. An approach to understanding the transmission of *Mycobacterium leprae* using molecular and immunological methods: results from the MILEP2 study. **Int. Lepr. Mycobact. Dis.**, v. 72, p. 269-277, 2004.

SOUZA, C. S. Hanseníase: formas clínicas e diagnóstico diferencial. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 30, p. 325-334, 1997.

SUZUKI, K.; AKAMA, T.; KAWASHIMA, A.; YOSHIHARA, A.; YOTSU, R. R.; ISHII, N. Current status of leprosy: Epidemiology, basic science and clinical perspectives. **J. Dermatol.**, v. 38, p. 1-9, 2011.

SUZUKI, K.; TAKESHITA, F.; NAKATA, N.; ISHII, N.; MAKINO, M. Localization of CORO1A in the macrophages containing *Mycobacterium leprae*. **Acta Histochem. Cytochem.**, v. 39, n. 4, p. 107-112, 2006.

TORRES, P.; CAMARENA, J. J.; GOMEZ, J. R.; NOGUEIRA, J. M.; GIMENO, V.; NAVARRO, J. C.; OLMOS, A. Comparison of PCR mediated amplification of DNA and the classical methods for detection of *Mycobacterium leprae* in different types of clinical samples in leprosy patients and contacts. **Lepr. Rev.**, v. 74, p. 18-30, 2003.

ULRICH, M.; SMITH, P. G.; ZUNIGA, M.; ZUNIGA, M.; CENTENO, M.; GARCIA, V.; MANRIQUE, X.; SALGADO, A.; CONVIT, J. IgM antibodies to native phenolic glycolipid-I in contacts of leprosy patients in Venezuela: epidemiological observations and a prospective study of the risk of leprosy. **Int. J. Lepr.**, v. 59, n. 3, p. 405-415, 1991.

VACHULA, M.; HOLZER, T. J.; ANDERSEN, B. R. Suppression of monocyte oxidative response by phenolic glycolipidic I of *Mycobacterium leprae*. **J. Immunol.**, v. 142, n. 10, p. 1696-1701, 1989.

VIRMOND, M. C. L. [Entrevista publicada em 24 de novembro de 2008, na Internet]. Disponível em: <<http://www.tvcanal13.com.br/noticias/brasil-sera-ultimo-pais-do-mundo-a-eliminar-hanseniose-43038.asp>>. Acesso em: 24 abr. 2009.

WERSHIL, B. K.; GLENN, T. F. Gastrointestinal mucosal immunity. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 121, n. 2, p. S380-S383, 2008.

WICHITWECHKARN, J.; KARNJAN, S.; SHUNTAWUTTISEETEE, S.; SORNPRASIT, C.; KAMPIRAPAP, K.; PEERAPAKORN, S. Detection of *Mycobacterium leprae* infection by PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, n. 1, p. 45-49, 1995.

WIT, M. Y. L.; DOUGLAS, J. T.; McFADDEN, J.; KLATSER, P. R. Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium leprae* in nasal swab specimens. **J. Clin. Microbiol.**, v. 31, n. 3, p. 502-506, 1993.

WIT, M. Y. L.; FABER, W. R.; KRIEG, S. R.; DOUGLAS, J. T.; LUCAS, S. B.; MONTREEWASUWAT, N.; PATTYN, S. R.; HUSSAIN, R.; PONNIGHAUS, J. M.; HARTSKEERL, R. A. et al. Application of a polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae* in skin tissues. **J. Clin. Microbiol.**, v. 29, n. 5, p. 906-910, 1991.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Questionário dos participantes

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE IMUNOCROMATOGRAFIA DE ANTICORPOS SÉRICOS E SALIVARES REATIVOS CONTRA ANTÍGENO GLICOFENÓLICO DE *Mycobacterium leprae* E COMPARAÇÃO COM MÉTODOS IMUNOENZIMÁTICOS CONVENCIONAIS E DE BIOLOGIA MOLECULAR PARA IDENTIFICAÇÃO DE GRUPOS DE RISCO DE HANSENÍASE EM REGIÕES ENDÊMICAS DO CEARÁ

QUESTIONÁRIO DOS PARTICIPANTES

Local da Pesquisa: _____

Data da coleta/ entrevista: _____

Entrevistador: _____

PACIENTE FONTE:

Local do acompanhamento terapêutico: _____ Nº registro do posto: _____

Nome: _____ Idade: _____ Sexo: _____

Endereço: _____

Bairro: _____ Cidade: _____

Tel de contato: _____

Forma clínica atual da doença: _____ IB: _____

Quando foi diagnosticada? _____

Está em tratamento? _____ Quando iniciou? _____

Tempo de duração do tratamento: _____

Já teve Hanseníase antes?

