



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

JOSÉ EVANDRO CUNHA JÚNIOR

**DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE ANTICORPOS SÉRICOS E SALIVARES ANTI-
PGL-1 DE CONTATOS, COM IDADE INFERIOR A 15 ANOS, DE PACIENTES
DIAGNOSTICADOS COM HANSENÍASE NO MUNICÍPIO DE RIO LARGO,
ALAGOAS**

FORTALEZA

2018

JOSÉ EVANDRO CUNHA JÚNIOR

DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE ANTICORPOS SÉRICOS E SALIVARES ANTI-PGL-1 DE CONTATOS, COM IDADE INFERIOR A 15 ANOS, DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM HANSENÍASE NO MUNICÍPIO DE RIO LARGO, ALAGOAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Biologia Para Saúde.

Orientadora: Profª. Dra. Aparecida Tiemi Nagao-Dias.

Co-orientadora: Profª. Dra. Juliana Navarro Ueda Yaochite

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C978d Cunha Júnior, José Evandro.
DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE ANTICORPOS SÉRICOS E SALIVARES ANTI-PGL-1 DE
CONTATOS, COM IDADE INFERIOR A 15 ANOS, DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM
HANSENÍASE NO MUNICÍPIO DE RIO LARGO, ALAGOAS / José Evandro Cunha Júnior. – 2018.
77 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e
Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2018.

Orientação: Profa. Dra. Aparecida Tiemi Nagao-Dias.

Coorientação: Profa. Dra. Juliana Navarro Ueda Yachite.

1. Hanseníase. 2. Imunoglobulina A. 3. Imunoglobulina M. 4. Imunoglobulina G. 5. Saliva. I. Título.

CDD 615

JOSE EVANDRO CUNHA JÚNIOR

DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE ANTICORPOS SÉRICOS E SALIVARES ANTI-PGL-1 DE CONTATOS, COM IDADE INFERIOR A 15 ANOS, DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM HANSENÍASE NO MUNICÍPIO DE RIO LARGO, ALAGOAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Biologia Para Saúde.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Aparecida Tiemi Nagao-Dias (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profª. Dra. Paula Sacha Frota Nogueira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Carlos Henrique Morais de Alencar
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos meus pais, Evandro e Vera.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por permitir que eu faça aquilo que sou capaz de fazer.

Aos meus pais, Evandro Cunha e Vera Lúcia, que me ensinaram o verdadeiro valor da busca pelo conhecimento, permitindo que eu seja um bom profissional.

À minha esposa Tainá, por todo o apoio e compreensão nas horas em que mais precisei.

À minha enteada Athina pela paciência e compreensão nos momentos de ausência.

Aos meus irmãos Marcos e Marcelo, por todo o apoio que me foi dado em toda a trajetória até essa realização.

À minha orientadora Profa. Dra. Aparecida Tiemi Nagao-Dias, grande exemplo de docente e pesquisadora, pela confiança em mim depositada e por acreditar na minha capacidade.

À minha co-orientadora Juliana Ueda que imensamente contribuiu para que fosse possível a conclusão deste trabalho. Agradeço também pela paciência e compreensão.

Aos meus colegas do Laboratório de Imunologia (LABIM), Raphael, Milena, Luri, Andressa, Camila e Anielle.

Ao colega Alexandre Casimiro, pela imensa dedicação sem a qual não seria possível a realização deste trabalho.

À Universidade Federal do Ceará, que tornou possível a realização do mestrado.

À Universidade Federal de Alagoas, pelo suporte oferecido nas visitas ao estado.

À professora Clódis Maria Tavares, pelo apoio dado durante as visitas aos municípios e pela contribuição durante as avaliações dermatoneurológicas dos participantes do estudo.

À prefeitura de Rio Largo, pelo suporte dado durante as visitas ao município.

Aos doutores participantes da banca examinadora, Profa. Paula Sacha Nogueira Frota, Prof. Carlos Henrique Morais de Alencar e Profa. Zirlane Castelo Branco Coêlho pela disponibilidade e confiança.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pelo acompanhamento e apoio nessa jornada.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu,
mas pensar o que ninguém ainda pensou
sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer.

RESUMO

A hanseníase é considerada um grave problema de saúde pública devido ao seu difícil controle epidemiológico e ao risco de ocasionar incapacidades físicas importantes. A investigação de marcadores sorológicos, tal como o anti-PGL-1, anticorpo direcionado a um glicolípido presente na parede celular da bactéria causadora da hanseníase, tem se mostrado de suma importância na investigação da exposição ao bacilo e na estimativa do tempo de exposição ao mesmo. O presente estudo teve como objetivo determinar os níveis de anticorpos anti-PGL-1, séricos e salivares, de contatos intra e peridomiciliares, com idade inferior a 15 anos, de pacientes diagnosticados com hanseníase no município de Rio Largo (AL) nos anos de 2015 e 2016, e correlacioná-los com dados clínicos obtidos em exames dermatoneurológico, com a finalidade de se estimar a real situação do município em relação à hanseníase. A determinação dos anticorpos séricos e salivares anti-PGL-1 foi realizada por método enzimático em fase sólida (ELISA). Participaram do estudo 68 contatos, com idade média $9,9 \pm 2,9$ anos, sendo 38 do sexo masculino e 30 do sexo feminino. Trinta e oito são contatos de pacientes multibacilares e 19 de pacientes paucibacilares, 22 são contatos intradomiciliares e 44 peridomiciliares. Do total, 17 apresentaram manchas suspeitas. No ano de 2015, 66 contatos foram avaliados. Em ambos os anos do estudo, os níveis de IgM anti-PGL-1 se apresentaram mais elevados em relação aos níveis de IgA, que por sua vez, maiores que os de IgG. No ano de 2015, não foi observada correlação entre nenhum isotipos analisados. Os níveis de IgG se mostraram mais altos em contatos de pacientes multibacilares. Os níveis de IgM sérica anti-PGL-1 se mostraram mais elevados em contatos intradomiciliares. No ano, foram avaliados 44 contatos. Em relação aos anticorpos séricos, IgG e IgA anti-PGL-1 apresentaram uma correlação positiva baixa. Os níveis séricos de IgG se mostraram mais elevados em contatos paucibacilares. Não houve diferença estatística significativa entre os contatos intradomiciliares e peridomiciliares. Quanto aos anticorpos salivares anti-PGL-1, os níveis de IgM se apresentaram mais elevados em relação aos níveis de IgA, apresentando também, uma correlação positiva alta entre eles. No entanto, não apresentaram diferença estatística quando avaliados quanto à forma clínica do caso índice, o tipo de residência e a presença de manchas suspeitas. Sem significância estatística também quando avaliados com os anticorpos séricos correspondentes. Quando comparados entre os anos de 2015 e 2016, os títulos séricos de IgM apresentaram correlação positiva alta e a IgA se mostrou mais elevada no ano de 2015. Foi observado que seis contatos apresentaram soropositividade para IgM e IgA, sérica e/ou salivar, simultaneamente. Desta forma, torna-se

necessário que esses contatos sejam acompanhados pelo fato de apresentarem um risco maior de evoluir para doença, quando comparados aos contatos que não apresentaram esse tipo de alteração. Apesar das limitações, os resultados encontrados sugerem que anticorpos anti-PGL-1 séricos, IgM, IgG e IgA, e salivares, IgM e IgA, possam ser utilizados na investigação de contatos para avaliação do risco de evolução para doença.

Palavras-chave: Hanseníase. Imunoglobulina A. Imunoglobulina M. Imunoglobulina G. Saliva.

ABSTRACT

Leprosy is considered a serious public health problem due to its difficult epidemiological control and the risk of causing major physical disabilities. Investigation of serological markers, such as the anti-PGL-1 antibody, targeting a glycolipid present on the cell wall of the leprosy-causing bacteria, has been of paramount importance in investigating exposure to bacillus and estimating exposure time to same. The aim of the present study was to determine the levels of anti-PGL-1 antibodies, serum and salivary, from intra and peridomiciliary contacts, aged less than 15 years, from patients diagnosed with leprosy in the city of Rio Largo (AL) in the 2015 and 2016, and correlates them with clinical data obtained in dermatoneurological examinations, to estimate the real situation of the municipality in relation to leprosy. The determination of anti-PGL-1 serum and salivary antibodies was performed by solid phase enzymatic method (ELISA). The study included 68 contacts, with a mean age of 9.9 ± 2.9 years, 38 males and 30 females. Thirty-eight are contacts of multibacillary patients and 19 of paucibacillary patients, 22 are intra-domiciliary contacts and 44 are peridomiciliary contacts. Of the total, 17 had suspicious spots. In the year 2015, 66 contacts were evaluated. In both years of the study, anti-PGL-1 IgM levels were higher than IgA levels, which in turn were higher than IgG levels. In the year 2015, no correlation was observed between any analyzed isotypes. IgG levels were higher in contacts of multibacillary patients. Serum anti-PGL-1 IgM levels were higher in intradomiciliary contacts. In 2016, 44 contacts were evaluated. In relation to serum antibodies, anti-PGL-1 IgG and IgA showed a low positive correlation. Serum IgG levels were higher in paucibacillary contacts. There was no statistically significant difference between the intradomiciliary and peridomiciliary contacts. As for anti-PGL-1 salivary antibodies, IgM levels were higher in relation to IgA levels, and had a high positive correlation between them. However, they did not present statistical difference when evaluated as to the clinical form of the index case, the type of residence and the presence of suspicious spots. No statistical significance was also assessed when evaluating the corresponding serum antibodies. When compared between the years 2015 and 2016, serum IgM titers showed a high positive correlation and IgA was higher in the year 2015. It was observed that six contacts showed seropositivity for IgM and IgA, serum and / or salivary, simultaneously. Therefore, it is necessary for these contacts to be accompanied by the fact that they present a higher risk of progression to disease, when compared to contacts that did not present this type of change. Despite the limitations, the results suggest that serum anti-PGL-1, IgM, IgG and IgA, and salivary, IgM and IgA

antibodies can be used in the investigation of contacts to assess the risk of progression to disease.

Keywords: Leprosy. Immunoglobulin A. Immunoglobulin M. Immunoglobulin G, Saliva.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição geográfica dos novos casos de hanseníase detectados em 2016.....	16
Figura 2 – Taxa de detecção de casos novos de hanseníase no Brasil 2001-2016.....	17
Figura 3 – Percentual de contatos examinados entre os casos registrado 2001-2017.....	18
Figura 4 – Taxa de detecção de casos novos de hanseníase município de Rio Largo Alagoas 2001-2016.....	19
Figura 5 – <i>Mycobacterium leprae</i>	20
Figura 6 – Estrutura molecular do glicolípido fenólico-1 (PGL-1)	21
Figura 7 – Representação dos mecanismos imunológicos na hanseníase.....	23
Figura 8 – Exame histopatológico no diagnóstico de hanseníase.....	25

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	– Níveis de anticorpos séricos anti-PGL-1 de contatos, com idade inferior a 15 anos, de pacientes com hanseníase, em amostras coletadas no ano de 2015.	37
Gráfico 2	– Correlação entre os isotipos de anticorpos séricos anti-PGL-1 em amostras coletadas no ano de 2015.....	38
Gráfico 3	– Níveis de anticorpos séricos anti-PGL-1 de contatos em relação à forma clínica do caso índice, em amostras coletadas no ano de 2015.....	39
Gráfico 4	– Níveis de anticorpos séricos anti-PGL-1 de acordo com o domicílio do contato em relação ao caso índice.....	40
Gráfico 5	– Níveis de anticorpos séricos anti-PGL-1 em contatos com e sem suspeita de doença.....	41
Gráfico 6	– Níveis de anticorpos séricos anti-PGL-1 de contatos, com idade inferior a 15 anos, de pacientes com hanseníase, em amostras coletadas no ano de 2016.....	43
Gráfico 7	– Correlação entre os níveis de anticorpos séricos anti-PGL-1 de contatos, com idade inferior a 15 anos, de pacientes com hanseníase.....	44
Gráfico 8	– Títulos de anticorpos séricos anti-PGL-1 de contatos em relação à forma clínica no caso índice.....	45
Gráfico 9	– Títulos de anticorpos séricos anti-PGL-1 de contatos de acordo com o domicílio em relação ao caso índice.....	46
Gráfico 10	– Níveis de anticorpos séricos anti-PGL-1 em contatos com e sem suspeita de doença em amostras coletadas no ano de 2016.....	47
Gráfico 11	– Níveis de anticorpos salivares anti-PGL-1 em amostras de contatos coletadas em 2016.....	48
Gráfico 12	– Correlação entre os níveis de anticorpos salivares anti-PGL-1 em amostras de contatos coletadas em 2016.....	49

Gráfico 13 – Títulos de anticorpos salivares anti-PGL-1 de contatos em relação à forma clínica no caso índice.....	50
Gráfico 14 – Títulos de anticorpos salivares anti-PGL-1 de contatos de acordo com o domicílio em relação ao caso índice.....	51
Gráfico 15 – Níveis de anticorpos salivares anti-PGL-1 em contatos com e sem suspeita de doença.....	51
Gráfico 16 – Correlação entre os níveis séricos e salivares dos anticorpos anti-PGL-1 Em amostras coletadas no ano de 2016.....	52
Gráfico 17 – Avaliação do isotipo IgM sérico anti-PGL-1 de amostras de contatos coletadas nos anos de 2015 e 2016.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Taxas de prevalência e detecção de novos casos, de acordo com a OMS.....	16
Tabela 2 – Regra geral para interpretação do valor do coeficiente de correlação.....	35
Tabela 3 – Caracterização dos contatos de acordo com a idade, sexo, classificação quanto à forma clínica do caso índice e ao tipo de domicílio em relação ao caso índice.....	36
Tabela 4 – Contatos passíveis de acompanhamento.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

B	<i>Boderline</i>
BB	<i>Borderline</i> -Borderline
BSA	Albumina sérica bovina
BL	<i>Borderline</i> -lepromatosa
BT	<i>Borderline</i> -Tuberculóide
DC	Células dendríticas
I	Indeterminada
ID	Intradomiciliares
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
INF- γ	interferon-gama
LL	Lepromatosa-lepromatosa
PB	Paucibacilares
PD	peridomiciliares
PGL-1	Glicolípido fenólico 1
MB	Multibacilares
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão Salino Fosfato
PQT	Poliquimioterapia
SFB	Soro Fetal Bovino
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
T	Tuberculóide
TCR	Receptores de célula T
TGF- β	Fator de crescimento tumoral- β
TLR	Receptores do tipo Toll
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TT	Tuberculóide-tuberculóide
V	Virchowiana

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
®	Marca Registrada
µm	Micrometro
µL	Mitrolitro
mg/L	Miligrama por litro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 História da doença	15
2.2 Epidemiologia	15
2.2.1 Mundo	15
2.2.2 Brasil	17
2.2.3 Alagoas e Rio Largo	19
2.3 Etiopatologia	19
2.3.1 Agente etiológico	19
2.3.2 Transmissão	22
2.3.4 Imunopatologia	22
2.4 Diagnóstico clínico e laboratorial	24
2.5 Marcadores sorológicos	25
2.6 Classificação	26
2.6.1 Classificação de Madri (1953)	26
2.6.2 Classificação de Ridley & Jopling (1966)	26
2.6.3 Classificação da OMS (1982)	27
2.7 Tratamento	27
4 OBJETIVOS	30
4.1 Objetivo geral	30
4.2 Objetivos específicos	30
5 MATERIAIS E MÉTODOS	31
5.1 Delineamento, população, local e período do estudo	31
5.2 Aspectos éticos	31
5.3 Critérios de inclusão	31
5.4 Critérios de exclusão	31
5.5 Avaliação dermatoneurológica e coleta do material biológico	32
5.5.1 Obtenção de amostras de soro	32
5.5.2 Obtenção das amostras de saliva	32
5.6 Detecção de anticorpos anti-PGL-1	32
5.6.1 Determinação dos níveis de anticorpos anti-PGL-1 no soro	33
5.6.2 Determinação dos níveis de anticorpos anti-PGL-1 na saliva	34

5.7 Análises estatísticas.....	34
6 RESULTADOS.....	36
6.1 Caracterização dos contatos	36
6.2 Determinação dos anticorpos anti-PGL-1	37
6.2.1 Análises das amostras coletadas no ano de 2015	37
6.2.1.1 Determinação dos anticorpos séricos anti-PGL-1	37
6.2.1.2 Determinação dos anticorpos salivares anti-PGL-1	41
6.2.2 Análises das amostras coletadas no ano de 2016	42
6.2.2.1 Determinação dos anticorpos séricos anti-PGL-1	42
6.2.2.2 Determinação dos anticorpos salivares anti-PGL-1	48
6.2.3 Comportamento dos níveis de anticorpos séricos anti-PGL-1 em amostras coletadas nos anos 2015 e 2016.....	52
7 DISCUSSÃO	55
8 CONCLUSÕES.....	58
9 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	59
10 REFÊRENCIAS	60
ANEXO I – PARECER DO CEP	65
APÊNDICE I – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	68
APÊNDICE II – TERMO DE ASSENTIMENTO.....	70
APÊNDICE III– QUESTIONÁRIO DESTINADO AOS CASOS DE HANSÍASE	72
APÊNDICE IV – QUESTIONÁRIO DESTINADO AOS CONTATOS DE HANSÍASE	73
APÊNDICE V – ARTIGO PUBLICADO NA BRAZILIAN JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES, EM MAIO 2017	74

1 INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma enfermidade causada pelo *Mycobacterium leprae*, bactéria que foi identificada em 1873 pelo pesquisador Gerhard Henrik Armauer Hansen (1841-1912), em Bergen na Noruega e, em sua homenagem, a bactéria ficou conhecida como bacilo de Hansen. Foi considerado o primeiro micro-organismo a ser associado com uma doença em humanos.

É caracterizada pelos aparecimentos de manchas na pele acompanhadas de algum tipo de alteração de sensibilidade. Pode comprometer nervos periféricos importantes, tendo como consequência mais grave a incapacidade física do doente. É por este motivo que a hanseníase é um grave problema de saúde pública em muitos países, com profundo impacto social e econômico.

É uma doença que tem cura total após o tratamento. O grande problema é o seu diagnóstico tardio. Muitas vezes a hanseníase é detectada nas formas mais avançadas, quando há alguma incapacidade física. Vários fatores estão associados ao diagnóstico tardio da doença, desde a falta de capacitação dos profissionais de saúde em reconhecer seus sinais e sintomas, até falta de planejamento estratégico no controle epidemiológico.

A detecção precoce e o tratamento dos novos casos são os pilares da estratégia traçada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para erradicar a hanseníase como problema de saúde pública. Na década de 80 a OMS lançou a estratégia terapêutica medicamentosa que se baseia no uso de uma combinação de antimicrobianos (poliquimioterapia) para combater o agente causador.

Pelo fato da escassez de testes laboratoriais diagnósticos de maneira rápida e falta de opções profiláticas, a busca por novos biomarcadores tem sido o objetivo de inúmeros estudos nas últimas décadas. Com o avanço da pesquisa no âmbito laboratorial, será possível realizar precocemente a detecção de casos novos e tratá-los a fim de interromper a cadeia de transmissão, podendo, desta forma, eliminar a hanseníase como problema de saúde pública no mundo inteiro.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 História da doença

A hanseníase é conhecida e descrita desde os tempos bíblicos. Há relatos, mesmo que pouco precisos, da presença da doença há 4000 anos. Estudiosos acreditam que a doença tenha origem asiática ou africana. Sua entrada no continente europeu pode ter ocorrido com as tropas de Alexandre, o Grande, por volta de 300 a.C. Na América Latina, foi introduzida pelos franceses que colonizaram a América do Norte. De forma semelhante, a hanseníase chegou à América do Sul devido à colonização por parte dos espanhóis e portugueses (EIDT, 2004; LASTÓRIA e ABREU, 2014b).

Os primeiros relatos da hanseníase no Brasil datam de 1600, no estado do Rio de Janeiro. Acredita-se que os escravos tiveram uma participação importante na disseminação da doença. Tempos após os primeiros relatos, foram identificados casos da doença em outros estados brasileiros, principalmente na Bahia e no Pará, seguidos de São Paulo e Amazonas. No Rio Grande do Sul, os primeiros dados são do início do século XIX (EIDT, 2004).

2.2 Epidemiologia

2.2.1 Mundo

Esforços conjuntos, guiados pela Organização Mundial da Saúde (OMS), conseguiram reduzir a prevalência da hanseníase de mais de 5 milhões de casos em meados da década de 80 para menos que 200.000 casos ao final de 2016. Com a introdução da poliquimioterapia (PQT), mais de 14 milhões de pessoas foram curadas nos últimos 20 anos. Em abril do mesmo ano, a OMS lançou uma estratégia global de 5 anos (2016-2020) para controle da hanseníase, cuja base está em uma participação mais ativa dos governos, eliminar suas complicações, pôr um fim à discriminação e estimular a inclusão social. Apesar de todos os esforços, novos casos continuam a ser detectados (OMS, 2017).

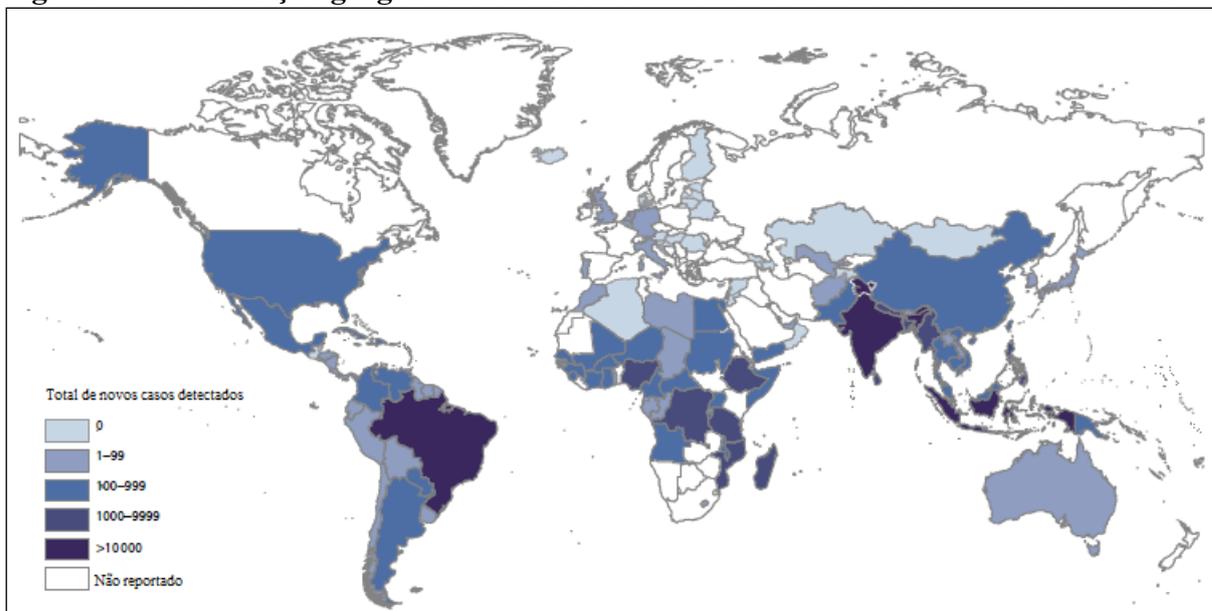
Em 2016, foram relatados casos de hanseníase em 148 países, sendo distribuídos em regiões definidas pela Organização Mundial da Saúde (Tabela 1).

Tabela 1 - Taxas de prevalência e detecção de novos casos, de acordo com a OMS.

Região OMS	Número de casos registrados	Número de novos casos
	(prevalência /10.000 habitantes). Primeiro trimestre de 2017	detectados (novos casos/100.000 habitantes), 2016
África	21.465 (0,3)	19.384 (2,0)
Américas	26.365 (0,31)	27.356 (2,7)
Mediterrâneo Oriental	3.102 (0,01)	2.834 (0,4)
Sudeste da Ásia	115.180 (0,6)	161.263 (8,2)
Pacífico ocidental	5820 (0,03)	3.914 (0,2)
Europa	16	32
Total	171.948 (0,23)	214.783 (2,9)

Fonte: Organização Mundial da Saúde, 2017

A Índia é o país da região do Sudeste Asiático mais acometido, com taxas prevalência e de detecção de novos casos 0,6/10.000 e 10,1/100.000 habitantes, respectivamente. Países como Indonésia e Bangladesh também se encontram em situação preocupante com relação à hanseníase.

Figura 1 – Distribuição geográfica dos novos casos de hanseníase detectados em 2016.

Fonte: Oms (2017)

Pode-se observar a presença da doença principalmente em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, como é o caso de países das regiões do Sudeste Asiático, região

Africana e das Américas, principalmente a do Sul. Dentre as federações que relataram novos casos de hanseníase, apenas Índia, Brasil e Indonésia apresentaram um número acima de 10.000 casos (Figura 1).

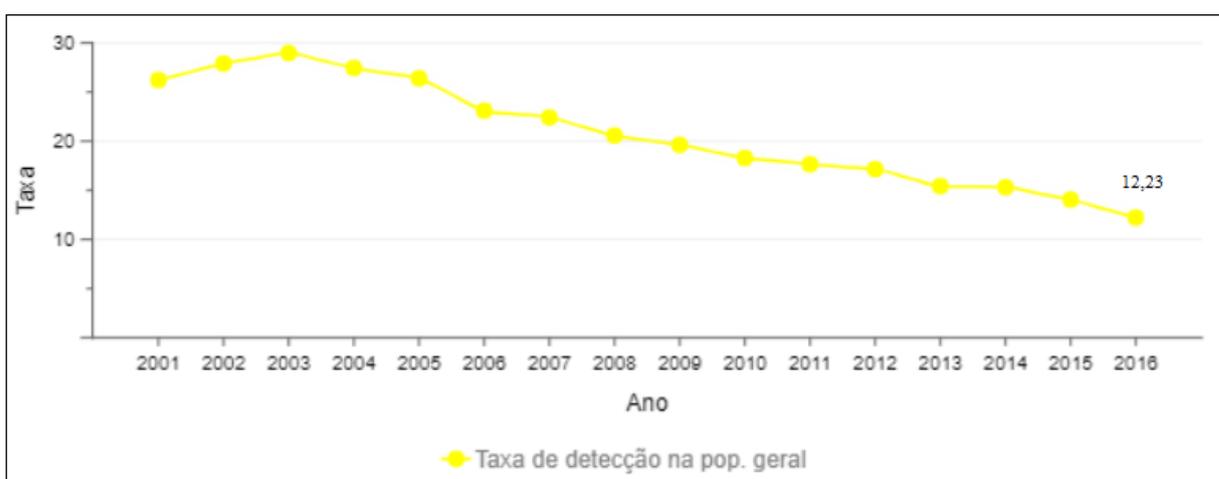
Na região das Américas, o Brasil é o país de situação mais alarmante. A nível global, está em segundo lugar em número de casos novos e prevalência da doença, ficando atrás apenas da Índia (OMS, 2017).

2.2.2 Brasil

Em 2016, o Ministério da Saúde publicou um manual técnico-operacional, “Diretrizes para vigilância, atenção e eliminação da hanseníase como problema de saúde pública”, no qual há orientações e recomendações para a detecção, diagnóstico, notificação e tratamento de casos de hanseníase (BRASIL, 2016).

No ano de 2016, o Brasil registrou uma taxa de prevalência de 1,10/10.000 habitantes e taxa de detecção de novos casos de 12,23/100.000 (BRASIL, 2017b). Apesar de observarmos uma queda na detecção de novos casos (Figura 2), a hanseníase ainda é considerada um grave problema de saúde pública.

Figura 2 – Taxa de detecção de casos novos de hanseníase no Brasil 2001-2016.



Fonte: Brasil (2017a)

Pode-se constatar que o número de casos novos detectados em jovens com idade abaixo de 15 anos, 3,63/100.000 habitantes, é alarmante. No ano de 2001, casos novos nessa

faixa etária correspondia a 7,8% da detecção total. A redução mostrou-se pouco expressiva, pois em 2016, correspondeu a 6,6% do total de casos novos (BRASIL, 2017b). Indicadores mais elevados nessa faixa etária são preocupantes, visto que é necessário um longo período de exposição do indivíduo para que haja adoecimento. Se há doença instalada na população jovem, há um maior risco das outras faixas etárias evoluírem para alguma forma de hanseníase.

Norte e Nordeste brasileiro são as regiões com maior número de casos, tendo taxas de detecção 28,7/100.000 habitantes e 19,29/100.000 habitantes, respectivamente. Falta de acesso à saúde, baixo poder aquisitivo e condições precárias de higiene e moradia costumam ser fatores determinantes para indicadores tão elevados.(BRASIL, 2017b)

A investigação dos contatos, juntamente com a busca ativa e atendimento de demanda espontânea, é um dos pilares para a identificação dos novos casos de hanseníase. Indivíduos com contato prolongado tem maior risco de adquirirem a doença e devem ser investigados (BRASIL, 2016) De acordo como dados oficiais, em 2017, 76,15% dos contatos intradomiciliares de casos diagnosticados com hanseníase foram examinados. Na Figura 3, pode-se observar que, desde o ano de 2015, o número de casos examinados vem caindo, mesmo que discretamente (BRASIL, 2017a).

Figura 3 – Percentual de contatos examinados entre os casos registrado 2001-2017

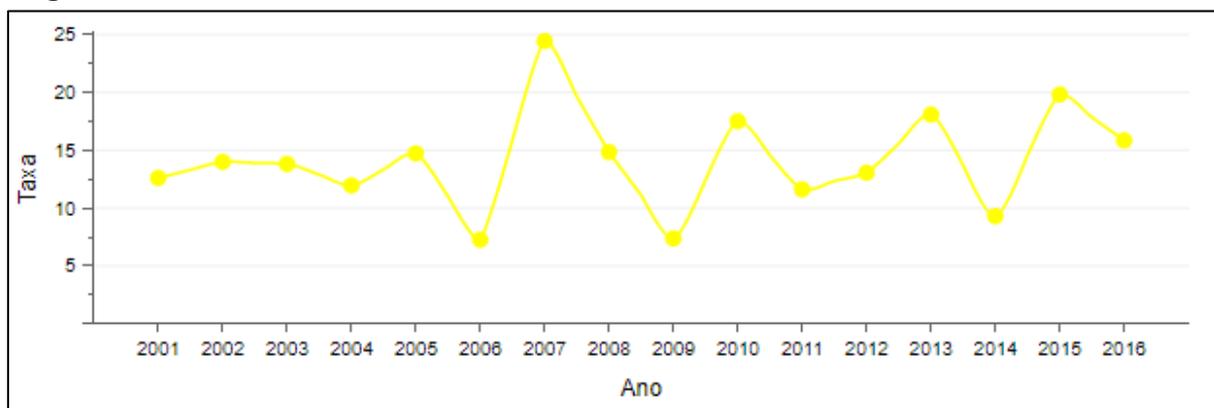


Fonte: Brasil (2017a)

2.2.3 Alagoas e Rio Largo

Alagoas é o Estado do Nordeste brasileiro que tem a menor taxa de detecção de novos casos de hanseníase (8.9/100.000 habitantes). Esse dado pode não representar a realidade vivida no estado, visto que municípios como Santana do Ipanema e Rio Largo possuem taxas de detecção elevadas, 20,81/100.000 habitantes e 15,85/100.000 habitantes (Figura 4), respectivamente (BRASIL, 2017a). No ano de 2016, o município de Rio Largo registrou, entre jovens com idade abaixo de 15 anos, uma taxa de detecção de 32,81/100.000 habitantes, sendo considerado município hiperendêmico para hanseníase (BRASIL, 2016).

Figura 4 – Taxa de detecção de casos novos de hanseníase município de Rio Largo, Alagoas. 2001-2016.



Fonte: Brasil (2017a)

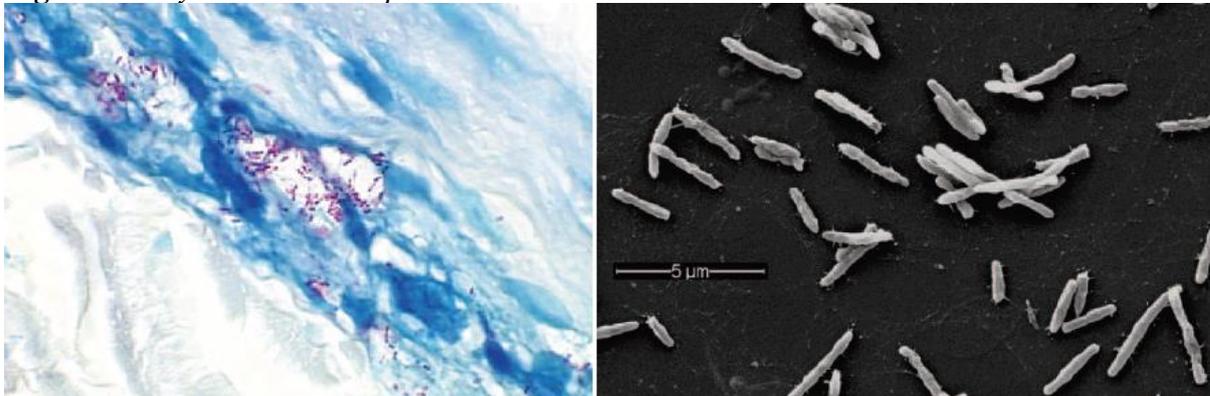
2.3 Etiopatologia

2.3.1 Agente etiológico

O *M. leprae* é visualizado em microscopia como um bacilo em forma de bastonete, reto ou levemente encurvado com extremidades arredondadas, e apresenta aproximadamente 1 a 8 µm de comprimento e 0,3 µm de diâmetro (Figura 5) (GRZYBOWSKI et al., 2013). Trata-se de uma bactéria que possui divisão binária lenta. Na técnica de coloração para microscopia de Ziehl-Neelsen, desenvolvida em 1882 por Franz Ziehl (1857-1926) e Friedrich Neelsen (1854-1894), a bactéria é resistente à ação do álcool-ácido, sendo denominada de bacilo álcool ácido resistente. O corante fucsina confere ao bacilo uma coloração avermelhada. Esta característica é devida ao elevado teor de lípidios estruturais na parede celular, que provoca

uma grande hidrofobicidade, dificultando a ação de mordentes e diferenciadores de corantes aquosos (SCHERR e NGUYEN, 2009).

Figura 5 – *Mycobacterium leprae*



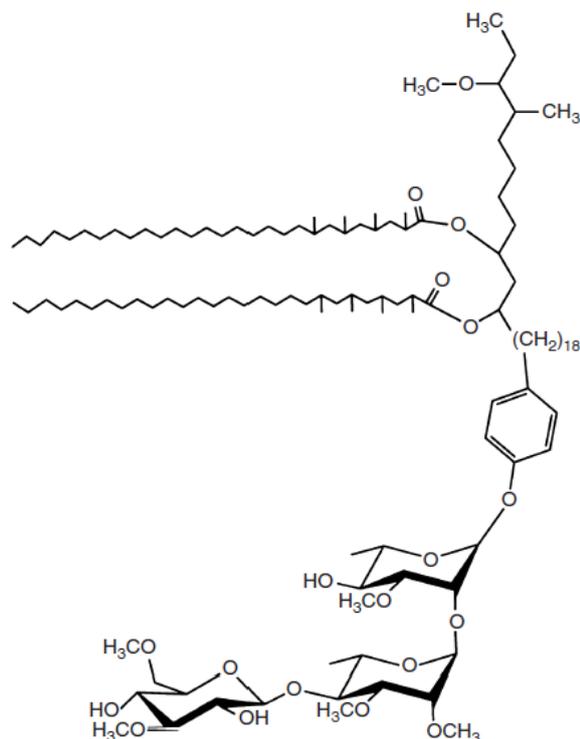
Fonte: Scollard *et al.* (2006). À **esquerda**: visualização de biópsia de nervo contendo *M. leprae* corado em vermelho; coloração de Ziehl-Neelsen, 800x. À **direita**: *M. leprae* visualizado a partir de microscopia eletrônica de varredura, 29.000x.

O seu processo de divisão é lento e seu estudo é dificultado pelo fato de não ser cultivado em meios de cultura. Estudos mostram o seu crescimento e reprodução foi obtido com sucesso em patas de camundongos e tatus (*Dasyus novemcictus*), podendo este último ser uma fonte de transmissão para seres humanos (SCOLLARD *et al.*, 2006; MOHANTY *et al.*, 2016).

M. leprae apresenta tropismo por células de Schwann, cuja função é de produção da bainha de mielina em nervos periféricos. A bactéria tem predileção por regiões do corpo que possuem temperaturas mais baixas, entre 27 a 30°C. Dessa forma, as áreas mais comumente afetadas em pacientes com hanseníase são as regiões mais frias do corpo, como extremidades dos membros e face. Como se trata de um patógeno intra-vesicular, pode ser encontrada no interior de fagolisossomas de macrófagos na pele e em outros órgãos (MADIGAN *et al.*, 2017).

Em sua parede, o *M. leprae* possui, um glicolípido específico da espécie chamado glicolípido fenólico 1 (PGL-1). Foi descrito pela primeira vez por Hunter e Brennan (1981), mais tarde sendo investigado sua relação com atividade sorológica na produção de anticorpos em pacientes com hanseníase (BRETT *et al.*, 1983). A determinação dos níveis de anticorpos anti-PGL-1 tem utilizado na investigação de pacientes e contatos em estudos soroepidemiológicos. A pesquisa desses anticorpos pode ser realizada em soro (CABRAL *et al.*, 2013; PENNA *et al.*, 2016) quanto em saliva (NAGAO-DIAS *et al.*, 2007; CABRAL *et al.*, 2013; DE MACEDO *et al.*, 2017)

Figura 6 –Estrutura molecular do glicolípido fenólico-1 (PGL-1)



Fonte: Spencer e Brennan (2011).

O que representa o determinante antigênico do PGL-1 (Figura 6) é um terminal trissacarídeo, o qual é responsável pela diferenciação entre outras micobactérias. Entretanto, o PGL-1 nativo utilizado em testes de detecção de anticorpos anti-PGL-1 não é de fácil obtenção. Devido a isso, o determinante antigênico tem sido produzido em laboratório por síntese química, resultado em compostos mono, di ou trissacarídeos. Esses compostos são conjugados geralmente com albumina sérica bovina (BSA), que tem função de carreadora e dão origem a novos compostos semissintéticos. ND-O-BSA, NT-O-BSA, ND-P-BSA, NT-P-BSA são alguns exemplos desses compostos (SPENCER e BRENNAN, 2011; PENNA *et al.*, 2016).

Estudos recentes mostram que o PGL-1 tem um importante papel na interação com macrófagos e tropismo pelas células de Schwann (NG *et al.*, 2000; SPENCER e BRENNAN, 2011; MADIGAN *et al.*, 2017).

2.3.2 Transmissão

O mecanismo exato de infecção do *M. leprae* ainda não foi completamente elucidado, mas acredita-se que o principal meio de transmissão da hanseníase seja pelas vias aéreas superiores. Indivíduos doentes disseminam o bacilo por meio de perdigotos (gotículas de Flügge) e estes, por sua vez, entram em contato com a mucosa nasal de indivíduos saudáveis. Achados de DNA do *M. leprae* em amostras mucosa nasal reforçam a idéia que principal via de disseminação e entrada do bacilo sejam as vias aéreas superiores (CABRAL *et al.*, 2013; BRATSCI *et al.*, 2015; ARAUJO *et al.*, 2016; FRADE e FOSS, 2016).

Entretanto, não se pode descartar outras vias de transmissão do bacilo. Estudos mostram que foi detectado material genético do *M. leprae* em amostras ambientais, como água e solo (HOLANDA, 2015; MOHANTY *et al.*, 2016).

Em estudo realizado em doadores de sangue de um hemocentro brasileiro, Goulart *et al.* (2015) encontraram anticorpos específicos e DNA de *M. leprae* em amostras de sangue desses doadores, sugerindo essa possa ser mais uma via de transmissão do bacilo. Tais evidências sugerem vias alternativas de infecção e que podem contribuir de forma silenciosa para a perpetuação da bactéria.

2.3.4 Imunopatologia

A hanseníase é uma doença extremamente complexa em termos de fisiopatologia. Suas diversas formas clínicas dependem do tipo de resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro. No espectro das formas clínicas há dois polos, um, no qual a doença é mais controlada (tuberculóide) devido a uma predominante resposta imune celular. Já no outro polo, há uma intensa disseminação de bacilos (virchowiana) devido a uma baixa resposta celular.

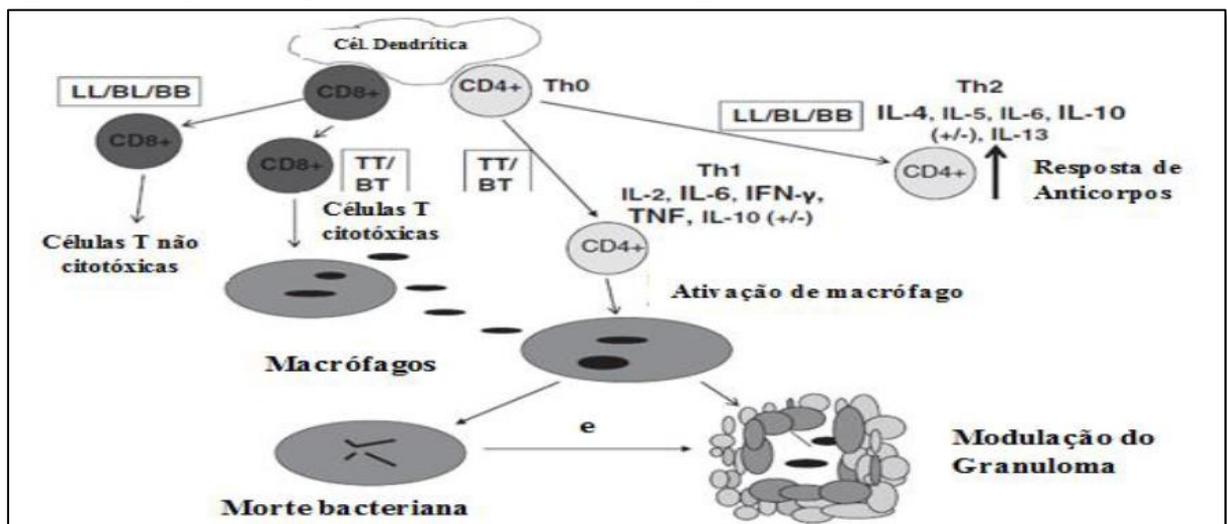
A primeira interação do bacilo com o organismo dá-se por meio de padrões moleculares na superfície do bacilo que interagem com receptores do tipo Toll, ou *Toll-like receptors* (TLR), presentes em macrófagos e células dendríticas (DCs), responsáveis pela imunidade inata. Essas células, juntamente com neutrófilos, neste contexto, são chamadas de células apresentadoras de antígenos.

A resposta imune adquirida tem início quando as DCs apresentam os antígenos do *M. leprae* a células T, que podem estimular as células T a se diferenciarem em subpopulações de células efetoras distintas CD4⁺ ou CD8⁺ (Figura 7). Células T CD4⁺, ou linfócitos T auxiliares (*T helper*, ou Th), inicialmente em estado de Th0, podem modular a resposta imune a dois perfis de resposta (Th1 ou Th2), dependendo do microambiente no qual estão inseridas e no tipo de interação dos antígenos com os receptores de célula T (TCR) (GOULART *et al.*, 2002; ARAÚJO, 2003).

O perfil Th1 é caracterizado pela produção de interleucina-2 (IL-2), interleucina-6 (IL-6), interferon-gama (INF- γ), fator de necrose tumoral alfa, (TNF- α), onde haverá estimulação da atividade de macrófagos, levando a intensa atividade celular, característica da forma mais branda da hanseníase (polo tuberculóide) (ARAÚJO, 2003).

No perfil Th2, há produção de interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina-6 (IL-6), interleucina-13 (IL-13) e interleucina-10 (IL-10), suprimindo atividade de macrófagos e estimulando linfócitos B a se diferenciarem e induzir produção de anticorpos. Nesse perfil de resposta, há uma intensa atividade imune humoral e baixa atividade imune celular, característico da forma mais grave da doença (polo virchowiano), na qual há grande disseminação de bacilos pelo organismo (GOULART *et al.*, 2002).

Figura 7 – Representação dos mecanismos imunológicos na hanseníase



Fonte: Lourenço (2016). TT, Tuberculóide Tuberculóide; BT, Borderline-Tuberculóide; BB, Borderline-Borderline, BL, Borderline-lepromatosa; LL, Lepromatosa- Lepromatosa.

Além da diferenciação dos linfócitos T auxiliares em Th1 e Th2, duas subpopulações de células (Th17 e Treg), as quais estão presentes, atuam de forma antagônica e são de fundamental importância no curso e evolução da doença. A subpopulação Th17, produz interleucina-17 e interleucina-22 e está associada ao aumento de inflamação e quebra na tolerância imunológica. Sua atividade está aumentada nas formas clínicas da hanseníase onde há uma maior atividade celular (SADHU et al., 2016).