Sim _____ (Forma clínica: _____ Duração do tratamento: _____)

Não _____

CONTACTANTES:

Nome	Idade	Sexo	Parentesco	Reside junto?	Frequencia do contato

Foi vacinado com a BCG?	Tem a cicatriz vacinal?	Quando recebeu a vacina?	Fez reforço da BCG?	O posto fez ou pediu algum teste e/ou exame clínico? (BK, EC, BCG)*

*BK- baciloscopia

EC- exame clínico

APÊNDICE B - Termo de consentimento pós-informação



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO WALTER CANTÍDIO

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

O (A) Sr.(a) está sendo convidado(a) a participar da pesquisa “DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE IMUNOCROMATOGRAFIA DE ANTICORPOS SÉRICOS E SALIVARES REATIVOS CONTRA ANTÍGENO GLICOFENÓLICO DE *MYCOBACTERIUM LEPRAE* E COMPARAÇÃO COM MÉTODOS IMUNOENZIMÁTICOS CONVENCIONAIS E DE BIOLOGIA MOLECULAR PARA IDENTIFICAÇÃO DE GRUPOS DE RISCO DE HANSENÍASE EM REGIÕES ENDÊMICAS DO CEARÁ”, que tem como principal objetivo estudar se há possibilidade dos testes laboratoriais de identificarmos pessoas que teriam maior risco de adquirir a doença. Dessa forma, necessitamos coletar saliva (3mL), sangue (5mL), e uma amostra da secreção das narinas (mucosa nasal). Na saliva, pesquisaremos anticorpos salivares contra a bactéria causadora da hanseníase. No sangue, pesquisaremos anticorpos séricos contra a bactéria causadora da hanseníase. A amostra da mucosa da narina será coletada com um cotonete esterilizado (swab). Essa amostra será colocada em um tubo contendo solução para separar e identificar o DNA da bactéria.

Nós, pesquisadores, garantimos que:

1. Os resultados serão divulgados em publicações científicas e o grupo de pesquisa não divulgará a identidade dos pacientes.
2. O paciente poderá contactar a Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa da UFC para apresentar recursos ou reclamações relativas ao estudo (Fábia, tel: 33668338) ou para a Coordenadora do Projeto (Profa. Aparecida Nagao-Dias, tel: 33668262).

Fortaleza, ___ de _____ de _____.

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, concordo em participar da presente pesquisa, de responsabilidade da Profa. Aparecida Tiemi Nagao-Dias, coordenadora do projeto.

Assinatura do contato: _____

Assinatura de quem aplicou o termo: _____

ANEXO A - Certificado de Edição do Inglês – AMERICAN JOURNAL EXPERTS


AMERICAN JOURNAL EXPERTS

EDITORIAL CERTIFICATE

This document certifies that the manuscript listed below was edited for proper English language, grammar, punctuation, spelling, and overall style by one or more of the highly qualified native English speaking editors at American Journal Experts.

Manuscript title:
Anti-PGL1 salivary IgA/IgM, serum IgG/IgM and nasal M. leprae DNA among PB and MB leprosy household contacts.

Authors:
Paula Brito e Cabral¹, José Evandro Cunha Jr¹, Thially Braga Gonçalves¹, Tereza Cristina Brito e Cabral², Ana Paula Soares Gondim³, Lilia Carneiro Camara⁴, Silvia Helena Baram Rabenhorst⁴, Aparecida Tiemi Nagao-Olas¹. 1Dept. Clinical Analysis and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal do Ceará- UFC, Brazil. 2Municipal Health Secretariat, Crato, Ceará, Brazil. 3Post- Graduation Program in Collective Health, Universidade de Fortaleza, Ceará, Brazil. 4Dept. Pathology, Faculty of Medicine, UFC, Brazil.

Date Issued:
May 14, 2012

Certificate Verification Key:
20DF-A937-6C74-727F-FB34

This certificate may be verified at www.jurnalexperts.com/certificate. This document certifies that the manuscript listed above was edited for proper English language, grammar, punctuation, spelling, and overall style by one or more of the highly qualified native English speaking editors at American Journal Experts. Neither the research content nor the authors' intentions were altered in any way during the editing process. Documents receiving this certification should be English-ready for publication; however, the author has the ability to accept or reject our suggestions and changes. To verify the final AJE edited version, please visit our verification page. If you have any questions or concerns about this edited document, please contact American Journal Experts at support@jurnalexperts.com.



American Journal Experts provides a range of editing, translation and manuscript services for researchers and publishers around the world. Our top-quality PhD editors are all native English speakers from America's top universities. Our editors come from nearly every research field and possess the highest qualifications to edit research manuscripts written by non-native English speakers. For more information about our company, services and partner discounts, please visit www.jurnalexperts.com.