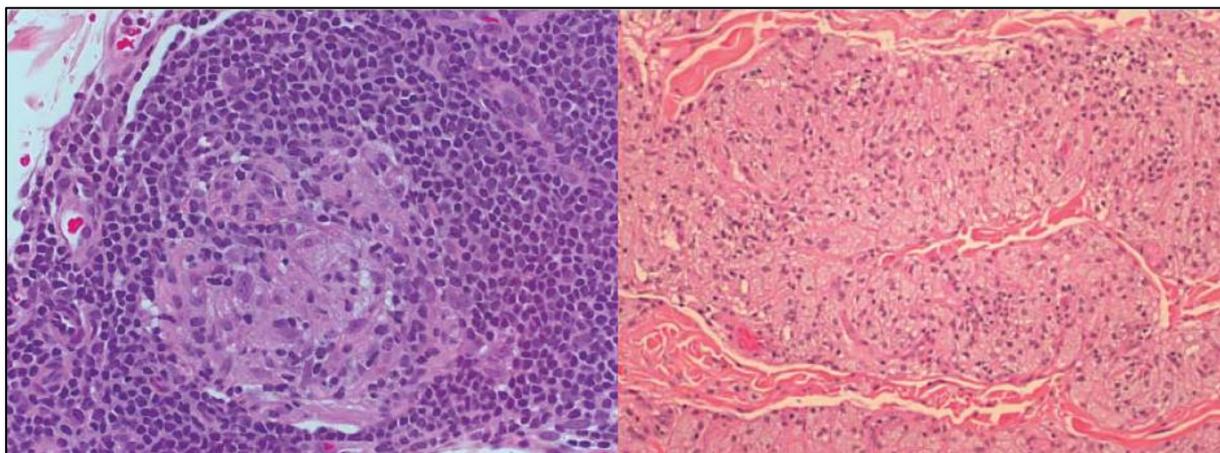
De maneira inversa, o linfócito T regulador, ou Treg, como o próprio nome sugere, é essencial na regulação da tolerância imunológica periférica e no controle de doenças associadas a inflamações crônicas. Acredita-se que sua ação se deve a produção de citocinas inibitórias (IL-10) e fator de crescimento tumoral- β (TGF- β). A baixa resposta imune celular na forma tuberculóide da hanseníase pode estar associada à alta atividade do linfócito Treg. Em situações fisiológicas normais, os linfócitos Treg e Th17 atuam de forma coordenada (SADHU et al., 2016).

2.4 Diagnóstico clínico e laboratorial

O diagnóstico da hanseníase é essencialmente clínico e epidemiológico. É realizado através de avaliação dermatoneurológica, na qual é realizada busca por machas na pele, acompanhadas de alteração de sensibilidade. A avaliação de comprometimento de nervos periféricos também é um dos pontos de investigação (BRASIL, 2016). Devido a enorme variedade de manifestações clínicas, as alterações de pele podem confundidas com outras patologias tais como pitiríase alba, pitiríase versicolor, vitiligo, entre outras (LASTÓRIA e ABREU, 2014b).

Além do exame clínico pode-se diagnosticar a doença através da visualização do bacilo em exame histopatológico ou em materiais como raspado de lesões, nervo ou linfa. A visualização do bacilo é realizada fazendo uso da coloração de Ziehl-Neelsen ou Fite-Faraco. Geralmente, o exame histopatológico (Figura 8) é o de escolha para realização do diagnóstico diferencial. As técnicas microscópicas apresentam baixa sensibilidade, uma vez precisam de 10^4 bacilos por grama de tecido para uma detecção confiável (TORRES *et al.*, 2003; LASTÓRIA e ABREU, 2014a).

Figura 8 – Exame histopatológico no diagnóstico da hanseníase.



Fonte: Lastória e Abreu (2014a). Exame histopatológico mostrando os dois polos da doença. Hanseníase tuberculóide (esquerda), e hanseníase virchowiana (direita). Coloração hematoxilina-eosina, 400x

Por este motivo, há a necessidade de buscar testes laboratoriais de maior sensibilidade que sirvam de recurso para auxiliar o diagnóstico da hanseníase.

2.5 Marcadores sorológicos

A detecção precoce e o tratamento dos indivíduos diagnosticados com hanseníase reduziriam a transmissão do bacilo, evitando que mais pessoas se infectassem. A hanseníase, outras doenças negligenciadas, precisa de novas ferramentas para realizar a detecção precoce dos indivíduos doentes. A busca de biomarcadores que atuem como sinalizadores de risco ou doença é a chave para a interrupção da cadeia de transmissão da hanseníase.

Brett *et al.* (1983) descreveram um teste imunoenzimático para detecção de anticorpos IgM e IgG anti-PGL-1. Desde então, a investigação de anticorpos específicos contra o *M. leprae* se tornou uma importante ferramenta na investigação de infecção subclínica, e consequentemente, para detecção de infecção subclínica e avaliação de risco de contatos de pacientes com hanseníase (BRASIL *et al.*, 2003; NAGAO-DIAS *et al.*, 2007; CABRAL *et al.*, 2013; CARVALHO *et al.*, 2015; FABRI *et al.*, 2015; PENNA *et al.*, 2016; MACEDO *et al.*, 2017).

Em uma meta análise, na qual foram incluídos estudos com pacientes diagnosticados com hanseníase e seus contatos, Penna *et al.* (2016) mostraram que, contatos que apresentavam soropositividade para anticorpos anti-PGL-1 teriam três vezes mais chance de evoluir para doença quando comparado aos contatos que não apresentavam sorologia positiva.

Dentre os anticorpos anti-PGL-1, o isotipo IgM aparece em níveis maiores, entretanto, os isotipos IgG e IgA também podem ser detectados (KIRSZTAJN *et al.*, 1994), o que evidencia múltiplos mecanismos de resposta do sistema imune à presença do bacilo no organismo.

A pesquisa de anticorpos específicos não é realizada somente em soro, mas também em mucosas, como é o caso da saliva. Anticorpos presente nas mucosas tem a função, juntamente com fatores não específicos (saliva, muco), evitar a aderência de bactérias e vírus, bem como neutralizar toxinas (BRANDTZAEG, 2009). Esses anticorpos podem estar presentes tanto a nível de lâmina própria quanto no lúmen.

Anticorpos salivares anti PGL-1, como é o caso de IgA e IgM, podem indicar infecção recente ou passada, uma vez que acredita-se que a primeira interação do bacilo com o organismo é a mucosa nasal, sendo, por sua vez o primeiro sítio de resposta imune à exposição (NAGAO-DIAS *et al.*, 2007; CABRAL *et al.*, 2013; MACEDO *et al.*, 2017). Apesar de não oferecerem proteção à infecção da micobactéria, esses anticorpos podem atuar como biomarcadores. A presença de IgA anti-PGL-1 em altos níveis, na saliva, pode indicar infecção passada ou presente e, por outro lado, IgM anti-PGL-1 pode indicar infecção presente ou recente (CABRAL *et al.*, 2013; MACEDO *et al.*, 2017).

2.6 Classificação

A hanseníase é uma doença espectral, com várias formas clínicas distintas. Classificações propostas tem a finalidade de agrupar manifestações clínicas e perfis de resposta imune semelhantes.

2.6.1 Classificação de Madri (1953)

A classificação de Madri é a classificação mais antiga, porém é a mais utilizada na prática. A divisão das formas clínicas é realizada como tuberculóide (T), *boderline* (B), virchowiana (V) e indeterminada (I) (ARAÚJO, 2003).

2.6.2 Classificação de Ridley & Jopling (1966)

A classificação proposta por Ridley & Jopling tem o intuito de subdividir as formas clínicas em formas intermediárias, mantendo as formas polares. A divisão se dá em

tuberculóide-tuberculóide (TT), *borderline*-Tuberculóide (BT), *borderline*-Borderline (BB), *borderline*-lepromatosa (BL), lepromatosa-lepromatosa (LL). Esta classificação é voltada para pesquisadores, pois mostrou-se pouco prática e demorada, dificultando o tratamento (GOULART *et al.*, 2002).

2.6.3 Classificação da OMS (1982)

Visando facilitar e padronizar o tratamento pacientes diagnosticados com hanseníase, a OMS propôs uma classificação, apresentando apenas dois grupos, que leva em conta o número de lesões identificadas e o índice baciloscópico do indivíduo. De acordo com essa classificação, os pacientes são divididos em paucibacilares (PB), aqueles que apresentarem um número de lesões menor ou igual a 5 e multibacilares (MB) os indivíduos que apresentarem mais de 5 lesões. No Brasil, o Ministério da Saúde adotou essa classificação para fins operacionais e de tratamento utilizando a PQT (BRASIL, 2016).

2.7 Tratamento

Segundo a OMS, os princípios básicos no tratamento da hanseníase são a PQT, a supressão de surtos reacionais, além da prevenção de incapacidades, reabilitação física, psicológica e promover a inclusão social.

O Ministério da Saúde segue a classificação operacional de PB e MB nos esquemas de PQT. Cada forma clínica tem um esquema terapêutico distinto, dividido por medicação (Quadro 1) utilizada e tempo de tratamento.

Quadro 1 – Apresentação das cartelas utilizadas na PQT de acordo com a classificação operacional.

FAIXA	CARTELA PB	CARTELA MB
Adulto	Rifampicina (RFM): cápsula de 300 mg (2)	Rifampicina (RFM): cápsula de 300 mg (2)
	Dapsona (DDS): comprimido de 100 mg (28)	Dapsona (DDS): comprimido de 100 mg (28)
	-	Clofazimina (CFZ): cápsula de 100 mg (3) e cápsula de 50 mg (27)
Criança	Rifampicina (RFM): cápsula de 150 mg (1) e cápsula de 300 mg (1)	Rifampicina (RFM): cápsula de 150 mg (1) e cápsula de 300 mg (1)
	Dapsona (DDS): comprimido de 50 mg (28)	Dapsona (DDS): comprimido de 50 mg (28)
	-	Clofazimina (CFZ): cápsula de 50 mg (16)

Fonte: Brasil (2016)

O Quadro 1 mostra quais os medicamentos utilizados no tratamento de pacientes de acordo com a classificação operacional, os quais são divididos em cartelas PB (rifampicina e dapsona) e cartelas MB (rifampicina, dapsona e clofazimina). A dose varia de acordo com a faixa etária e o peso do paciente. O tratamento de pacientes PB é realizado utilizando 6 cartelas em até 9 meses, enquanto pacientes MB utilizam 12 cartelas em até 18 meses. Uma vez por mês, é preciso que paciente se dirija à unidade de saúde competente para tomada de dose supervisionada, na qual profissional de saúde capacitado comprova a tomada dos medicamentos (BRASIL, 2016).

3 JUSTIFICATIVA

A hanseníase continua a ser um grave problema de saúde pública, podendo levar a incapacidades físicas, além do impacto social relevante devido ao preconceito e discriminação. O problema pode ser agravado pela falta de acesso à saúde e políticas sanitárias insuficientes em municípios do interior do Nordeste, como é o caso do município de Rio Largo, localizado no estado de Alagoas. Por este motivo, o presente trabalho visou avaliar jovens com idade abaixo de 15 anos, que são contatos de pacientes diagnosticados com hanseníase, para que se estimar o grau da exposição e o risco que esses jovens correm de desenvolver a doença, através de avaliação de marcadores sorológicos e salivares (anti-PGL-1), uma vez que estes podem indicar o grau de exposição ao agente causador.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo principal determinar os níveis de anticorpos anti-PGL-1, sérico e salivar, em jovens com idade igual ou inferior a 15 anos, contatos de pacientes diagnosticados com hanseníase no município de Rio Largo- AL, nos anos de 2015 e 2016.

4.2 Objetivos específicos

- Em contatos com idade igual ou inferior a 15 anos de pacientes diagnosticados com hanseníase no município de Rio Largo-AL, nos anos de 2015 e 2016:

- Realizar avaliações dermatoneurológicas;
- Determinar os níveis de IgM e IgA anti-PGL-1 em amostras de saliva;
- Determinar os níveis de IgM, IgG e IgA anti-PGL-1 em amostras de soro.

- Correlacionar os diferentes isotipos de anticorpos séricos e salivares.

- Analisar o comportamento dos anticorpos séricos, comparando os resultados obtidos nos anos de 2015 e 2016.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Delineamento, população, local e período do estudo

Trata-se de um estudo prospectivo, realizado nos anos de 2015 e 2016, com indivíduos com idade igual ou inferior a 15 anos, contatos intradomiciliares e peridomiciliares de pacientes diagnosticados com hanseníase no município de Rio Largo- Alagoas. Os pacientes foram rastreados através do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN).

5.2 Aspectos éticos

O presente projeto é parte integrante do projeto intitulado: “Detecção precoce de anticorpos entre jovens abaixo de 15 anos de idade residentes em municípios de Alagas e Itaitinga, CE”. já aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (processo 532.850,18/02/2014) (Anexo I).

A todos os participantes da pesquisa foi garantido o caráter sigiloso dos dados e o anonimato. O responsável da criança ou jovem foi convidado a assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice I) e as crianças e jovens entre 8 e 15 anos de idade completos foram convidadas a assinar o Termo de Assentimento (Apêndice II), conforme preconiza o Conselho Nacional de Saúde, através da Resolução 196/96.

5.3 Critérios de inclusão

Foram incluídos no estudo contatos intra ou peridomiciliares (em um raio de cinco casas), com idade igual ou inferior a 15 anos, de pacientes com hanseníase paucibacilar ou multibacilar, diagnosticados e notificados pelo município de Rio Largo ao SINAN nos últimos 6 anos. Assim, participaram do presente estudo 68 indivíduos.

5.4 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo aqueles que apresentaram lesões suspeitas e/ou alteração de sensibilidade na avaliação dermatoneurológica inicial. Os mesmos foram encaminhados à Unidade de Saúde para confirmação através do diagnóstico clínico-laboratorial.

5.5 Avaliação dermatoneurológica e coleta do material biológico

Todos os participantes do estudo foram submetidos a uma avaliação dermatoneurológica, realizada por equipe médica, quando disponível, ou de enfermagem assessorada pela Professora Doutora Clódis Maria Tavares (Universidade Federal de Alagoas) e só então foram coletadas as amostras biológicas. Os parâmetros investigados na avaliação clínica foram: bom estado geral de saúde, presença ou ausência de machas suspeitas (com alterações de sensibilidade) e espessamento de nervos.

5.5.1 Obtenção de amostras de soro

A coleta de sangue total para obtenção do soro foi realizada por punção venosa em tubo de coleta com gel separador e ativador de coágulo (BD Vacutainer® SSD® II ADVANCE®). Foi aguardado um tempo de 30 minutos após a coleta e em seguida os tubos foram centrifugados a 1500xG por 10 minutos em centrífuga sorológica e posteriormente o soro foi coletado. As amostras foram transportadas em caixas térmicas contendo gelo seco até o laboratório, onde foram estocadas em freezer a uma temperatura de -20°C até o momento das análises.

5.5.2 Obtenção das amostras de saliva

Amostra de saliva não estimulada (sem uso de substâncias que induzam sua produção) foi coletada em copos de plástico, sendo transferida em seguida para tubos de 2,5 mL (EPPENDORF®) e transportada em caixas térmicas com gelo seco até o laboratório. Posteriormente, as amostras foram estocadas, por um período não superior a 3 semanas, em freezer a uma temperatura de -20°C.

5.6 Detecção de anticorpos anti-PGL-1

Todas as dosagens de anticorpos anti-PGL-1 foram realizadas de acordo com protocolo estabelecido por Cabral *et al.* (2013) com modificações descritas a seguir.

5.6.1 Determinação dos níveis de anticorpos anti-PGL-1 no soro

Microplacas (Costar, EUA) foram sensibilizadas com PGL-1 nativo, gentilmente cedido por Bei Resources/ATCC (Manassas, USA), em uma concentração 5µg/mL em etanol absoluto por 2 horas a 37°C. Após bloqueio com 100 µL de solução tampão fosfato salino (PBS) com 1% de soro fetal bovino (SFB, LGC Bio, Brasil) por 2 horas a 37°C em câmara úmida, os poços foram lavados cinco vezes com uma solução PBS-0,05% SFB. Em seguida, as amostras foram diluídas na proporção 1:200 (IgG e IgM) e 1:50 (IgA) em PBS-1% SFB, adicionadas à placa (50 µL por poço) em duplicata e incubadas por um período de 18 horas a 4°C em câmara úmida. Após nova etapa de lavagem, foi realizada a diluição dos conjugados. Para detecção de IgG foi utilizado anticorpo anti-IgG humana marcado com peroxidase (A170, Sigma, EUA) na diluição 1:2.500 em PBS-1% SFB. Para detecção de IgM, foi utilizado anti-IgM humana marcada com peroxidase (SAB3701404, Sigma, EUA) na diluição 1:5.000 em PBS-1% SFB. Para detecção de IgA foi utilizada anti-IgA humana marcada com peroxidase (0295, Sigma, EUA). Foram adicionados 50 µL, por poço, do conjugado diluído e incubado por 90 minutos a 37°C em câmara úmida, seguido por etapa de lavagem da microplaca.

O substrato cromógeno foi preparado utilizando os seguintes reagentes: 10 mg ortofenilenodiamina (OPD, Sigma, EUA), 25 mL de tampão citrato-fosfato 0,01M, pH 5,0 e 8,6 µL de peróxido de hidrogênio a 35%. Foi adicionado 100 µL do substrato aos poços, aguardando, em seguida, 30 minutos ao abrigo da luz. Decorrido o tempo necessário, foi adicionado 25 µL de H₂SO₄ (2,5N) para finalizar a reação.

A leitura foi realizada em espectrofotômetro, utilizando o comprimento de onda de 492 nm. Os resultados foram expressos na forma de títulos, obtidos de acordo com a seguinte fórmula: média das densidades ópticas (subtraído do branco) dividido pela média das densidades ópticas do pool de soro humano normal (subtraído do branco). O *cut-off* foi baseado no 97º percentil dos controles normais. Resultados com títulos 30% acima do *cut-off* foram considerados positivos.

5.6.2 Determinação dos níveis de anticorpos anti-PGL-1 na saliva

Microplacas (Costar, EUA) foram sensibilizadas com PGL-1 nativo (Bei Resources/ATCC, Manassas, USA), a uma concentração 5 mg/L em etanol absoluto por 2 horas, a 37°C. Após bloqueio com 100 µL de solução de Tris-1% SFB em cada poço (2 horas, a 37°C), os poços foram lavados cinco vezes, com solução Tris-0,05% SFB. Em seguida, os poços foram incubados com a amostra de saliva previamente centrifugada (diluída em 1:50 com Tris-1% SFB), por 18 horas a 4°C, em câmara úmida. A seguir, foi repetida a etapa de lavagem, e adicionado à placa os anticorpos anti-IgA (A9669, Sigma, EUA) ou anti-IgM (A3175, Sigma, EUA) humana marcada com fosfatase alcalina (Sigma, EUA), em uma diluição 1:1000 em Tris-1% SFB, e incubados por 2 horas a 37°C, em câmara úmida. Após nova etapa de lavagem, 100 µL da solução de substrato (1mg/mL p-nitrofenil fosfato em 10% de dietanolamina contendo 0,5 mM MgCl₂, pH 9,8) foram adicionados aos poços. Após 100 minutos de incubação a temperatura ambiente, as absorbâncias foram medidas utilizando um leitor de placa de ELISA com comprimento de onda de 405 nm. Os resultados foram expressos como a média das densidades ópticas (D.O.) obtidas (subtraídas do branco). O *cut-off* foi baseado no 97º percentil dos controles normais. Resultados com títulos 30% acima do *cut-off* foram considerados positivos.

5.7 Análises estatísticas

Os dados foram analisados utilizando testes não paramétricos, visto que não obedeceram uma distribuição gaussiana (teste de Kolgomorov-Smirnov). Foram utilizados os testes de Wilcoxon e Mann-Whitney para análise de dados pareados e não pareados, respectivamente. O coeficiente de Spearman foi calculado para análise de correlação entre grupos e teste de Friedman, seguido do pós-teste de Dunn para múltiplas comparações. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 7. A interpretação dos valores de correlação obtidos foi realizada de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2 – Regra geral para interpretação do valor do coeficiente de correlação.

Tamanho da correlação	Interpretação
0,90 a 1,00 (-0,90 a -1,00)	Correlação positiva (negativa) muito alta
0,70 a 0,90 (-0,70 a -0,90)	Correlação positiva (negativa) alta
0,50 a 0,70 (-0,50 a -0,70)	Correlação positiva (negativa) moderada
0,30 a 0,50 (-0,30 a -0,50)	Correlação positiva (negativa) baixa
0,00 a 0,30 (-0,00 a -0,30)	Sem correlação

Fonte: (MUKAKA, 2012)

6 RESULTADOS

6.1 Caracterização dos contatos

No total foram analisados 68 contatos (Tabela 3), nos anos de 2015 e 2016, com idade média de $9,9 \pm 2,9$ anos, sendo 38 (55,8%) indivíduos do sexo masculino e 30 (44,2%) indivíduos do sexo feminino. No ano de 2015, entraram no estudo 66 contatos, dos quais 42 foram reavaliados em 2016. Dois contatos novos foram avaliados no ano de 2016, totalizando 44 contatos avaliados neste ano.

Tabela 3 – Caracterização dos contatos de acordo com a idade, sexo, classificação quanto à forma clínica do caso índice e ao tipo de domicílio em relação ao caso índice.

Total de contatos	68	
Idade (Média ± DP)	9,9 ± 2,9 anos	
Sexo	Masculino 38 (55,8%)	Feminino 30 (44,2%)
Classificação*	Multibacilar 38 (55,8%)	Paucibacilar 19 (27,9%)
Tipo de domicílio**	Intradomiciliar 22 (32,35%)	Peridomiciliar 44 (64,7%)
Contatos com manchas suspeitas	Suspeitos 17 (25%)	Não suspeitos 51 (75%)

Fonte: Próprio autor (2017). *Onze contatos (16,7%) não foram classificados quanto à clínica do caso índice devido à falta de informações nos registros médicos do paciente. ** Dois contatos (2,9%) não responderam quanto à residência em relação ao caso índice.

Do total, 38 (55,8%) foram classificados como contatos de pacientes multibacilares (contato MB) e 19 (27,9%) como contatos de pacientes paucibacilares (contatos PB). Onze (16,7%) contatos não puderam ser classificados devido à falta de informações nos registros médicos dos casos índices.

Quanto ao domicílio do contato em relação ao caso índice, 22 contatos foram classificados como intradomiciliares (ID) e 44 contatos como peridomiciliares (PD). Dois contatos não informaram onde moravam.

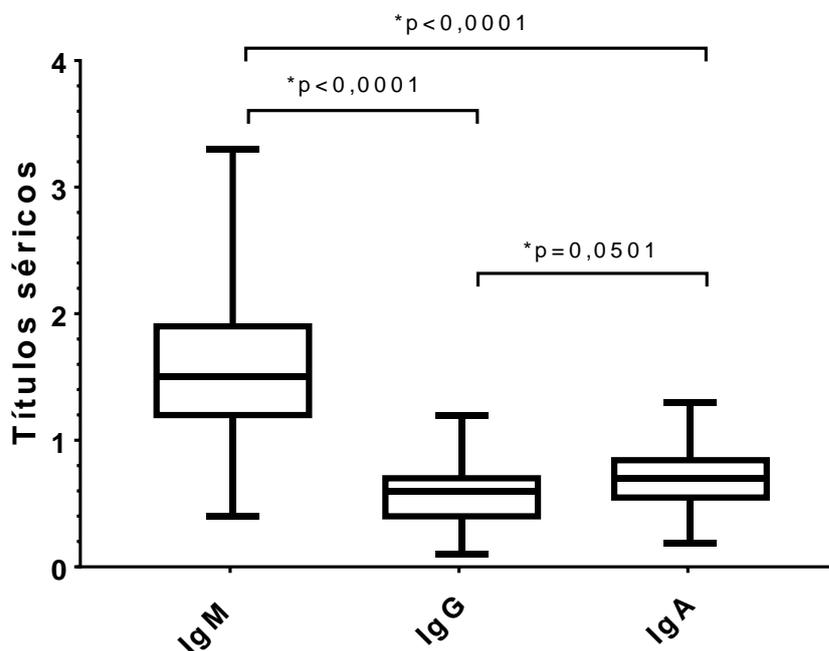
6.2 Determinação dos anticorpos anti-PGL-1

6.2.1 Análises das amostras coletadas no ano de 2015

6.2.1.1 Determinação dos anticorpos séricos anti-PGL-1

As análises dos títulos dos anticorpos séricos anti-PGL-1 de 66 contatos (Gráfico 1) apresentaram diferenças estatisticamente significantes quando os isotipos IgM, IgG e IgA foram comparados entre si (Teste de Friedman, $p < 0,0001$; pós teste de múltiplas comparações Dunn, $p < 0,0001$). Observou-se diferenças entre os títulos de IgM e IgG ($p < 0,0001$), IgM e IgA ($p < 0,0001$) e entre IgG e IgA ($p = 0,0501$).

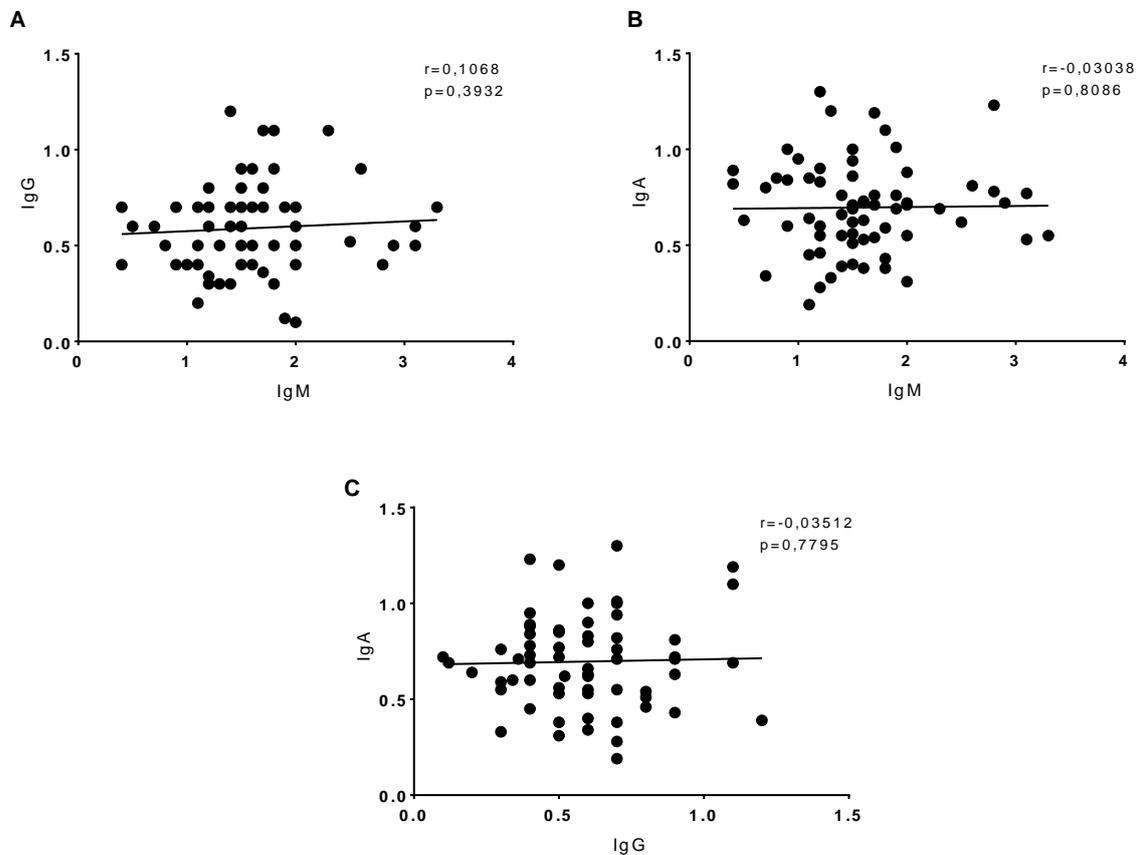
Gráfico 1 – Níveis de anticorpos séricos anti-PGL-1 de contatos, com idade inferior a 15 anos, de pacientes com hanseníase, em amostras coletadas no ano de 2015.



Fonte: Próprio autor (2017). Títulos de anticorpos séricos anti-PGL-1 de contatos (n=66) no ano de 2015. Análise realizada pelo teste de Friedman seguido do pós-teste de múltiplas comparações de Dunn.

Como pode ser observado no Gráfico 2, não houve correlações significantes entre os níveis dos diferentes isotipos de anticorpos séricos anti-PGL-1 analisados.

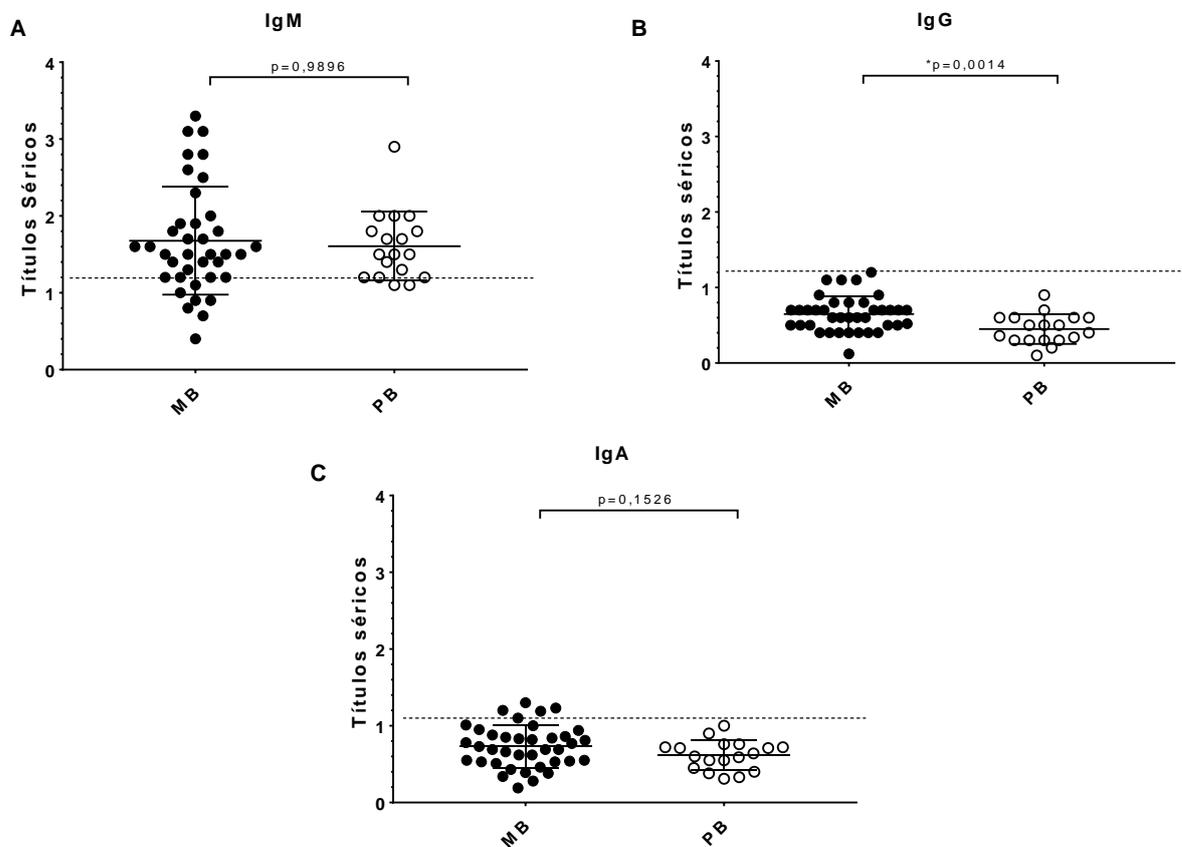
Gráficos 2 – Correlação entre os isotipos de anticorpos séricos anti-PGL-1 em amostras coletadas no ano de 2015.



Fonte: Próprio autor (2017). Títulos de anticorpos séricos anti-PGL-1 em amostras de contatos (n=66). (A) Correlação entre os isotipos IgM e IgG. (B) Correlação entre os isotipos IgM e IgA. (C) Correlação entre os isotipos IgG e IgA. Análises realizadas por meio da Correlação de Spearman.

Quando comparados quanto à forma clínica do caso índice (Gráfico 3), foi observada diferença significativa nos níveis de IgG sérica anti-PGL-1, que se mostraram mais altos em contatos de pacientes MB em comparação aos contatos de pacientes PB (teste de Mann-Whitney, $p=0,0014$). Para os demais isotipos, não foi observada diferença estatística significativa (teste de Mann-Whitney, $p=0,9896$ e $p=0,1526$ para IgM e IgA, respectivamente).

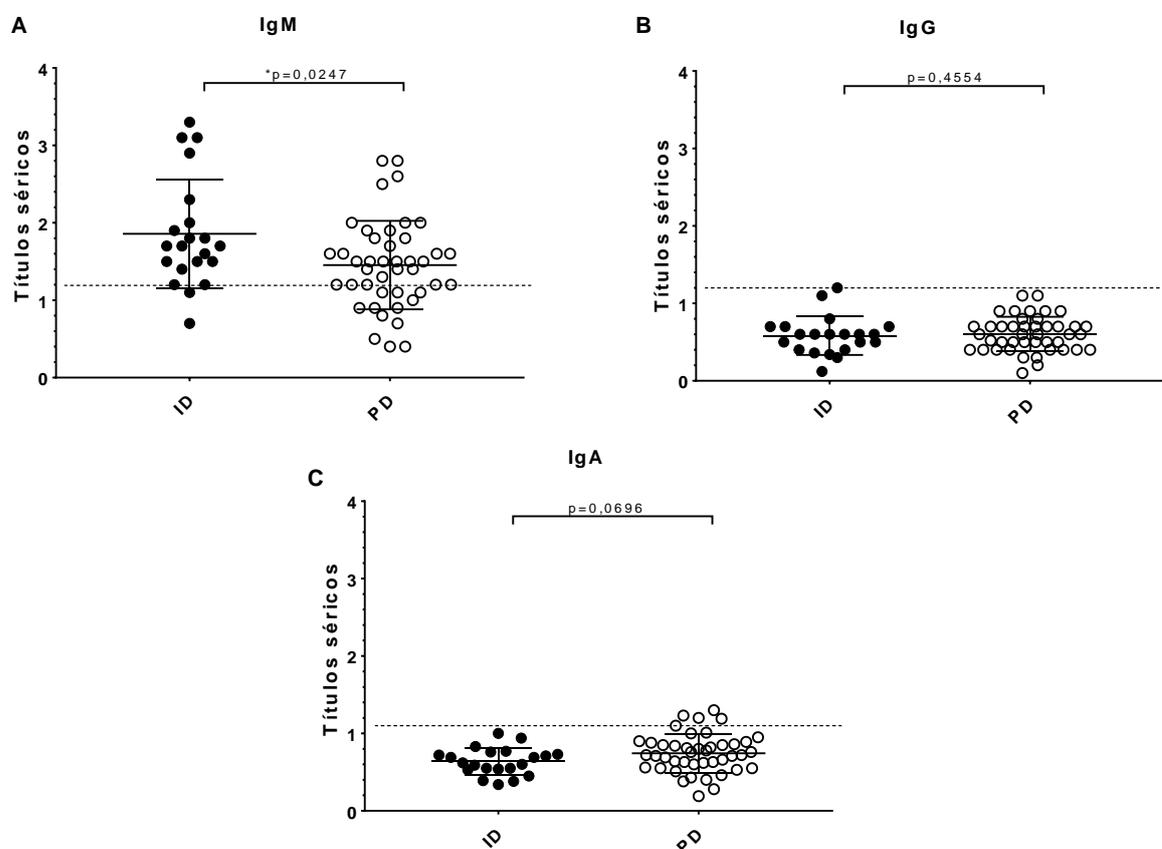
Gráfico 3 – Níveis de anticorpos séricos anti-PGL-1 de contatos em relação à forma clínica do caso índice, em amostras coletadas no ano de 2015.



Fonte: Próprio autor (2017). Níveis de anticorpos séricos anti-PGL-1 de contatos multibacilares (contatos MB, n=38) e paucibacilares (contatos PB, n= 18). (A) Níveis de IgM sérica anti-PGL-1. (B) Níveis de IgG sérica anti-PGL-1. (C) Níveis de IgA sérica anti-PGL-1. A linha tracejada indica o *cut-off*, cujos contatos acima dela são considerados positivos e abaixo dela são considerados negativos. Análises realizadas pelo teste de Mann-Whitney.

Quando analisado o tipo de interação (intradomiciliar ou peridomiciliar) dos indivíduos contatos em relação ao caso índice (Gráfico 4), foi observado que o isotipo IgM apresentou-se significativamente aumentado no grupo de contato intradomiciliares em relação aos contatos peridomiciliares (teste de Mann-Whitney, $p=0,0247$). Quanto aos demais isotipos analisados, não se observou diferença significativa entre os grupos (teste de Mann-Whitney, $p=0,4884$ e $p=0,0696$ para IgG e IgA, respectivamente).

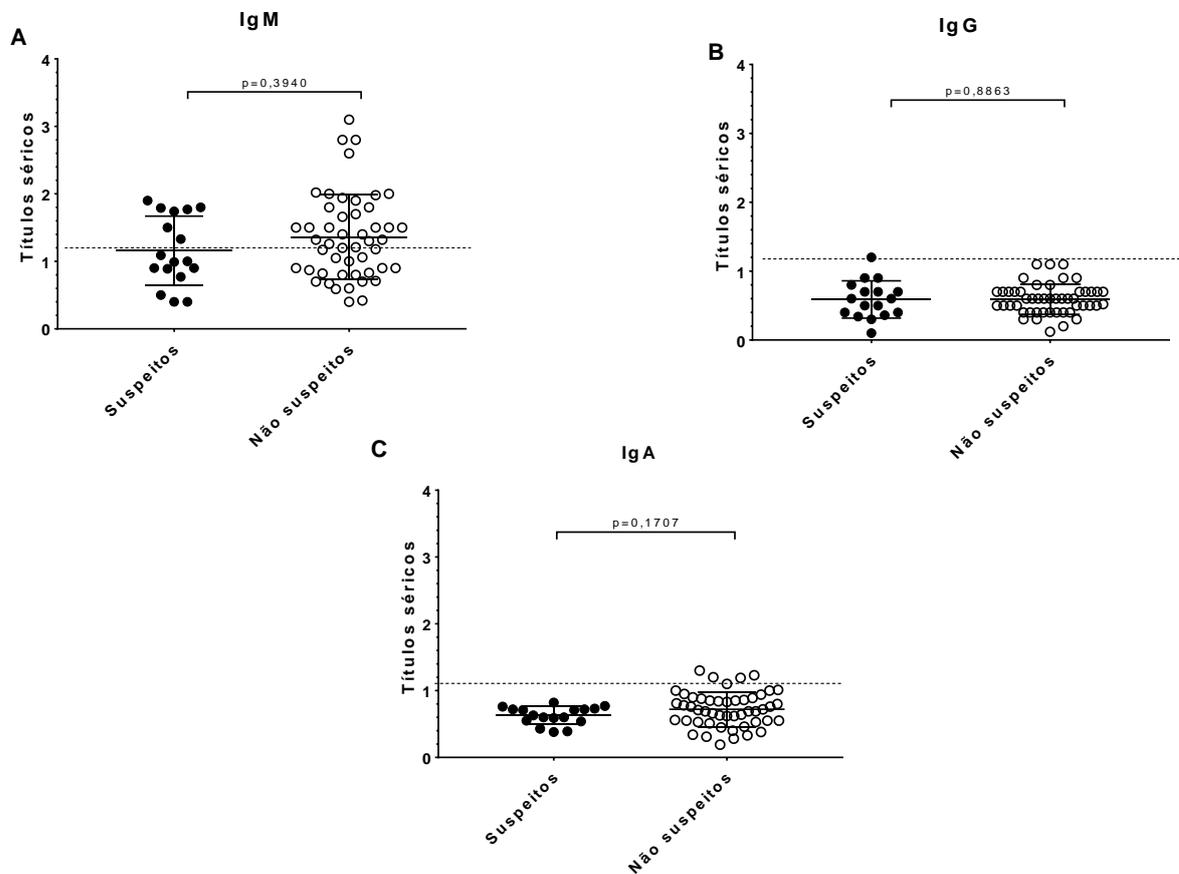
Gráfico 4 – Níveis de anticorpos séricos anti-PGL-1 de acordo com o domicílio do contato em relação ao caso índice.



Fonte: Próprio autor (2017). Níveis de anticorpos séricos de contatos intradomiciliares (contatos ID, n=21) e peridomiciliares (contatos PD, n=43) em amostras coletadas no ano de 2015. (A) Níveis de IgM anti-PGL-1. (B) Níveis de IgG anti-PGL-1. (C) Níveis de IgA anti-PGL-1. A linha tracejada indica o *cut-off*, cujos contatos acima dela são considerados positivos e abaixo dela negativos. Análises realizadas pelo teste de Mann-Whitney.

Os contatos também foram avaliados quanto à presença ou ausência de manchas suspeitas e/ou espessamento de nervos. Contatos que apresentaram algum tipo de alteração dermatoneurológica foram classificados como suspeitos (n=17) e os que não apresentaram nenhum tipo de alteração ao exame, classificados como não suspeitos (n=49). Após essa classificação, os diferentes isotipos de anticorpos séricos anti-PGL-1 foram analisados e comparados nos diferentes grupos (Gráfico 5). Neste contexto, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes em nenhum dos isotipos analisados nos diferentes grupos (Teste de Mann-Whitney, p=0,3940 para IgM; p=0,8863 para IgG; p=0,1707 para IgA).

Gráfico 5 – Níveis de anticorpos séricos anti-PGL-1 em contatos com e sem suspeita de doença.



Fonte: Próprio autor (2017). Níveis de anticorpos séricos anti-PGL-1 em contatos com alterações ao exame dermatoneurológico (suspeitos, n=17) e os que não apresentaram alterações ao exame (não suspeitos, n= 49) no ano de 2015. (A) Níveis de IgM anti-PGL-1. (B) Níveis de IgG anti-PGL-1. (C) Níveis de IgA anti-PGL-1. A linha tracejada indica o *cut-off*, cujos contatos acima da linha são considerados positivos e abaixo dela são negativos. Análises realizadas pelo teste de Mann-Whitney.

6.2.1.2 Determinação dos anticorpos salivares anti-PGL-1

Os anticorpos anti-PGL-1 em amostras de saliva coletadas no ano de 2015 não puderam ser dosados pelo fato de ter sido ultrapassado o período de 3 semanas após sua coleta, comprometendo assim a estabilidade das amostras e a confiabilidade dos resultados.

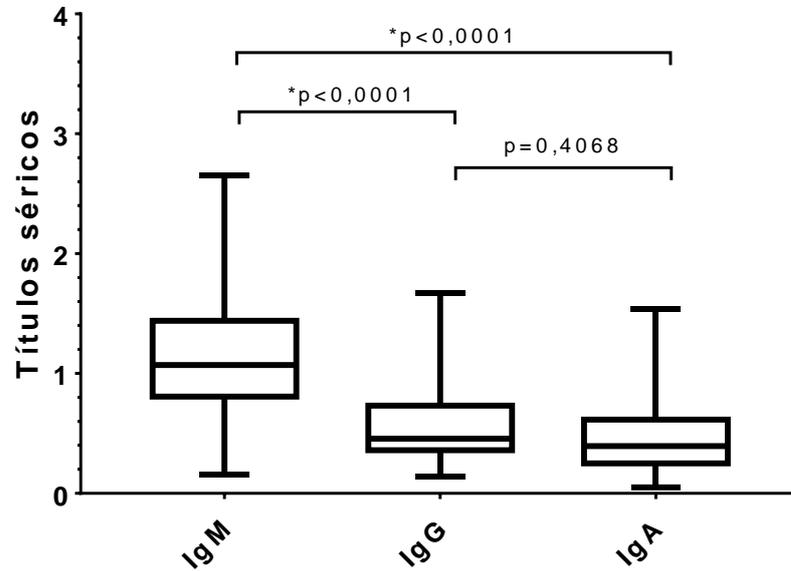
6.2.2 Análises das amostras coletadas no ano de 2016

6.2.2.1 Determinação dos anticorpos séricos anti-PGL-1

Ao total, no ano de 2016, foram avaliados 44 contatos, dentre os quais dois contatos foram avaliados pela primeira vez, não havendo avaliação dermatoneurológica e coleta de amostras no ano de 2015. Oito contatos não foram incluídos na análise quanto à forma clínica pelo fato de não haver, nos registros médicos, informações acerca da forma clínica do respectivo caso índice. De forma semelhante, não foram incluídos nas análises quanto à moradia em relação a caso índice, dois contatos os quais não responderam quanto ao tipo de moradia.

Foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os títulos dos anticorpos (IgM, IgG e IgA) séricos anti-PGL-1 comparados entre si (Gráfico 6, teste de Friedman, $p < 0,0001$). Dessa forma, o teste de múltiplas comparações Dunn mostrou que há diferenças entre os títulos dos isotipos IgM e IgG, IgM e IgA, mas não entre IgG e IgA ($p < 0,0001$, $p < 0,0001$ e $p = 0,4068$, respectivamente).

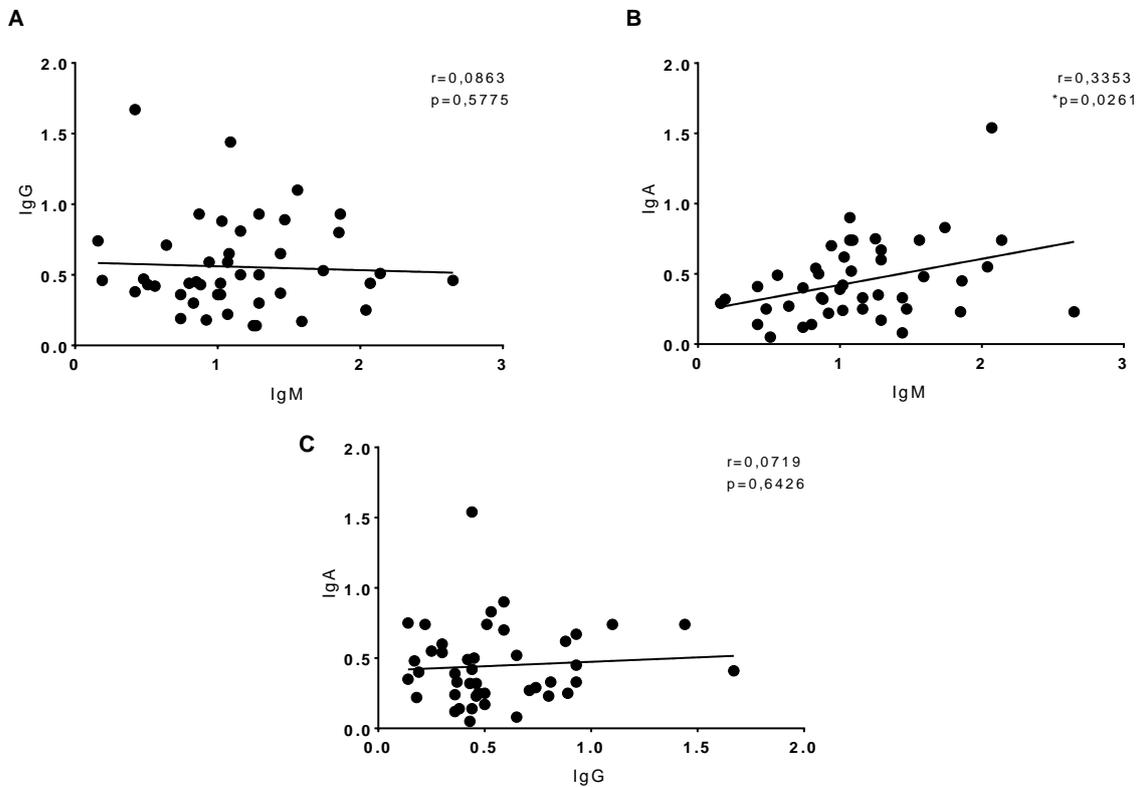
Gráfico 6 – Níveis de anticorpos séricos anti-PGL-1 de contatos, com idade inferior a 15 anos, de pacientes com hanseníase, em amostras coletadas no ano de 2016.



Fonte: Próprio autor (2017). Títulos de anticorpos séricos anti-PGL-1 de contatos (n=44) no ano de 2016. Análise realizada pelo teste de Friedman seguido do pós-teste de múltiplas comparações de Dunn.

Uma correlação positiva baixa foi observada entre os isotipos IgM e IgA. O mesmo não foi observado para os demais isotipos analisados (Gráfico 7).

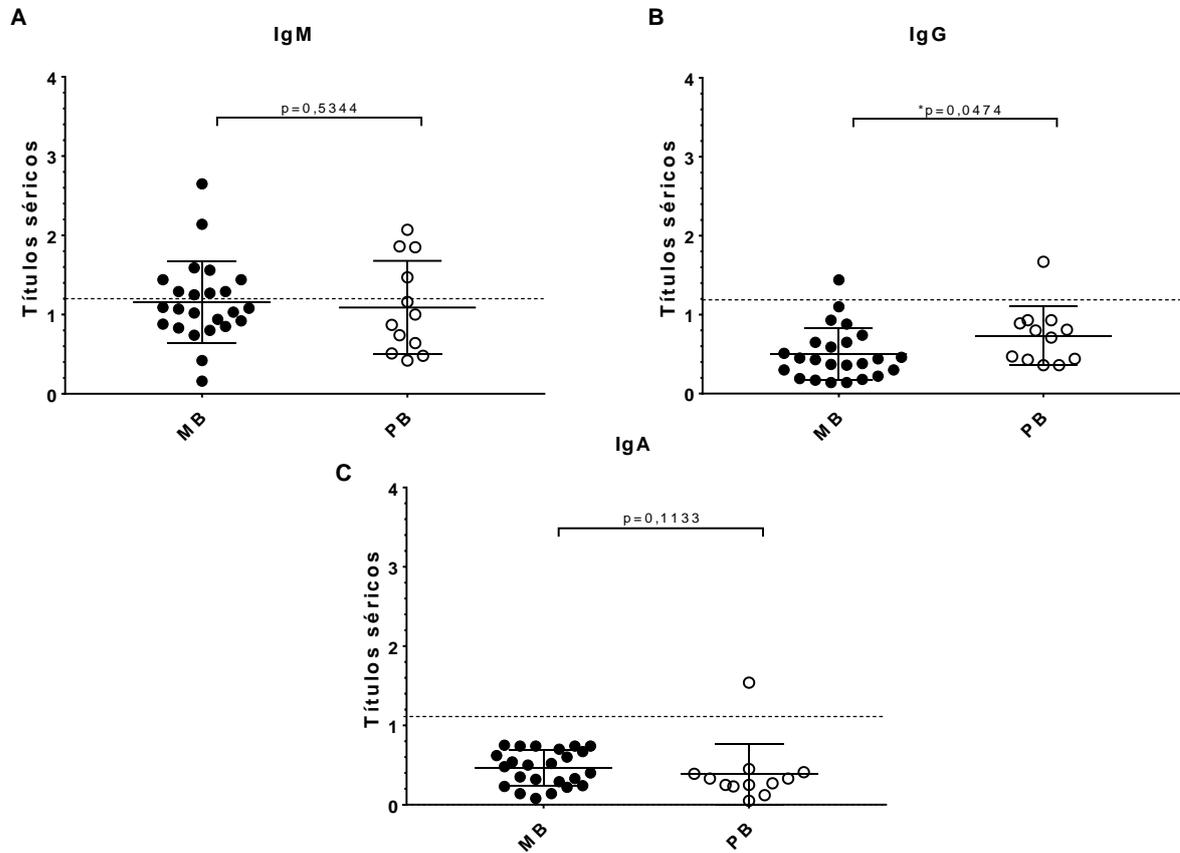
Gráfico 7 – Correlação entre os níveis de anticorpos séricos anti-PGL-1 de contatos, com idade inferior a 15 anos, de pacientes com hanseníase.



Fonte: Próprio autor (2017). Níveis de anticorpos séricos anti-PGL-1 em amostras de contatos (n=44) coletadas no ano de 2016. (A) Correlação entre os isotipos IgM e IgG. (B) Correlação entre os isotipos IgM e IgA. (C) Correlação entre os isotipos IgG e IgA. Análises realizadas pelo teste de correlação de Spearman.

O Gráfico 8 ilustra os níveis de anticorpos séricos anti-PGL-1 dos contatos com relação à forma clínica do caso índice, sendo contatos MB (n=24) e contatos PB (n=12). Pode-se observar que os níveis de IgG (teste de Mann-Whitney, $p=0,0474$) se apresentaram mais elevados em indivíduos que tinham contato com pacientes com a forma clínica paucibacilar. Em relação aos demais isotipos analisados, não houve diferença estatisticamente significativa quanto aos níveis de anticorpos estudados ($p=0,5344$ e $p=0,1133$ para IgM e IgA, respectivamente).

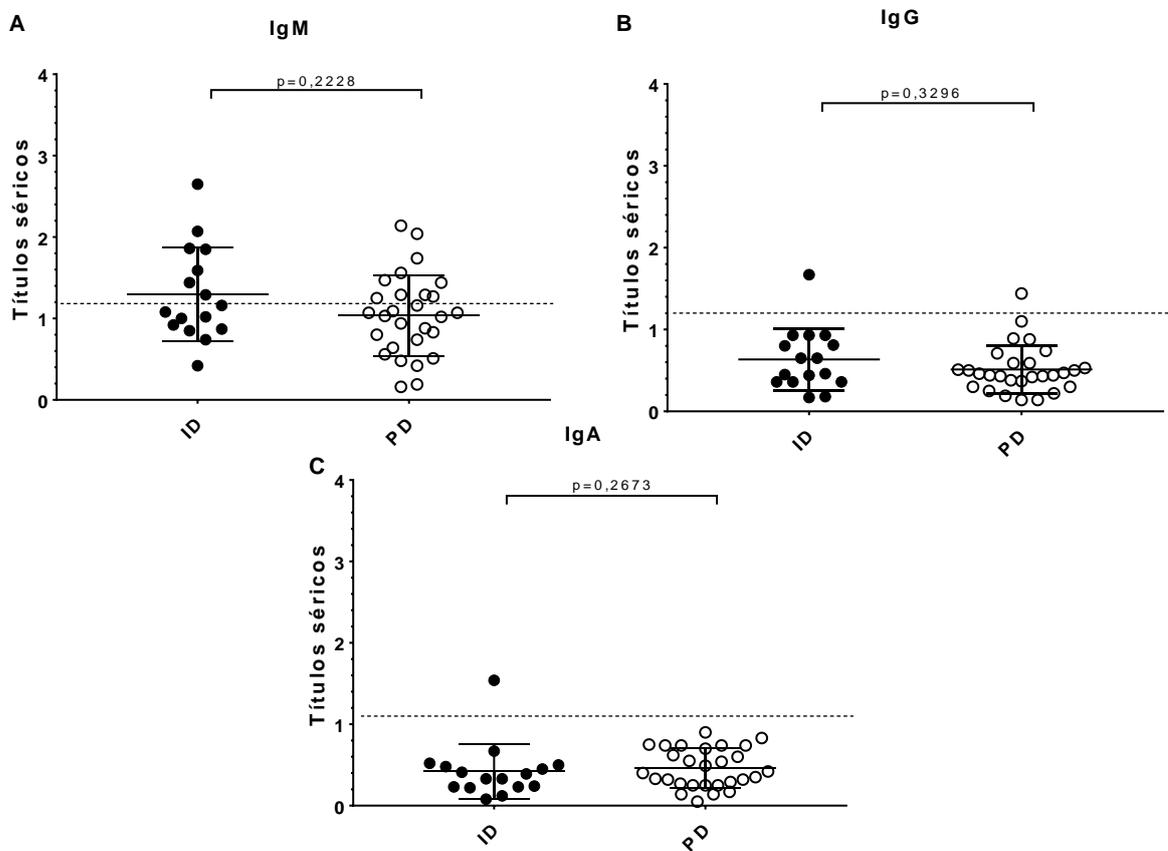
Gráfico 8 – Títulos de anticorpos séricos anti-PGL-1 de contatos em relação à forma clínica no caso índice.



Fonte: Próprio autor (2017). Níveis de anticorpos séricos anti-PGL-1 de contatos multibacilares (contatos MB, n=24) e paucibacilares (contatos PB, n= 12). (A) Níveis de IgM anti-PGL-1. (B) Níveis de IgG anti-PGL-1. (C) Níveis de IgA anti-PGL-1. A linha tracejada indica o *cut-off*, cujos contatos acima dela são considerados positivos e abaixo dela são negativos. Análises realizadas pelo teste de Mann-Whitney.

Como pode ser observado no Gráfico 9, não houve diferença estatística nos títulos de anticorpos séricos anti-PGL-1 quando analisado o domicílio do contato em relação ao caso índice (p=0,1313, p=0,1929 e p=0,4531 para IgM, IgG e IgA, respectivamente).

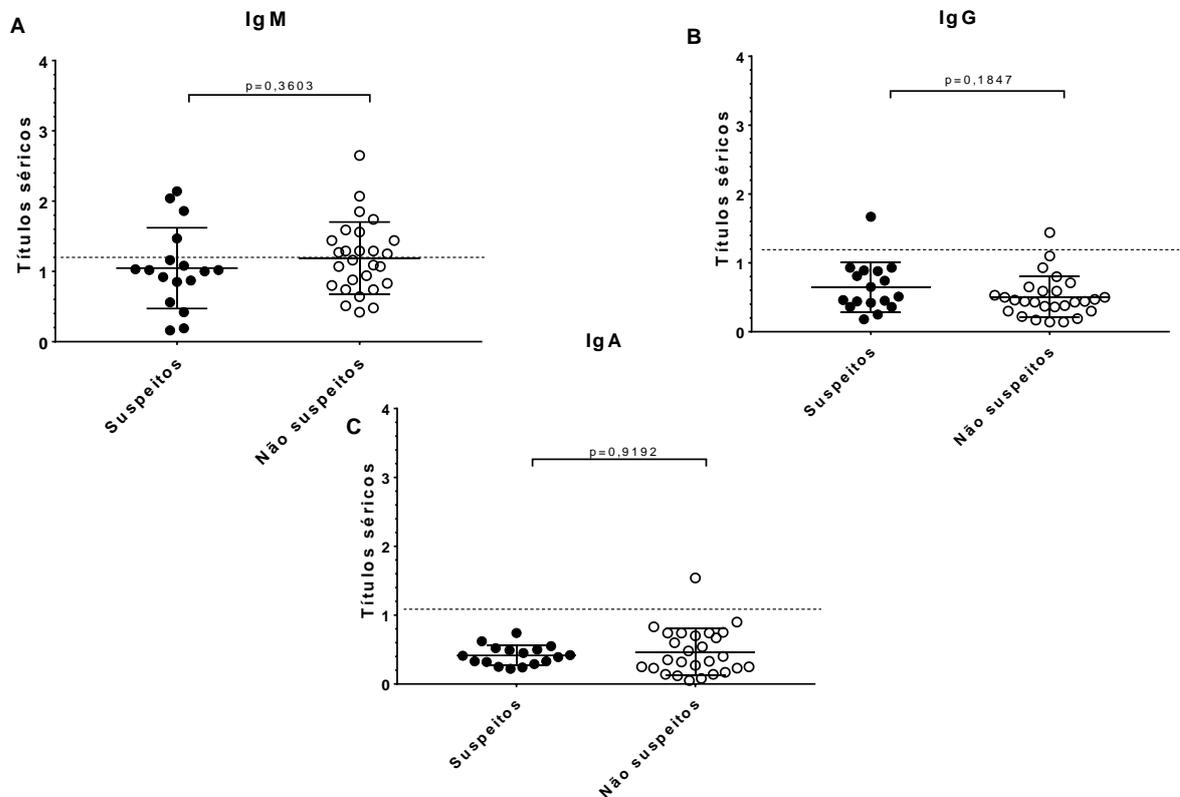
Gráficos 9 – Títulos de anticorpos séricos anti-PGL-1 de contatos de acordo com o domicílio em relação ao caso índice.



Fonte: Próprio autor (2017). Níveis de anticorpos séricos de contatos intradomiciliares (contatos ID, n=16) e peridomiciliares (contatos PD, n=28), em amostras coletadas no ano de 2016. (A) Níveis de IgM anti-PGL-1, (B) Níveis de IgG anti-PGL-1. (C) Níveis de IgA anti-PGL-1. A linha tracejada indica o *cut-off*, cujos contatos acima dela são considerados positivos e abaixo, negativos. As análises foram realizadas por meio do teste de Mann-Whitney.

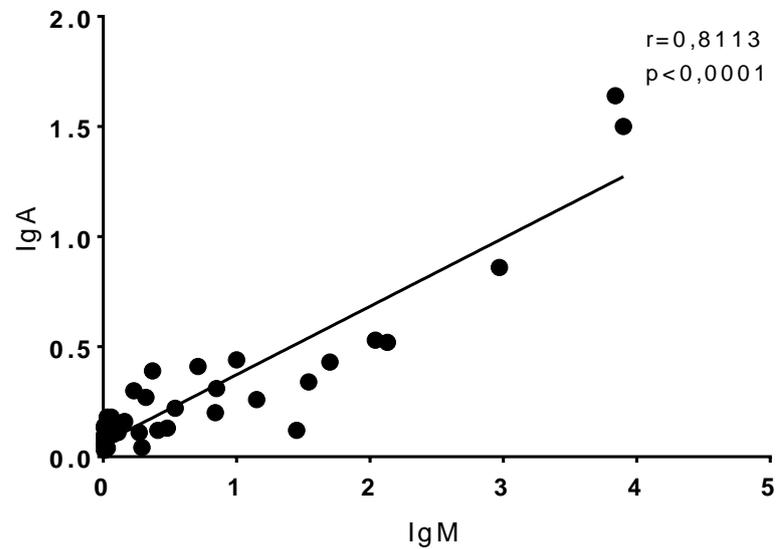
Não foram observadas diferenças estatísticas significativas em nenhum dos isotipos de anticorpos anti-PGL-1 analisados nos grupos de contatos com suspeita da doença e o grupo não suspeito (Gráfico 10. Teste de Mann-Whitney, $p=0,5969$ IgM; $p=0,0746$, IgG e $p=9493$, IgA).

Gráfico 10 – Níveis de anticorpos séricos anti-PGL-1 em contatos com e sem suspeita de doença em amostras coletadas no ano de 2016.



Fonte: Próprio autor (2017). Níveis de anticorpos anti-PGL-1 em contatos com alterações ao exame dermatoneurológico (suspeitos, n=17) e os que não apresentaram alterações ao exame (não suspeitos, n= 27) no ano de 2016. (A) Níveis de IgM anti-PGL-1. (B) Níveis de IgG anti-PGL-1. (C) Níveis de IgA anti-PGL-1. A linha tracejada indica o *cut-off*, cujos contatos acima da linha são considerados positivos e abaixo dela são negativos. As análises foram realizadas por meio do teste de Mann-Whitney.

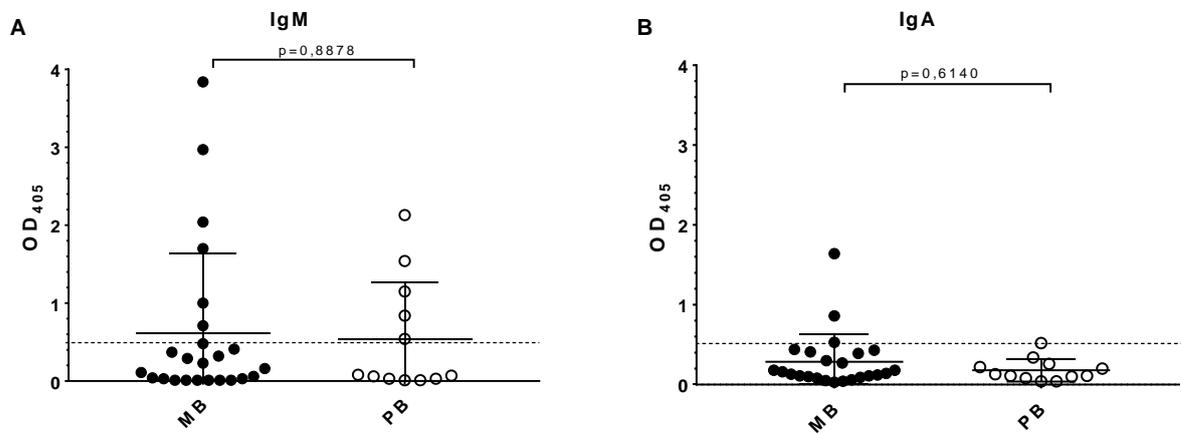
Gráfico 12 – Correlação entre os níveis de anticorpos salivares anti-PGL-1 em amostras de contatos coletadas em 2016.



Fonte: Próprio autor (2017). Níveis de anticorpos salivares anti-PGL-1 em contatos com idade inferior a 15 anos (n=44). Amostras coletadas no ano de 2016. Análises realizadas pelo teste de correlação de Spearman.

Quando comparados os grupos de contatos multibacilares e paucibacilares (Gráfico 13), nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada (teste de Mann-Whitney, $p=0,8878$, para IgM e IgA, $p=0,6140$).

Gráfico 13 – Títulos de anticorpos salivares anti-PGL-1 de contatos em relação à forma clínica no caso índice em amostras coletadas no ano de 2016.

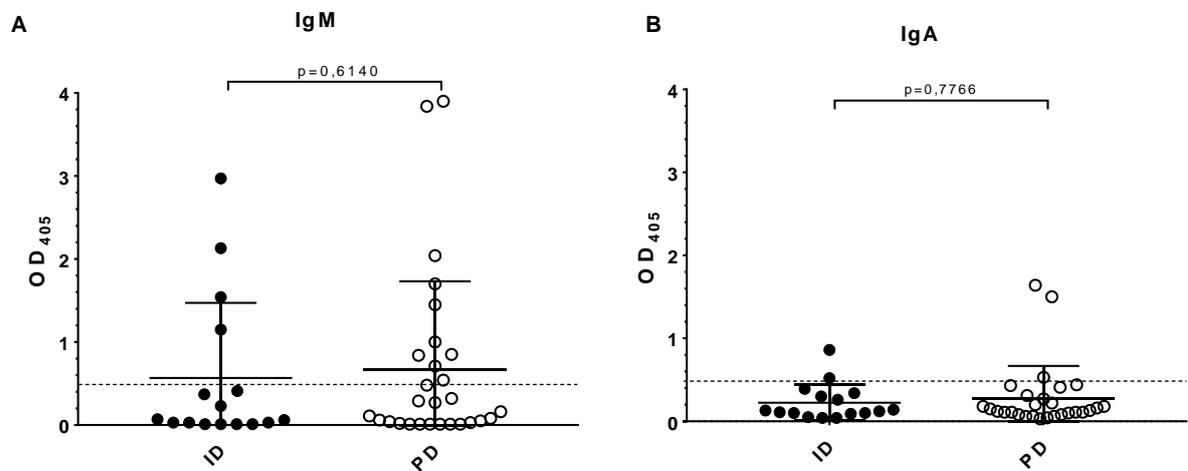


Fonte: Próprio autor (2017). Níveis de anticorpos salivares anti-PGL-1 de contatos multibacilares (contatos MB, n=24) e paucibacilares (contatos PB, n= 12). (A) Níveis de IgM anti-PGL-1. (B) Níveis de IgA anti-PGL-1. A linha tracejada indica o *cut-off*, cujos contatos acima dela são considerados positivos e abaixo dela são negativos. As análises foram realizadas por meio do teste de Mann-Whitney.

Na avaliação dos níveis de anticorpos salivares dos contatos em relação a serem contatos intradomiciliares ou peridomiciliares (Gráfico 14), não foi observada diferença entre os grupos em nenhuma das análises (teste de Wilcoxon: IgM, p=0,6140 e IgA, p=0,7766).

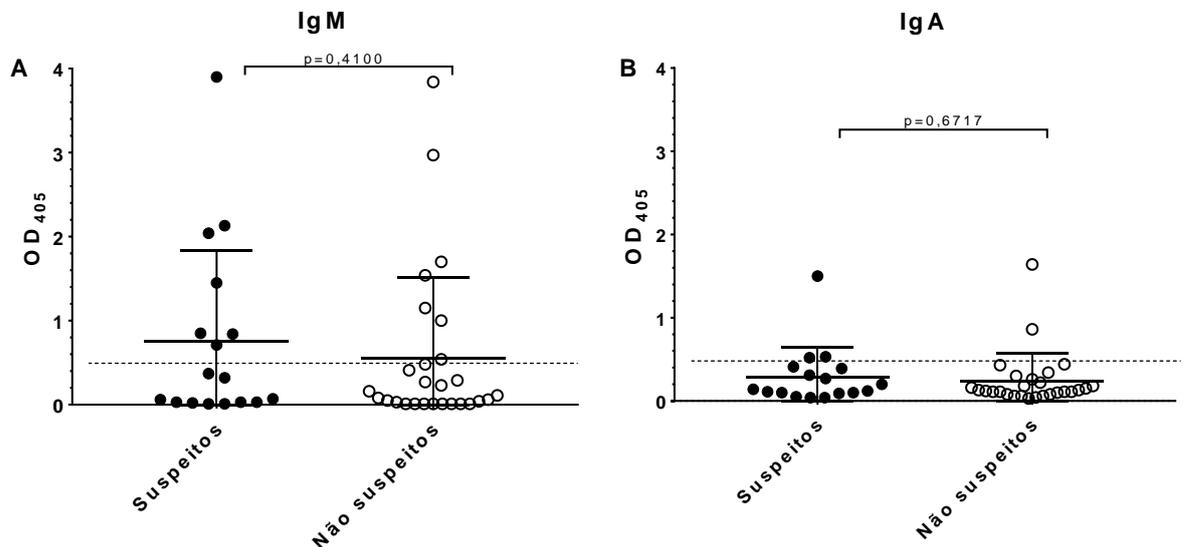
Da mesma forma, não houve diferença significativa nos níveis de anticorpos salivares anti-PGL-1 nos contatos com alguma suspeita indicativa de doença e aqueles que não apresentaram alterações ao exame clínico (Gráfico 15; IgM, p=0,4100 e IgA, p=0,6717).

Gráfico 14 – Títulos de anticorpos salivares anti-PGL-1 de contatos de acordo com o domicílio em relação ao caso índice em amostras coletadas no ano de 2016.



Fonte: Próprio autor (2017). Níveis de anticorpos salivares de contatos intradomiciliares (ID, n=16) e peridomiciliares (PD, n=28), em amostras coletadas no ano de 2016. (A) Níveis de IgM anti-PGL-1, (B) Níveis de IgA anti-PGL-1. A linha tracejada indica o *cut-off*, cujos contatos acima dela são considerados positivos e abaixo, negativos. As análises foram realizadas por meio do teste de Mann-Whitney.

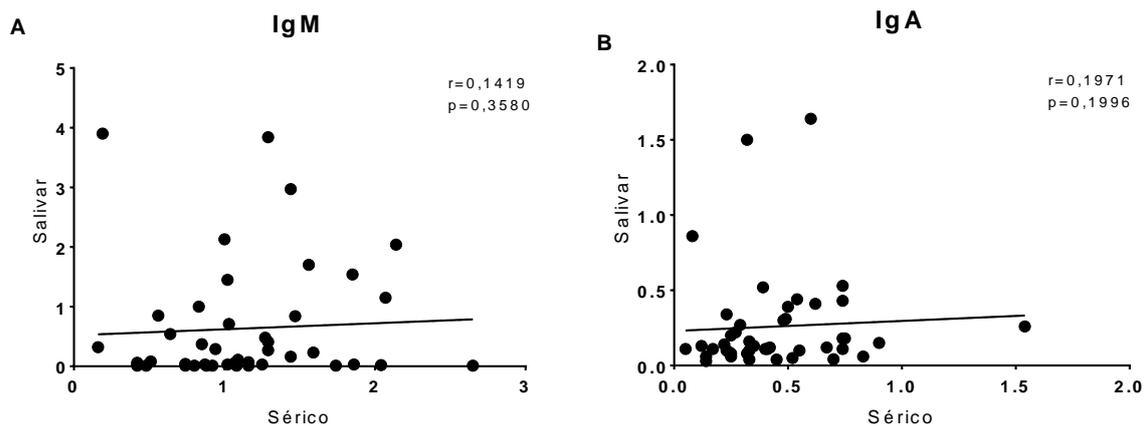
Gráfico 15 – Níveis de anticorpos salivares anti-PGL-1 em contatos com e sem suspeita de doença em amostras coletadas no ano de 2016.



Fonte: Próprio autor (2017). Níveis de anticorpos salivares anti-PGL-1 em contatos com alterações ao exame dermatoneurológico (contatos suspeitos, n=17) e os que não apresentaram alterações ao exame (contatos não suspeitos, n= 27) no ano de 2016. (A) Níveis de IgM anti-PGL-1. (B). Níveis de IgA anti-PGL-1. A linha tracejada indica o *cut-off*, cujos contatos acima da linha são considerados positivos e abaixo dela são negativos.

Não foi observada correlação significativa entre os níveis séricos e salivares de anticorpos anti-PGL-1 de amostras coletadas no ano de 2016 (Gráfico 16. Coeficiente de correlação de Spearman: IgM, $r=0,1419$, $p=0,3580$; IgA, $r=0,1971$, $p=0,1996$)

Gráfico 16 – Correlação entre os níveis séricos e salivares dos anticorpos anti-PGL-1 em amostras coletadas no ano de 2016.



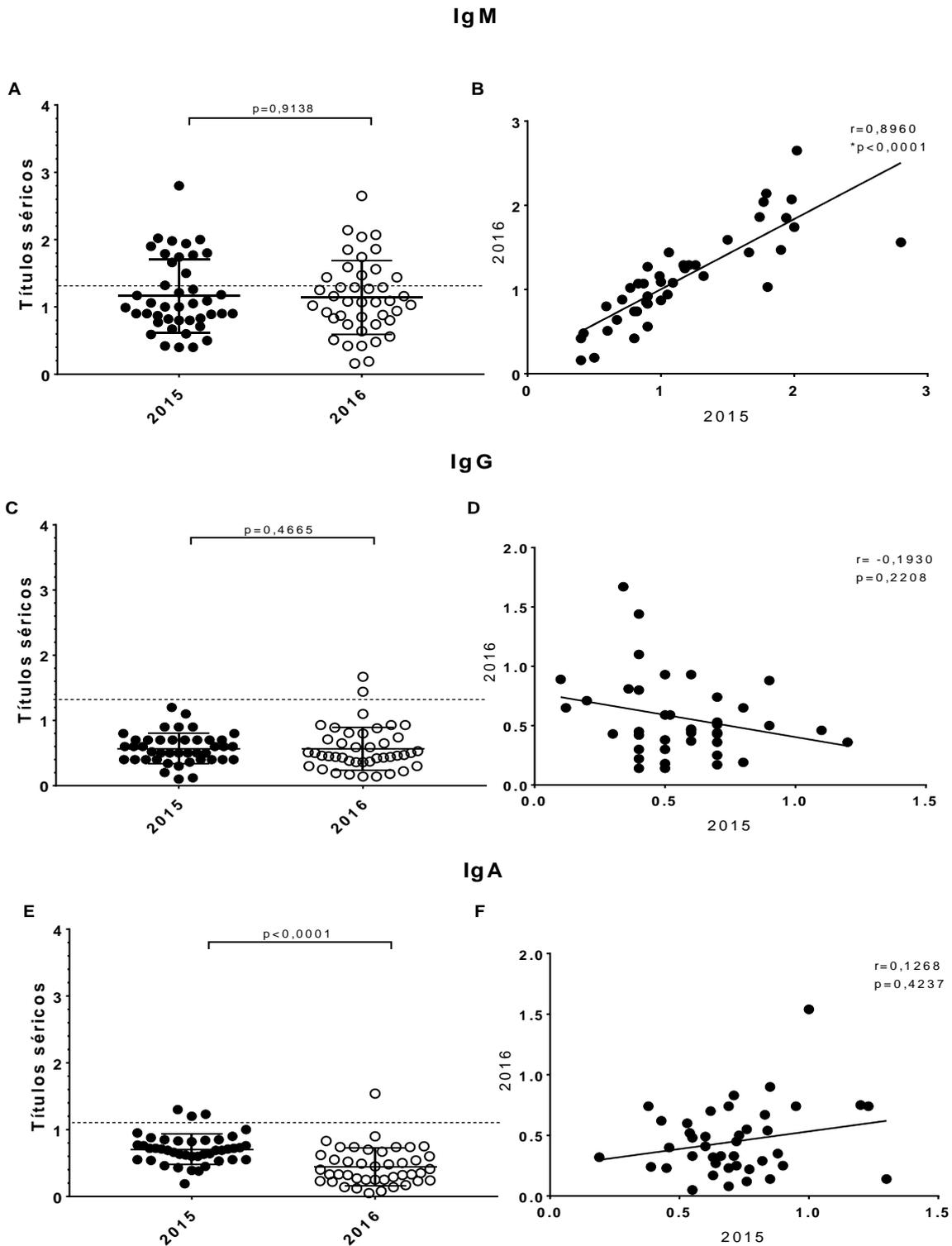
Fonte: Próprio autor (2017). Correlação entre os níveis séricos e salivares de (A) IgM anti-PGL-1 ($n=42$) e (B) IgA anti-PGL-1 ($n=42$) de amostras de contatos coletadas no ano de 2016. Análise realizada pelo Coeficiente de correlação de Spearman.

6.2.3 Comportamento dos níveis de anticorpos séricos anti-PGL-1 em amostras coletadas nos anos 2015 e 2016.

Dos 68 contatos que participaram do estudo, 42 foram avaliados nos anos 2015 e 2016, sendo possível avaliá-los quanto aos níveis de anticorpos anti-PGL-1 séricos.

Os títulos de IgA sérica, de uma maneira geral, se apresentaram mais elevados no ano de 2015, quando comparados aos níveis detectados em 2016 (Gráfico 17. Teste de Wilcoxon, $p<0,0001$), ao contrário dos demais isotipos analisados (IgM, $p=0,9187$ e IgG, $p=0,1639$). Foi possível observar, uma correlação positiva alta entre os níveis de IgM sérica anti-PGL-1 (coeficiente de correlação de Spearman, $r=0,8960$, $p<0,0001$) entre os anos de 2015 e 2016. O mesmo não ocorreu para os isotipos IgG ($r=-0,1930$, $p<0,2208$) e IgA ($r=0,1268$, $p<0,4237$).

Gráfico 17 – Avaliação do isotipo IgM sérico anti-PGL-1 de amostras de contatos coletadas nos anos de 2015 e 2016.



Fonte: Próprio autor (2017). Títulos séricos de (A) IgM anti-PGL-1, (C) IgG anti-PGL-1 e (E) IgA de amostras de contatos ($n=42$) coletadas nos anos de 2015 e 2016 (teste de Wilcoxon). Correlação entre os níveis séricos de (B) IgM anti-PGL-1, (D) IgG anti-PGL-1 e (F) IgA anti-PGL-1 (Coeficiente de correlação de Spearman). A linha tracejada indica o *cut-off*, cujos contatos acima da linha são considerados positivos e abaixo dela são negativos.

Tabela 4 – Contatos passíveis de acompanhamento.

Contato	Idade	Sexo	Domicílio	Forma Clínica	Suspeito	2015			2016				
						Soro			Soro			Saliva	
						IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	IgM	IgA
RL_012	9	F	ID	MB	N	1,66	0,12	0,69	1,44	0,65	0,08	2,97	0,86
RL_021	9	F	ID	PB	N	1,98	0,6	1	2,07	0,44	1,54	1,15	0,206
RL_039	8	M	PD	-	S	0,5	0,6	0,63	0,19	0,46	0,32	3,9	1,5
RL_053	5	F	PD	MB	N	1,21	0,5	0,53	1,29	0,30	0,60	3,84	1,64
RL_054	8	F	PD	MB	N	2,8	0,4	1,23	1,56	1,10	0,74	1,7	0,430
RL_055	10	F	PD	MB	S	1,79	0,7	0,38	2,14	0,51	0,74	2,04	0,53

Fonte: Próprio autor (2017). Legenda: Feminino (F); Masculino (M); Intradomiciliar (ID); Peridomiciliar (PD). Multibacilar (MB); Paucibacilar (PB); Sim (S); Não (N). Valores em negrito indicam títulos positivos de anticorpos anti-PGL-1.

Na Tabela 4 pode-se observar seis contatos que apresentaram IgM e IgA, salivar e/ou sérica.

7 DISCUSSÃO

A detecção precoce e o tratamento dos novos casos de hanseníase são a chave para a eliminação da hanseníase. Para que isso seja possível, a busca ativa de novos casos e a investigação de contatos de pacientes já diagnosticados se tornou uma estratégia fundamental na interrupção da cadeia de transmissão da hanseníase (OMS, 2017). Nos últimos anos, cada vez mais estudos buscam avaliar esses contatos de várias formas no intuito de detectar a doença o mais cedo possível, evitando, portanto, que mais pessoas possam vir a sofrer de incapacidades físicas em decorrência da hanseníase (CABRAL *et al.*, 2013; CARVALHO *et al.*, 2015; FABRI *et al.*, 2015; WAMBIER *et al.*, 2016; CUNHA *et al.*, 2017; RICHARDUS *et al.*, 2017).

Pelo fato da hanseníase ser uma doença que necessita de um longo tempo de exposição ao bacilo para que haja adoecimento, altos índices de detecção em indivíduos com idade inferior a 15 anos não revelam um bom prognóstico, visto que esse dado mostra que há transmissão ativa dentro da comunidade. Tal fato pode estar relacionado a medidas de controle epidemiológico ineficazes.

Barreto *et al.* (2014), concluíram que a não só indivíduos que mantêm o contato dentro do mesmo domicílio que o caso índice tem risco de desenvolver a doença, mas também contatos peridomiciliares. Esse risco diminui à medida que a distância da residência do contato peridomiciliar aumenta em relação à residência do caso índice. Por este fato, a investigação não deve se restringir aos contatos do mesmo domicílio.

Em estudo realizado no município de Duque de Caxias, Rio de Janeiro, no qual foi avaliada a soropositividade, utilizando um teste rápido para detecção de anticorpos séricos IgM anti-PGL-1, de contatos de pacientes com hanseníase, Calado *et al.* (2005) concluíram que a investigação dos contatos intradomiciliares e peridomiciliares deve ser realizada de maneira igual, haja vista que contatos fora do domicílio do caso índice também tem chance de adoecer.

Durães *et al.* (2010), em estudo epidemiológico, concluíram que contatos intradomiciliares tem maior risco de evoluir para doença, achado semelhante ao que foi observado no presente estudo.

A maioria dos estudos utiliza como instrumento de avaliação a pesquisa de anticorpos IgM séricos anti-PGL-1 (; ARAUJO *et al.*, 2015; BARRETO *et al.*, 2015; CARVALHO *et al.*, 2015;

FABRI *et al.*, 2015; PENNA *et al.*, 2016; WAMBIER *et al.*, 2016; RICHARDUS *et al.*, 2017), pelo fato do isotipo IgM indicar exposição recente ao bacilo e altos índices estarem associados a um maior risco de desenvolver hanseníase, principalmente contatos de pacientes com a forma multibacilar da doença (; ARAUJO *et al.*, 2015; WAMBIER *et al.*, 2016; CUNHA *et al.*, 2017).

Em nosso estudo, contatos intradomiciliares apresentaram níveis mais altos de IgM sérica anti-PGL-1. Tal fato é justificado pela maior exposição a qual o contato é submetido, e pode ser agravado se o caso índice apresentar a forma multibacilar da hanseníase. Informação que está de acordo com achado de outros autores (BARRETO *et al.*, 2014; BARRETO *et al.*, 2015; CUNHA *et al.*, 2017).

Em um estudo prospectivo no qual 2.992 contatos de pacientes de hanseníase foram acompanhados e analisados quanto a diversos fatores, dentre eles os níveis de anti-PGL-1, mostrou que indivíduos que apresentaram títulos positivos de IgM anti-PGL-1 tem um risco 5 vezes maior de evoluir para doença quando comparados a indivíduos com baixos títulos (ARAUJO *et al.*, 2015).

Por sua característica lipídica, a molécula de PGL-1 tende a induzir a produção do isotipo IgM, haja vista que moléculas dessa natureza são processadas e reconhecidas por mecanismos independentes de linfócitos T (MESQUITA JÚNIOR *et al.*, 2010). Entretanto, os isotipos IgG e IgA anti-PGL-1 foram detectados em pacientes com hanseníase (CABRAL *et al.*, 2013; DE MACEDO *et al.*, 2017).

Estudos com anticorpos IgA anti-PGL-1 são poucos na literatura. Foi descrito pela primeira vez por Schwerer *et al.* (1989). IgA tem um grande potencial de ser um biomarcador na avaliação de contatos de pacientes com hanseníase, visto que De Macedo *et al.* (2017), em estudo realizado com pacientes diagnosticados com hanseníase, concluíram que anticorpos séricos IgA anti-PGL-1 podem ser um importante parâmetro de avaliação complementar, se utilizado em conjunto com IgM sérica anti-PGL-1. Esses dois isotipos mostraram ter uma correlação positiva alta (Coeficiente de correlação de Spearman $r=0,745$, $p<0,0001$). Esse dado corrobora com os achados de correlação, em amostras coletadas no ano de 2016, entre IgM e IgA séricas anti-PGL-1, mesmo que baixa, apresentaram correlação positiva (Coeficiente de correlação de Spearman $r=0,3353$, $p<0,0261$). O mesmo não foi observado com amostras coletadas no ano de 2015.

Neste mesmo trabalho, De Macedo *et al.* (2017) correlacionam os isotipos IgA, IgG e IgM séricos anti-PGL-1. Em pacientes, todos os isotipos de anticorpos séricos apresentaram correlações positivas. O mesmo não foi encontrado no presente estudo.

Os níveis de IgG sérica anti-PGL-1, de acordo com Cabral *et al.* (2013), deverão ser determinados em contatos, juntamente com outros parâmetros sorológicos, como a IgM sérica anti-PGL-1. Muitos indivíduos apresentarão níveis altos de IgM no soro, mas poucos irão produzir IgG. Indivíduos os quais tem soropositividade para os dois isotipos deverão ser acompanhados anualmente, apesar do isotipo IgA se mostrar mais eficaz quando comparado à IgG (DE MACEDO *et al.*, 2017).

No presente estudo, os títulos de IgG sérica anti-PGL-1 se mostraram mais elevados, em amostras coletadas no ano de 2015, em contatos de pacientes MB, fato não observado em amostras coletadas no ano de 2016, que mostraram que os níveis de IgG sérica estão mais elevados em contatos de pacientes PB. Essa controvérsia pode estar relacionada ao número reduzido de contatos avaliados no ano de 2016 (4) quando comparado ao número de contatos avaliados no ano de 2015 (66).

A avaliação de anticorpos salivares tem o intuito de avaliar a primeira resposta imune à exposição ao bacilo. Estudos mostram que anticorpos salivares são candidatos em potencial para a avaliação de transmissão na comunidade e conseqüentemente na identificação da infecção subclínica (NAGAO-DIAS *et al.*, 2007; CABRAL *et al.*, 2013; MACEDO *et al.*, 2017). O presente estudo mostrou que os níveis de IgM e IgA salivares anti-PGL-1 apresentaram correlação positiva forte. Resultado semelhante foi observado no estudo de Cabral *et al.* (2013).

Seis contatos apresentaram marcadores sorológicos, IgM e IgA, séricos e/ou salivares alterados simultaneamente. Nós recomendamos fortemente que esses contatos sejam avaliados anualmente, visto que o risco de evoluir para doença é maior quando comparado a contatos que não apresentam esses marcadores alterados.

Este trabalho contém algumas limitações, contudo, não invalidam os resultados obtidos. A falta de apoio logístico para realização de uma nova avaliação dos contatos e coleta de amostras, no ano de 2017, o que totalizaria 3 anos de acompanhamento, foi a limitação de maior impacto. Como relatado em outros estudos, características inerentes à doença, como ausência de letalidade imediata e poucas opções de profilaxia, podem favorecer o desinteresse

da população. Desta forma, houve uma perda, em 2016, de 38,2% (26 contatos) dos 68 contatos avaliados inicialmente no ano de 2015. O método escolhido para analisar os resultados foi utilizado visando diminuir as perdas, aumentando assim o número de indivíduos incluídos no estudo. Outra limitação é o fato de, na análise realizada, não tenham sido incluídos pacientes diagnosticados com hanseníase, visto que os parâmetros de comparação se restringem aos contatos.

O fato de não ter sido possível determinar os níveis de anticorpos anti-PGL-1 nas amostras coletadas em 2015, devido à demora na realização das análises, também pode ser caracterizado como um fator limitante. O comportamento dos anticorpos salivares ao longo dos anos do estudo não pôde ser observado.

Estudos mais longos são necessários a fim de que se possa avaliar de forma concisa o risco que contatos de pacientes com hanseníase correm e a probabilidade de evoluir para doença, e quais fatores estão associados a esse risco.

8 CONCLUSÕES

- Com a avaliação dermatoneurológica dos contatos, foi possível identificar contatos com manchas suspeitas, permitindo assim a análise de grupos com suspeição de doença. Entretanto, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada.
- Os níveis de anticorpos salivares IgM e IgA anti-PGL-1 mostraram-se úteis parâmetros de exposição, apresentando boa correlação. Sua presença em níveis elevados em amostras de contatos sugere o acompanhamento dos mesmos devido tendo em vista a probabilidade de evolução para doença.
- Quanto aos anticorpos séricos, IgM se apresentou em níveis mais altos, evidenciando que há transmissão ativa na comunidade. IgG apresentou resultados controversos com relação à forma clínica do caso índice, mostrando um comportamento duvidoso na investigação dos contatos. O isotipo IgA apresentou uma melhor performance quando comparado à IgG.
- Nenhuma correlação foi observada entre os níveis de anticorpos séricos e salivares.
- Quanto ao comportamento dos anticorpos séricos, quando comparados os anos de 2015 e 2016, o isotipo IgM se apresentou de maneira uniforme, mostrando uma boa

correlação entre os níveis detectados em 2015 e os detectados em 2016. O mesmo não se observou nos demais isotipos.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar das limitações por falta de apoio logístico no local do estudo, foi possível realizar as avaliações dermatoneurológicas dos contatos de pacientes com hanseníase nos anos de 2015 e 2016.

Sugerimos fortemente que os contatos cujos parâmetros sorológicos ou salivares, IgA e IgM anti-PGL-1 estejam alterados simultaneamente, sejam investigados com uma frequência mínima anual, pelo risco de adoecimento.

Posteriormente, será realizada a detecção do DNA do *Mycobacterium leprae* em amostras de sangue total e mucosa nasal dos contatos avaliados neste estudo. Com isso, deve-se ter um melhor entendimento da dinâmica de infecção do bacilo. Desta forma, espera-se que se possa atuar de forma mais no controle epidemiológico da doença.

10 REFÊRENCIAS

ARAÚJO, M. G. Hanseníase no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 373-382, 2003.

ARAÚJO, S. et al. Molecular Evidence for the Aerial Route of Infection of Mycobacterium leprae and the Role of Asymptomatic Carriers in the Persistence of Leprosy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 63, n. 11, p. 1412-1420, 2016. ISSN 1058-4838. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/cid/ciw570> >.

ARAÚJO, S. et al. Risk-benefit assessment of Bacillus Calmette-Guérin vaccination, anti-phenolic glycolipid I serology, and Mitsuda test response: 10-year follow-up of household contacts of leprosy patients. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, p. 739-745, 2015. ISSN 0037-8682. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822015000600739&nrm=iso >.

BARRETO, J. G. et al. Spatial epidemiology and serologic cohorts increase the early detection of leprosy. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 527, 2015/11/16 2015. ISSN 1471-2334. Disponível em: < <https://doi.org/10.1186/s12879-015-1254-8> >.

BARRETO, J. G. et al. Spatial Analysis Spotlighting Early Childhood Leprosy Transmission in a Hyperendemic Municipality of the Brazilian Amazon Region. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 2, p. e2665, 2014. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002665> >.

BRANDTZAEG, P. Mucosal Immunity: Induction, Dissemination, and Effector Functions. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 70, n. 6, p. 505-515, 2009. ISSN 1365-3083. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3083.2009.02319.x> >.

BRASIL. **Diretrizes para vigilância, atenção e eliminação da hanseníase como problema de saúde pública.**: Ministério da Saúde: 58 p. 2016.

_____. Indicadores epidemiológicos - Hanseníase. Sala de Apoio e Gestão Estratégica, 29/11/2016 2017a. Disponível em: < <http://sage.saude.gov.br/#> >. Acesso em: 20/12/2016.

_____. **Indicadores epidemiológicos e operacionais de hanseníase. Brasil, 2001-2016.** SINAN: Ministério da Saúde 2017b.

BRASIL, M. T. L. R. F. et al. Sorologia Anti PGL-1 e risco de ocorrência de hanseníase em área de alta endemicidade do Estado de São Paulo: quatro anos de seguimento. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 6, p. 262-271, 2003. ISSN 1415-790X. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-790X2003000300010&nrm=iso >.

BRATSCHI, M. W. et al. Current knowledge on Mycobacterium leprae transmission: a systematic literature review. **Lepr Rev**, v. 86, n. 2, p. 142-55, Jun 2015. ISSN 0305-7518 (Print) 0305-7518.

BRETT, S. J. et al. Serological activity of a characteristic phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae* in sera from patients with leprosy and tuberculosis. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 52, n. 2, p. 271-279, 1983. ISSN 0009-9104 1365-2249. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1535852/> >.

CABRAL, P. B. E. et al. Anti-PGL1 salivary IgA/IgM, serum IgG/IgM, and nasal *Mycobacterium leprae* DNA in individuals with household contact with leprosy. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 11, p. e1005-e1010, 2013. ISSN 1201-9712. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2013.05.011> >. Acesso em: 2018/01/04.

CALADO, K. L. S. et al. Positividade sorológica antiPGL-I em contatos domiciliares e peridomiciliares de hanseníase em área urbana. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 80, p. S301-S306, 2005. ISSN 0365-0596. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-05962005001000007&nrm=iso >.

CARVALHO, A. P. M. et al. Factors associated with anti-phenolic glycolipid-I seropositivity among the household contacts of leprosy cases. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 219, 2015/05/30 2015. ISSN 1471-2334. Disponível em: < <https://doi.org/10.1186/s12879-015-0955-3> >.

CUNHA, M. H. C. M. D. et al. Fatores de risco em contatos intradomiciliares de pacientes com hanseníase utilizando variáveis clínicas, sociodemográficas e laboratoriais. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 8, p. 21-28, 2017. ISSN 2176-6223. Disponível em: < http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232017000200021&nrm=iso >.

DE MACEDO, A. C. et al. Serum anti-phenolic glycolipid-1 IgA correlates to IgM isotype in leprosy patients: a possible candidate for seroepidemiological surveys? , Jun 8 2017. ISSN 0887-8013.

DURÃES, S. M. B. et al. Estudo epidemiológico de 107 focos familiares de hanseníase no município de Duque de Caxias - Rio de Janeiro, Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, p. 339-345, 2010. ISSN 0365-0596. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-05962010000300007&nrm=iso >.

EIDT, L. M. Breve história da hanseníase: sua expansão do mundo para as Américas, o Brasil e o Rio Grande do Sul e sua trajetória na saúde pública brasileira. **Saúde e Sociedade**, v. 13, p. 76-88, 2004. ISSN 0104-1290. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-12902004000200008&nrm=iso >.

FABRI, A. D. C. O. C. et al. Antigen-specific assessment of the immunological status of various groups in a leprosy endemic region. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 218, 2015/05/30 2015. ISSN 1471-2334. Disponível em: < <https://doi.org/10.1186/s12879-015-0962-4> >.

FRADE, M. A. C.; FOSS, N. T. Editorial Commentary: Evidences of Aerial Route of Mycobacterium leprae Infection and Doubts About Transmission and Natural Protection in Leprosy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 63, n. 11, p. 1421-1422, 2016. ISSN 1058-4838. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/cid/ciw577> >.

GOULART, I. M. B. et al. Asymptomatic Leprosy Infection among Blood Donors May Predict Disease Development and Suggests a Potential Mode of Transmission. **Journal of Clinical Microbiology**, 1752 N St., N.W., Washington, DC, v. 53, n. 10, p. 3345-3348, 2015. ISSN 0095-1137 1098-660X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4572540/> >.

GOULART, I. M. B.; PENNA, G. O.; CUNHA, G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao Mycobacterium leprae. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, p. 365-375, 2002.

GRZYBOWSKI, A. et al. Gerhard Henrik Armauer Hansen (1841-1912)—The 100th anniversary of the death of the discoverer of Mycobacterium leprae. **Clinics in Dermatology**, v. 31, n. 5, p. 653-655, 2013/09/01/ 2013. ISSN 0738-081X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0738081X12002428> >.

HOLANDA, M. V. D. **Detecção e quantificação de mycobacterium leprae pela técnica de pcr em tempo real em amostras ambientais de municípios do Ceará**. 2015. 87 Dissertação (Mestrado). Departamento de Patologia e Medicina Legal, Universidade Federal do Ceará

HUNTER, S. W.; BRENNAN, P. J. A novel phenolic glycolipid from Mycobacterium leprae possibly involved in immunogenicity and pathogenicity. **Journal of Bacteriology**, v. 147, n. 3, p. 728-735, 1981. ISSN 0021-9193 1098-5530. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC216107/> >.

KIRSZTAJN, G. M. et al. Specific and nonspecific aspects of humoral immune response in leprosy. **Braz J Med Biol Res**, v. 27, n. 1, p. 43-54, Jan 1994. ISSN 0100-879X (Print) 0100-879x.

LASTÓRIA, J. C.; ABREU, M. A. M. M. D. Leprosy: a review of laboratory and therapeutic aspects - Part 2. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 89, p. 389-401, 2014a. ISSN 0365-0596. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-05962014000300389&nrm=iso >.

_____. Leprosy: review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects - Part 1. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 89, p. 205-218, 2014b. ISSN 0365-0596. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-05962014000200205&nrm=iso >.

MACEDO, A. C. D. et al. Salivary anti-PGL-1 IgM may indicate active transmission of Mycobacterium leprae among young people under 16 years of age. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 21, p. 557-561, 2017. ISSN 1413-8670. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-86702017000500557&nrm=iso >.

MADIGAN, C. A. et al. A Macrophage Response to Mycobacterium leprae Phenolic Glycolipid Initiates Nerve Damage in Leprosy. **Cell**, v. 170, n. 5, p. 973-985.e10, 2017/08/24/2017. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867417308668> >.

MESQUITA JÚNIOR, D. et al. Sistema imunitário - parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, p. 552-580, 2010. ISSN 0482-5004. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0482-50042010000500008&nrm=iso >.

MOHANTY, P. S. et al. Viability of Mycobacterium leprae in the environment and its role in leprosy dissemination. **Indian J Dermatol Venereol Leprol**, v. 82, n. 1, p. 23-7, Jan-Feb 2016. ISSN 0378-6323.

MUKAKA, M. M. A guide to appropriate use of Correlation coefficient in medical research. **Malawi Medical Journal : The Journal of Medical Association of Malawi**, Malawi, v. 24, n. 3, p. 69-71, 2012. ISSN 1995-7262 1995-7270. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3576830/> >.

NAGAO-DIAS, A. T. et al. 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. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 11, p. 215-219, 2007. ISSN 1413-8670. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-86702007000200009&nrm=iso >.

NG, V. et al. Role of the Cell Wall Phenolic Glycolipid-1 in the Peripheral Nerve Predilection of Mycobacterium leprae. **Cell**, v. 103, n. 3, p. 511-524, 2000. ISSN 0092-8674. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00142-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00142-2) >. Acesso em: 2018/01/04.

OMS. Global leprosy update, 2016: accelerating reduction of disease burden. **Weekly epidemiological record**, v. 35, n. 92, p. 501-520, 2017. Disponível em: < <http://www.who.int/wer/2017/wer9235/en/> >.

PENNA, M. L. F. et al. Anti-PGL-1 Positivity as a Risk Marker for the Development of Leprosy among Contacts of Leprosy Cases: Systematic Review and Meta-analysis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 5, p. e0004703, 2016. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004703> >.

RICHARDUS, R. A. et al. Longitudinal assessment of anti-PGL-I serology in contacts of leprosy patients in Bangladesh. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 12, p. e0006083, 2017. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006083> >.

SADHU, S. et al. Reciprocity between Regulatory T Cells and Th17 Cells: Relevance to Polarized Immunity in Leprosy. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 1, p. e0004338, 2016. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004338> >.

SCHERR, N.; NGUYEN, L. Mycobacterium versus Streptomyces—we are different, we are the same. **Current Opinion in Microbiology**, v. 12, n. 6, p. 699-707, 2009/12/01/ 2009. ISSN

1369-5274. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527409001532>>.

SCHWERER, B. et al. IgA antibodies against phenolic glycolipid I from *Mycobacterium leprae* in serum of leprosy patients and contacts: Subclass distribution and relation to disease activity. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 53, n. 2, p. 202-211, 1989/11/01/1989. ISSN 0090-1229. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0090122989900500>>.

SCOLLARD, D. M. et al. The continuing challenges of leprosy. **Clin Microbiol Rev**, v. 19, n. 2, p. 338-81, Apr 2006. ISSN 0893-8512 (Print) 0893-8512.

SPENCER, J. S.; BRENNAN, P. J. The role of *Mycobacterium leprae* phenolic glycolipid I (PGL-I) in serodiagnosis and in the pathogenesis of leprosy. **Lepr Rev**, v. 82, n. 4, p. 344-57, Dec 2011. ISSN 0305-7518 (Print) 0305-7518.

TORRES, P. 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**, v. 74, n. 1, p. 18-30, Mar 2003. ISSN 0305-7518 (Print) 0305-7518.

WAMBIER, C. G. et al. Factors associated with seropositivity for APGL-I among household contacts of leprosy patients. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, p. 83-89, 2016. ISSN 0037-8682. Disponível em: <
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822016000100083&nrm=iso>.

ANEXO I – PARECER DO CEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
CEARÁ/ PROPESQ



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Detecção precoce de casos de hanseníase entre jovens abaixo de 15 anos de idade residentes em municípios de Alagoas e Itaitinga, CE.

Pesquisador: Aparecida Tiemi Nagao Dias

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 11709213.9.0000.5054

Instituição Proponente: Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 532.850

Data da Relatoria: 18/02/2014

Apresentação do Projeto:

o presente projeto visa realizar um estudo prospectivo a partir de contatos abaixo de 15 anos de idade, durante dois anos a partir do ingresso no projeto, com objetivo de se associar os parâmetros imunológicos e/ou moleculares com o risco de desenvolvimento da doença. A escolha dos municípios foi feita com base em apoio técnico e logístico oferecido pelos serviços de saúde locais.

Objetivo da Pesquisa:

Geral: Avaliar o risco de aquisição da doença entre contatos de portadores de hanseníase abaixo de 15 anos de idade através de parâmetros clínicos, imunológicos e moleculares diagnosticados nos últimos três anos em municípios de Alagoas e em Itaitinga, CE.

Específicos: Avaliar o perfil clínico e demográfico dos casos de hanseníase nos municípios diagnosticados nos últimos três anos nos municípios; Realizar exame dermatoneurológico nos contatos intradomiciliares abaixo de 15 anos de idade dos casos identificados; Avaliar a frequência de positividade de anticorpos séricos IgA, IgG e IgM anti-PGL1 entre os contatos e casos índices; Avaliar a frequência de positividade de anticorpos salivares IgA e IgM anti-PGL1 entre os contatos e casos índices; Avaliar a frequência de positividade de DNA de Mycobacterium leprae em amostras de swab nasal e de sangue dos contatos e casos índices; Avaliar a presença de

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1127

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-270

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

Fax: (85)3223-2903

E-mail: comepe@ufc.br

Continuação do Parecer: 532.850

positividade para *M. lepromatosis* nas amostras positivas de PCR; Realizar seguimento clinico-laboratorial anual dos contatos durante dois anos; Associar os parâmetros laboratoriais com o desenvolvimento da doença.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Risco: desconforto das coletas de sangue da mucosa nasal.

Benefício: Os testes realizados poderão avaliar o risco de aquisição da doença entre os contatos de portadores de hanseníase.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um estudo prospectivo de coorte em um período de seguimento de dois anos após o ingresso no estudo com contatos de portadores de hanseníase com as formas clínicas paucibacilar ou multibacilar abaixo de 15 anos de idade notificados nos últimos três anos, cujos responsáveis consentam em que participem do estudo. Foram selecionados os municípios onde as equipes estarão devidamente capacitadas para realizar exames dermato-neurológico (com objetivo de se realizar busca ativa de hanseníase entre os contatos intradomiciliares abaixo de 15 anos de idade). Dentro desses critérios, foram eleitas quatro cidades em Alagoas, ou seja, Rio Largo, Santana de Ipanema, Arapiraca, onde o grau de endemicidade é considerado alto ou hiperendêmico e uma cidade no Ceará, Itaitinga (hiperendêmico).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados adequadamente: carta de encaminhamento, folha de rosto, currículo do pesquisador, anuência dos pesquisadores, cronograma, orçamento, anuência dos municípios, ref. O TCLE e termo de assentimento.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não se aplica.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1127

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-270

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

Fax: (85)3223-2903

E-mail: comepe@ufc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
CEARÁ/ PROPESQ



Continuação do Parecer: 532.850

FORTALEZA, 18 de Fevereiro de 2014

Assinador por:
FERNANDO ANTONIO FROTA BEZERRA
(Coordenador)

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1127

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-270

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

Fax: (85)3223-2903

E-mail: comepe@ufc.br

APÊNDICE I – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
 FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
 DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
 FACULDADE DE ENFERMAGEM E FARMÁCIA



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Eu, _____, aceito que _____, sob minha responsabilidade, participe da pesquisa **Associação de parâmetros imunológicos e moleculares em sangue e secreções para detecção precoce de casos de hanseníase entre contatos abaixo de 15 anos de idade residentes em municípios de Alagoas e Itaitinga, CE**, sobre análise de anticorpos no sangue e na saliva contra a bactéria causadora da hanseníase e verificar se ela está presente nas narinas e no sangue. Esta análise será realizada uma vez por ano durante 3 anos. Este estudo é importante para quem mora com uma pessoa que tem hanseníase e vai ser importante para ver se ele (a) tem risco de desenvolver a doença. Aceito também responder a um questionário relacionado a ele (a), nossos familiares e ao paciente com quem moramos. Estou de acordo que no momento da coleta, ele (a) seja examinado (a) para se verificar se não tem nenhuma mancha suspeita. Serão coletados saliva (1 mL), sangue (2 tubos com 3 mL cada), e uma amostra das mucosas das narinas. A amostra das narinas será coletada com um cotonete e ele (a) poderá sentir um leve desconforto no momento da coleta. Na coleta de sangue, ele (a) poderá sentir uma leve dor por causa da picada da agulha. Todos os procedimentos serão realizados por pessoas capacitadas.

Caso algum resultado esteja alterado, ele (a) será encaminhado (a) para o posto de saúde.

I. Quais os benefícios e riscos que terei se eu aceitar que ele (a) participe do estudo?

Como benefício, ele (a) terá oportunidade de ser acompanhado (a) durante 3 anos clínica e laboratorialmente para avaliar se ele (a) adquiriu ou não a doença. Com isto, ele (a) poderá ajudar outras pessoas que se encontram nas mesmas condições do que ele (a). Durante o estudo, iremos provar se os testes laboratoriais ajudam ou não a detectar precocemente a doença.

Riscos da realização dos testes: Não há riscos, apenas o desconforto na hora da coleta do material.

II. Quando ele (a) não pode participar do estudo?

Não há contra-indicações para ele (a) participar do estudo

Nós, pesquisadores, garantimos que:

- ❖ Os resultados obtidos durante este estudo serão divulgados sob a forma de relatórios, resumos, publicações científicas e o grupo de pesquisa não divulgará a identidade dos participantes.
- ❖ Os dados dos participantes serão mantidos sob sigilo. No final da pesquisa ou mesmo durante a pesquisa, caso seja necessário, os participantes poderão ter acesso aos resultados individuais.
- ❖ É garantida a liberdade da retirada do consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento à Instituição.
- ❖ É garantido o direito de se manter atualizado sobre resultados parciais da pesquisa, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam de conhecimento dos pesquisadores.

❖ Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames laboratoriais. Não há compensação financeira relacionada à sua participação.

❖ Você é livre para decidir se participará ou não. Se você não quiser participar não vai ter nenhum problema e você continuará seu acompanhamento na sua Unidade de Saúde do mesmo modo. Se você aceitar participar, você poderá voltar atrás e desistir de realizar as coletas das amostras sequenciais a qualquer momento.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim sobre o estudo acima. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

COM QUEM DEVO FALAR SE EU TIVER DÚVIDAS?

Caso tenha perguntas ou dúvidas gerais sobre esta pesquisa ou quaisquer queixas relacionadas à pesquisa, você poderá falar com a coordenadora do projeto (Profª Aparecida Tiemi Nagao-Dias, telefone 85-3366.8270 ou 85-86733891, Universidade Federal do Ceará – Rua Capitão Francisco Pedro, 1210) ou com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFC através do telefone 85-3366.8344.

Cidade		Data da assinatura do termo	
Nome do responsável			

		Impressão digital do responsável
Assinatura da pessoa que aplicou o termo	Assinatura de aceitação do responsável	

APÊNDICE II – TERMO DE ASSENTIMENTO



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
 FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
 DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
 FACULDADE DE ENFERMAGEM E FARMÁCIA



Termo de Assentimento para Sujeitos de 08 a 15 anos de idade completos

Título do estudo: Associação de parâmetros imunológicos e moleculares em sangue e secreções para detecção precoce de casos de hanseníase entre contatos abaixo de 15 anos de idade residentes em municípios de Alagoas e Itaitinga, CE.

Eu, _____, aceito participar da pesquisa sobre análise de anticorpos no sangue e na saliva contra a bactéria causadora da hanseníase e verificar se ela está presente nas narinas e no sangue. Esta análise será realizada uma vez por ano durante 3 anos. Este estudo é importante para quem mora com uma pessoa que tem hanseníase e vai ser importante para ver se tenho risco de desenvolver a doença. Meus responsáveis já estão informados sobre o conteúdo da pesquisa. Aceito também responder a um questionário relacionado a mim, meus familiares e ao paciente com quem moro. Estou de acordo que no momento da coleta, eu seja examinado para se verificar se não tenho nenhuma mancha suspeita. Serão coletados saliva (1 mL), sangue (2 tubos com 3 mL cada), e uma amostra das mucosas das narinas. A amostra das narinas será coletada com um cotonete e poderei sentir um leve desconforto no momento da coleta. Na coleta de sangue, poderei sentir uma leve dor por causa da picada da agulha. Todos os procedimentos serão realizados por pessoas capacitadas.

Caso algum resultado esteja alterado, você será encaminhado para o posto de saúde.

I. Quais os benefícios e riscos que terei se eu aceitar participar do estudo?

Como benefício, você terá oportunidade de ser acompanhado durante 3 anos clínica e laboratorialmente para avaliar se você adquiriu ou não a doença. Com isto, você poderá ajudar outras pessoas que se encontram nas mesmas condições do que você. Durante o estudo, iremos provar se os testes laboratoriais ajudam ou não a detectar precocemente a doença.

Riscos da realização dos testes: Não há riscos, apenas o desconforto na hora da coleta do material.

II. Quando não posso participar do estudo?

Não há contra-indicações para você participar do estudo

Nós, pesquisadores, garantimos que:

- ❖ Os resultados obtidos durante este estudo serão divulgados sob a forma de relatórios, resumos, publicações científicas e o grupo de pesquisa não divulgará a identidade dos participantes.
- ❖ Os dados dos participantes serão mantidos sob sigilo. No final da pesquisa ou mesmo durante a pesquisa, caso seja necessário, os participantes poderão ter acesso aos resultados individuais.
- ❖ É garantida a liberdade da retirada do consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento à Instituição.
- ❖ É garantido o direito de se manter atualizado sobre resultados parciais da pesquisa, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam de conhecimento dos pesquisadores.

❖ Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames laboratoriais. Não há compensação financeira relacionada à sua participação.

❖ Você é livre para decidir se participará ou não. Se você não quiser participar não vai ter nenhum problema e você continuará seu acompanhamento na sua Unidade de Saúde do mesmo modo. Se você aceitar participar, você poderá voltar atrás e desistir de realizar as coletas das amostras sequenciais a qualquer momento.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim sobre o estudo acima. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

COM QUEM DEVO FALAR SE EU TIVER DÚVIDAS?

Caso tenha perguntas ou dúvidas gerais sobre esta pesquisa ou quaisquer queixas relacionadas à pesquisa, você poderá falar com a coordenadora do projeto (Prof^a Aparecida Tiemi Nagao-Dias, telefone 85-3366.8270 ou 85-86733891, Universidade Federal do Ceará – Rua Capitão Francisco Pedro, 1210) ou com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFC através do telefone 85-3366.8344.

Cidade		Data do preenchimento	
Nome do participante			

	Impressão digital do participante
Assinatura de aceitação do participante	

	Impressão digital do responsável
Assinatura da pessoa que aplicou o termo	Assinatura de aceitação do responsável

APÊNDICE IV – QUESTIONÁRIO DESTINADO AOS CONTATOS DE HANSÍASE



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
FACULDADE DE ENFERMAGEM E FARMÁCIA



Nº de identificação do participante

Questionário destinado ao Contato:

DADOS CADASTRAIS

1. Município:		<input type="checkbox"/> Santana do Ipanema		<input type="checkbox"/> Rio Largo		<input type="checkbox"/> Arapiraca		<input type="checkbox"/> Itaitinga		
2. Local de preenchimento do questionário (Unidade de Saúde):										
3. Nome completo do Contato:										
4. R.G.:		5. Data de nascimento		dd	mm	aaaa		6. Sexo: <input type="checkbox"/> Masc. <input type="checkbox"/> Fem.		
7. Nome completo da mãe:										
8. Nome completo do pai:										
9. Logradouro (Rua, Avenida, Travessa, Praça, Rodovia):										
10. Nome do logradouro:								11. Número:		
12. Complemento (Quadra, Lote, Apto)		13. Bairro:								
14. Cidade:		15. Estado:		16. CEP:						
17. Tel 1:	DDD	Número		20. Há quanto tempo mora neste endereço?						
18. Tel 2:	DDD	Número		21. Morou em outra cidade nos últimos 10 anos?			<input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO			
19. Tel 3:	DDD	Número		22. Nome da cidade que morou:						
23. Situação civil <input type="checkbox"/> Solteiro <input type="checkbox"/> Casado <input type="checkbox"/> Separado <input type="checkbox"/> Divorciado <input type="checkbox"/> Viúvo <input type="checkbox"/> União consensual										
24. Qual o curso mais elevado que concluiu?			25. Qual a situação trabalhista no momento?			26. A renda familiar é aproximadamente?				
<input type="checkbox"/> Alfabetização			<input type="checkbox"/> Desempregado			<input type="checkbox"/> Menos que 1 salário mínimo				
<input type="checkbox"/> Fundamental incompleto			<input type="checkbox"/> Emprego formal			<input type="checkbox"/> De 1 a 2 salários				
<input type="checkbox"/> Fundamental completo			<input type="checkbox"/> Emprego informal			<input type="checkbox"/> De 2 a 4 salários				
<input type="checkbox"/> Ensino Médio incompleto			<input type="checkbox"/> Afastado / Licença Saúde			<input type="checkbox"/> De 4 a 6 salários				
<input type="checkbox"/> Ensino Médio completo			<input type="checkbox"/> Estudante			<input type="checkbox"/> Mais que 6 salários				
<input type="checkbox"/> Universidade concluída			<input type="checkbox"/> Empregador			<input type="checkbox"/> Não tem renda				
<input type="checkbox"/> Pós-graduação concluída			<input type="checkbox"/> Aposentado / Pensionista			<input type="checkbox"/> Não sabe informar				
<input type="checkbox"/> Não alfabetizado			27. Profissão:							

APÊNDICE V – ARTIGO PUBLICADO NA BRAZILIAN JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES, EM MAIO 2017

BRAZ J INFECT DIS 2017;21(5):557-561



The Brazilian Journal of
INFECTIOUS DISEASES

www.elsevier.com/locate/bjid



Brief communication

Salivary anti-PGL-1 IgM may indicate active transmission of *Mycobacterium leprae* among young people under 16 years of age



Alexandre Casimiro de Macedo^a, José Evandro Cunha Jr.^a,
Juliana Navarro Ueda Yaochite^a, Clodis Maria Tavares^b, Aparecida Tiemi Nagao-Dias^{a,*}

^a Universidade Federal do Ceará (UFC), Faculdade de Farmácia, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Fortaleza, CE, Brazil

^b Universidade Federal de Alagoas, Faculdade de Enfermagem e Farmácia (EENFAR), Maceio, AL, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 January 2017

Accepted 11 May 2017

Available online 9 June 2017

Keywords:

Leprosy

Salivary antibodies

Phenolic glycolipid-1 antigen

Mycobacterium leprae

ABSTRACT

Considering that the main route of *Mycobacterium leprae* transmission is the upper respiratory tract, detection of salivary antibodies can be a useful tool for diagnosing early infection. The study aimed to analyze salivary anti-PGL-1 IgA and IgM antibodies in 169 children aged 4–16 years old, who lived nearby or inside the house of multibacillary or paucibacillary leprosy patients in two endemic cities in Alagoas State – Brazil. Salivary anti-PGL-1 antibodies were quantified by modified ELISA method. The frequency of contact and clinical form of the index case were significantly associated with salivary antibody levels. High frequency of IgM positivity strongly suggests active transmission of *M. leprae* in these communities. We suggest in the present work that salivary anti-PGL IgA and IgM are important biomarkers to be used for identifying communities with probable active transmission of *M. leprae*.

© 2017 Sociedade Brasileira de Infectologia. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introduction

Brazil is the second country with the highest incidence of leprosy in the world. In 2015, the country presented a detection rate of 14.06 cases per 100,000 inhabitants.¹ Although the number of new cases seems to decrease, it may not represent the reality. For instance, the high incidence of the disease among children means that an active transmission occurs in

the community.² In 2015, the detection rates of leprosy among people under 15 years old in Santana do Ipanema and Rio Largo, two Brazilian cities located in Alagoas State, were 13.77 and 32.81 per 100,000 inhabitants, respectively.³

As the bacteria are not cultivable, secretory antibodies can be a useful tool to detect early infection. The nasopharynx is the main portal of entry for *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), and the nasal epithelial cells are an important reservoir of the bacteria.⁴ As mucosal immune organs and tissues compose an integrated system, saliva is frequently considered to be representative of mucosal humoral immune response. The purpose of the present work was to evaluate salivary anti-phenolic

* Corresponding author.

E-mail address: anagoadias@gmail.com (A.T. Nagao-Dias).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2017.05.001>

1413-8670/© 2017 Sociedade Brasileira de Infectologia. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

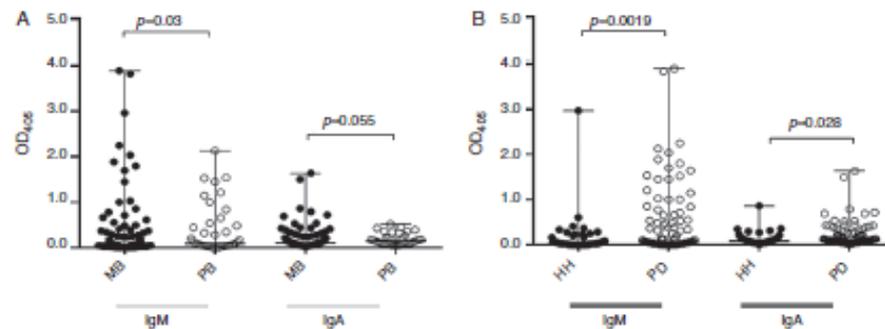


Fig. 1 - Levels of salivary anti-PGL-1 antibodies in 169 young contacts of leprosy patients. (A) Median and range of salivary anti-PGL-1 IgM and IgA in contacts of multibacillary (MB contacts, $n = 115$) and paucibacillary (PB contacts, $n = 40$) leprosy patients. (B) Median and range of salivary anti-PGL-1 IgM and IgA levels in household (HH, $n = 57$) and peridomestic (PD, $n = 112$) contacts. Salivary anti-PGL-1 antibodies were detected by modified ELISA method.

glycolipid 1 antigen (PGL-1) IgA and IgM isotypes among 169 leprosy contacts aged 4–16 years living in the municipalities of Santana do Ipanema and Rio Largo (Alagoas state, Brazil).

Methods

Subjects and sample collection

The contacts ($n = 169$) included in the study were classified as paucibacillary (PB contacts, $n = 40$) or multibacillary (MB contacts, $n = 115$) contacts, according to clinical form of the index case. Fourteen contacts were not classified because the information was not available in the patients' medical records. The participants were also classified as household contacts (HH, $n = 57$) or peridomestic contacts (PD, $n = 112$). Peridomestic contacts were those who were relatives of the index case but did not live in the same house or those who lived close to the index case's house (up to five houses apart). The project was approved by the National Committee for Ethics in Research. Unstimulated saliva samples were collected into tubes, which were transported with ice packs to the laboratory, where they were kept at -20°C until testing (up to three weeks after collection). The presence of lesions and nerve enlargement were investigated at the moment of sample collection. Cases suspected of having the disease were referred to a doctor and excluded from the study.

Detection of salivary anti-PGL-1 antibodies

Microplates were coated with native PGL-1 at 5 mg/L in absolute alcohol for 2 h at 37°C (protocol modified from Brito e Cabral et al., 2013).⁵ After blocking with 1% fetal bovine serum (FBS, LGC Bio, Brazil)-Tris solution for 2 h at 37°C , the wells were incubated with previously centrifuged saliva samples (diluted to 1:50 with 1% FBS-Tris). After 18 h at 4°C and washing with 0.05% FBS-Tris solution, anti-human IgA or anti-IgM alkaline phosphatase antibodies (Sigma, USA, 1:1000 in 1% FBS-Tris) were left on the plates for 2 h at 37°C . After new incubation for 2 h at 37°C , and washing, the substrate solution

(1 mg/ml, *p*-nitrophenyl phosphate in 10% diethanolamine containing 0.5 mM MgCl_2 , pH 9.8) was added to the wells. After 100 min at room temperature, absorbance readings were recorded at 405 nm using an ELISA microplate reader. The results were expressed as the OD mean of the values (minus blank). The cut-off was based on the 97th percentile of normal controls.⁶ Results 30% above the cut-off value were considered to be positive.

Analysis of data

The data were analyzed using nonparametric tests as the data did not follow a Gaussian distribution (Kolmogorov-Smirnov test). All statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 5.0. The level of statistical significance was 5% ($p < 0.05$).

Results

Salivary anti-PGL-1 IgM presented good correlation to salivary IgA titers (Spearman correlation, $r = 0.71$, $p < 0.0001$). No statistical significance was found regarding the age range, either for IgM or IgA (Kruskal-Wallis test, $p = 0.149$ and $p = 0.312$, respectively, Table 1). No significant differences were either found in IgM or IgA titers in respect to the degree of relationship with the index case ($p = 0.325$ and $p = 0.590$, respectively, Table 1). Contacts who reported having weekly contact with the index case had higher IgM antibody titers than those with daily contact ($p = 0.04$, Table 1). MB leprosy contacts presented higher levels of salivary anti-PGL-1 IgM and IgA (Mann-Whitney test, $p = 0.03$ and $p = 0.05$, respectively) than PB leprosy contacts (Fig. 1A). Interestingly, PD contacts had higher levels of salivary IgM and IgA (Mann-Whitney test, $p = 0.019$ and $p = 0.028$, respectively) than the HH contacts (Fig. 1B).

Discussion

With the advent of multidrug therapy the report of new cases of leprosy had a sharp decrease. However, this decline has

Table 1 – Titers of salivary anti-PGL1 IgA and IgM in 169 young contacts of leprosy patients according to the age range of leprosy contacts, their degree and frequency of relationship with the index case.

Age range (years)	Salivary antibody isotype							
	IgM				IgA			
	4-6	7-11	12-16		4-6	7-11	12-16	
n	26	84	59		26	84	59	
Antibody titers (median)	0.032	0.070	0.050		0.087	0.115	0.102	
Antibody titers (interquartile range)	0.010-0.109	0.026-0.428	0.018-0.270		0.050-0.155	0.062-0.226	0.06-0.183	
Kruskal-Wallis test, p	0.149				0.312			
Family or social relationship with the index case	Son/daughter	Grand son/Grand daughter	Nephew/niece/cousin/cousine	Others	Son/daughter	Grand son/Grand daughter	Nephew/niece/cousin/cousine	Others
	Brother/sister				Brother/sister			
n	32	18	26	93	32	18	26	93
Antibody titers (median)	0.035	0.100	0.036	0.062	0.095	0.132	0.125	0.107
Antibody titers (interquartile range)	0.010-0.088	0.023-0.250	0.010-0.483	0.024-0.324	0.050-0.165	0.059-0.194	0.042-0.263	0.067-0.200
Kruskal-Wallis test, p	0.325				0.590			
Frequency of relationship with the index case	Daily	Weekly ^a	Monthly	N.m.	Daily	Weekly	Monthly	N.m.
n	72	27	5	65	72	27	5	65
Antibody titers (median)	0.037	0.25	0.087	0.050	0.100	0.130	0.076	0.110
Antibody titers (interquartile range)	0.010-0.190	0.030-0.550	0.038-0.399	0.02-0.232	0.058-0.185	0.076-0.260	0.062-0.362	0.060-0.199
Kruskal-Wallis test, p	0.04				0.499			

N.m. - not mentioned.

^a p < 0.05 in relation to daily relationship.

become less steep in recent years; on the contrary, there has been a rise in leprosy cases including children.⁶ This makes the goal of eliminating leprosy impossible to be achieved in the next few years,² remembering that there are possible undiagnosed cases that are hidden sources of bacterial transmission. In addition, there are many unknown aspects regarding the ecology of *M. leprae*.⁶ Strategies are necessary to interrupt transmission, such as the development of biomarkers to identify contacts and/or to identify those at risk of developing the disease.⁷

Mucosal immunity in leprosy is poorly understood, although it is known that the nasal cavity is one of the first sites infected by *M. leprae*, and the oral cavity can also be affected, as observed in late-diagnosed patients.⁸ Salivary antibodies of the IgA isotype have been considered as biomarkers of infection, and also of immunity, considering that they may play a role in inhibiting cell adhesion and

in opsonophagocytosis.⁹ Smith et al. (2004), in a follow-up study of people residing in endemic regions for leprosy, found an initial positivity of 1.6% for polymerase-chain reaction of nasal swab and 67.7% for salivary anti-*M. leprae* IgA.¹⁰ A very interesting aspect observed in the study was that the frequency of positivity was higher in certain seasonal periods, especially in the presence of humidity, suggesting that the bacillus remains in the community but not necessarily in the individual.¹⁰ In accordance with this hypothesis, Mohanty and colleagues detected viable strains of *M. leprae* in environmental samples obtained from around the houses of leprosy patients in Ghatampur (India). The prolonged presence of bacilli could play an important role in the continued transmission of leprosy.¹¹

A very low number of studies refer to the presence of anti-PGL1 IgM in saliva,^{5,9,12,13} which possibly indicates recent infection, since the half-life of IgM-producing plasma cells

is only five days, and their levels may be correlated with bacillary load.¹² Abe et al. (1984) found a frequency of positivity corresponding to 4.5% (five out of 110 patients).⁹ We found much higher positivity of salivary anti-PGL1 IgM isotype among leprosy contacts, i.e. 17 out of 47 samples (36.1%) in Rio Largo, and 15 out of 122 samples (12.3%) of children from Santana do Ipanema. Likewise, in a previous study carried out in Crato and Maracanaú cities, state of Ceará, Brazil, 13 out of 135 samples (9.6%) turned out positive for salivary anti-PGL1 IgM.⁵ In this way, one could infer the magnitude of active transmission in the community. In fact, in 2013, the case detection rate among young people under 15 years old was 13.25 cases per 100,000 individuals in Santana do Ipanema, while no case was detected in Rio Largo. In 2014, no case was detected in the two cities. In 2015, the case detection rate in Santana do Ipanema was 32.81 cases per 100,000 individuals and 13.77 cases per 100,000 individuals in Rio Largo.¹

As leprosy infection requires prolonged contact time, those who live in the same house of the index case is believed to be at risk for developing the disease; however, recent reports demonstrated that those who live nearby the index case should also be investigated.¹⁴

It is an intriguing fact found in our present work those who lived nearby the index case presented higher levels of salivary antibodies than the household contacts. The paradox tolerance/activation makes the mucosal immune system a challenging task. The mucosal immune response may be affected by various factors, such as soluble or particulate antigens, chemical nature and concentration of antigen, frequency of exposition, gut microbiota composition, environmental antigenic exposure, nutritional status (deficiency of vitamin A), chronic infections with helminths or other parasites.¹⁵ PGL-1, for instance, facilitates bacterial adhesion,⁴ modulates macrophage cytokine and chemokine production, and may lead T cells to anergy.¹⁶ In this respect, it is probable that PGL-1 exerts some type of oral tolerance on mucosal immune response.

Natural killer T cells recognize glycolipid antigens presented by CD1d molecule and may also play an important role in oral tolerance by inducing tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells, or by deleting antigen-specific T cells.¹⁷ These mechanisms could partly explain what may be occurring in children with prolonged and sustained contact with the index case.

Detection of positive salivary IgM among young people suggests that *M. leprae* transmission is active in the community. For this reason, a strategy at municipal level is extremely urgent in order to reduce the dissemination of the bacillus. Finally, we suggest in the present work that salivary anti-PGL1 IgA and IgM are important biomarkers to be used for identifying communities with probable active transmission of *M. leprae*.

Funding information

This research was financially supported by the MCTI/CNPq/MS-SCTIE [Process 403461/2012-0].

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgements

We would like to thank Mrs. Ana Lúcia Carneiro Leal, Mrs. Gilvânia França Vilela, and Mrs. Andrea Márcia Costa de Farias for helpful assistance.

REFERENCES

1. Brasil. Sala de apoio à gestão estratégica do Ministério da Saúde (SAGE). Indicadores de morbidade: Hanseníase; 2017 [online]. Available from: <http://sage.saude.gov.br/> [Accessed March 31, 2017].
2. Salgado CC, Barreto JC, da Silva MB, Frade MA, Spencer JS. What do we actually know about leprosy worldwide? *Lancet Infect Dis.* 2016;16:778.
3. Brasil. Diretrizes para vigilância, atenção e eliminação da Hanseníase como problema de saúde pública: manual técnico-operacional [online]. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis - Brasília: Ministério da Saúde; 2016. Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/fevereiro/04/diretrizes-eliminacao-hanseníase-4fev16-web.pdf>
4. Silva CA, Danelishvili I, McNamara M, et al. Interaction of *Mycobacterium leprae* with human airway epithelial cells: adherence, entry, survival, and identification of potential adhesins by surface proteome analysis. *Infect Immun.* 2013;81:2645-59.
5. Brito e Cabral P, Júnior JE, de Macedo AC, et al. Anti-PGL1 salivary IgA/IgM, serum IgG/IgM, and nasal *Mycobacterium leprae* DNA in individuals with household contact with leprosy. *Int J Infect Dis.* 2013;17:e1005-10.
6. Smith WC, van Brakel W, Gillis T, Saunderson P, Richardus JH. The missing millions: a threat to the elimination of leprosy. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9:e0003658.
7. Smith WC, Aerts A. Role of contact tracing and prevention strategies in the interruption of leprosy transmission. *Lepr Rev.* 2014;85:2-17.
8. Costa MRSN. Considerações sobre o envolvimento da cavidade bucal na hanseníase. *Hansen Int.* 2008;33:41-4.
9. Abe M, Yoshino Y, Minagawa F, et al. Salivary immunoglobulins and antibody activities in leprosy. *Int J Lepr.* 1984;52:343-50.
10. Smith WC, 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 J Lepr Other Mycobact Dis.* 2004;72:269-77.
11. Mohanty PS, Naaz F, Katara D, et al. Viability of *Mycobacterium leprae* in the environment and its role in leprosy dissemination. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2016;82:23-7.
12. Nagao-Dias AT, Almeida TL, Oliveira MeF, Santos RC, Lima AL, Brasil M. Salivary anti-PGL1 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;11:215-9.
13. Brito e Cabral P, Alves AR, Medeiros KBA, Castelo-Branco ES, de Alencar CP, Nagao-Dias AT. Emprego de marcadores

- séricos e salivares anti-PGL-1 como parâmetros de exposição ocupacional ao *Mycobacterium leprae*. *Rev Panam Infectol*. 2009;11:21-6.
14. Barreto JG, Bisanzio D, Guimarães LdeS, et al. Spatial analysis spotlighting early childhood leprosy transmission in a hyperendemic municipality of the Brazilian Amazon region. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8:e2665.
15. Levine MM. Immunogenicity and efficacy of oral vaccines in developing countries: lessons from a live cholera vaccine. *BMC Biol*. 2010;8:129.
16. Dagur PK, Sharma B, Upadhyay R, et al. Phenolic-glycolipid-1 and lipoarabinomannan preferentially modulate TCR- and CD28-triggered proximal biochemical events, leading to T-cell unresponsiveness in mycobacterial diseases. *Lipids Health Dis*. 2012;11:119.
17. Kim HJ, Hwang SJ, Kim BK, Jung KC, Chung DH. NKT cells play critical roles in the induction of oral tolerance by inducing regulatory T cells producing IL-10 and transforming growth factor beta, and by clonally deleting antigen-specific T cells. *Immunology*. 2006;118:101-11.